

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İZMİR ve AYDIN İLLERİNDEKİ BAZI KAPLICALARDAN İZOLE EDİLEN
TERMOFİLİK BAKTERİ İZOLATLARININ MOLEKÜLER TAKSONOMİSİ ve
D1021 İZOLATININ GLUKOZ İZOMERAZININ KARAKTERİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Biyolog Kadriye İNAN

HAZİRAN 2011
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İZMİR ve AYDIN İLLERİNDEKİ BAZI KAPLICALARDAN İZOLE EDİLEN
TERMOFİLİK BAKTERİ İZOLATLARININ MOLEKÜLER TAKSONOMİSİ ve
D1021 İZOLATININ GLUKOZ İZOMERAZININ KARAKTERİZASYONU**

Biyolog Kadriye İNAN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20.05.2011
Tezin Savunma Tarihi : 20.06.2011**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Trabzon 2011

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalında

Kadriye İNAN Tarafından Hazırlanan

**İZMİR ve AYDIN İLLERİNDEKİ BAZI KAPLICALARDAN İZOLE EDİLEN
TERMOFİLİK BAKTERİ İZOLATLARININ MOLEKÜLER TAKSONOMİSİ ve
D1021 İZOLATININ GLUKOZ İZOMERAZININ KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 31 / 05 / 2011 gün ve 1407/2 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20 / 06 / 2011 tarihinde yapılan sınavda**

DOKTORA TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof.Dr.Nevzat ŞAHİN

Üye : Prof.Dr.A.Osman BELDÜZ

Üye : Doç.Dr.Sabriye ÇANAKÇI

Üye : Doç.Dr.Neşe KAKLIKKAYA

Üye : Doç.Dr.Kazım SEZEN



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“İzmir ve Aydın İllerindeki Bazı Kaplıcalardan İzole Edilen Termofilik Bakteri İzolatlarının Moleküler Taksonomisi ve D1021 İzolatının Glukoz İzomerazının Karakterizasyonu” adlı bu çalışma K.T.Ü. Bilimsel Araştırma Fonu 2008.111.04.3 numaralı araştırma projesinden sağlanan destek ile Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Araştırma konusunun seçiminde ve çalışmaların planlanıp değerlendirilmesinde değerli eleştiri ve önerileri ile yol gösteren hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, laboratuvar çalışmalarının ve tez yazımının her aşamasında engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Doç.Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda yaşadığım zor anlarda yardımlarıyla bana destek olan K.T.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarının tüm çalışanlarına ve özellikle enzim çalışmalarında bilgi ve yardımlarını esirgemeyerek yol gösterici olan Yrd.Doç.Dr. Hakan KARAOĞLU ve Arş.Gör. Fulya AY’a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca bana tez yazımında çok destek olan Onur TOSUN, Mehmet DEMİRALAY ve Ersan BEKTAŞ’a çok teşekkür ederim. Çalışmaların gerçekleştirmesi için maddi destek sağlayan K.T.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) destek birimine teşekkür ederim.

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

Kadriye İNAN
Trabzon 2011

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “İzmir ve Aydın İllerindeki Bazı Kaplıcalardan İzole Edilen Termofilik Bakteri İzolatlarının Moleküler Taksonomisi ve D1021 İzolatının Glukoz İzomerazının Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 20/05/2011

Kadriye İNAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	X
SUMMARY	XI
ŞEKİL LİSTESİ	XII
TABLO LİSTESİ	XIV
SEMBOLLER DİZİNİ	XV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Termofilik Bakteriler ve Habitatları	4
1.3. Termofilliğin Moleküler Temelleri.	7
1.4. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı	10
1.5. Bakteri Sistematğinde Kullanılan Bazı Yöntemler	13
1.5.1. Genotipik Yöntemler	14
1.5.1.1. DNA Baz Kompozisyonu	14
1.5.1.2. DNA-DNA Hibridizasyonu	15
1.5.1.3. Ribozomal RNA Analizi (rRNA)	17
1.5.1.3.1. 16S rRNA'nın Tür Tayininde Kullanılması	17
1.5.1.3.2. 16S rRNA'nın Çok Değişken (HV) Bölgesi	18
1.5.1.3.3. 16S-23S rRNA Genleri Arasındaki “Spacer” Bölgeler	21
1.5.1.4. Protein Kodlayan Genlerin Dizin Analizleri	23
1.5.1.4.1. <i>recN</i>	24
1.5.1.4.2. <i>rpoB</i>	25
1.5.1.5. DNA Parmak İzi Analizleri	29
1.5.1.5.1. Genomik DNA'nın Restriksiyon Analizi	29
1.5.1.5.2. PCR'a Dayalı Yöntemler	30

1.5.1.5.2.1. Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)	30
1.5.1.5.2.2. Tekrarlanan Dizilere Dayalı PCR (Rep-PCR).....	31
1.5.1.5.2.3. oğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)	32
1.5.2. Fenotipik Yöntemler.....	32
1.5.2.1. Klasik Fenotipik Analizler.....	32
1.5.2.2. Kemotaksonomik Yöntemler.....	34
1.5.2.2.1. Çözünebilir Protein Profili	34
1.5.2.2.2. Lipid ve Yağ Kompozisyonu	35
1.6. <i>Anoxybacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri	36
1.7. <i>Brevibacillus</i> ve <i>Aneurinibacillus</i> Cinslerinin Genel Özellikleri.....	36
1.8. <i>Geobacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	39
1.9. <i>Thermus</i> Cinsinin Genel Özellikleri	40
1.10. Proteobacteria Şubesinin Genel Özellikleri.....	40
1.10.1. Alfaproteobacteria	41
1.10.2. Betaproteobacteria	41
1.10.3. Gammaproteobacteria.....	41
1.10.4. Deltaproteobacteria.....	42
1.10.5. Epsilonproteobacteria	42
1.11. Glukoz İzomerazlar ve Biyoteknolojideki Önemi.....	42
1.12. Glukoz İzomerazın Özellikleri	44
1.12.1. Substrat Seçiciliği	45
1.12.2. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler.....	45
1.12.3. Alt Ünite Yapısı.....	45
1.12.4. Optimum Sıcaklık ve pH	46
1.12.5. GI'ların DNA Dizi Benzerliği ve Reaksiyon Mekanizması.....	46
1.13. GI Üreten Mikroorganizmalar	47
1.14. Endüstriyel GI'lar	48
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	49
2.1. Materyal	49
2.1.1. Besiyeri, Kimyasallar ve Vektörler	49
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri.....	49
2.2. Metotlar	50
2.2.1. Kaplıcalardan Örneklerin Alınması ve Termofilik Bakterilerin İzolasyonu ...	50

2.2.2.	İzolatların Bazı Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi	50
2.2.2.1.	İzolatların Klasik Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi	50
2.2.2.1.1.	İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	51
2.2.2.1.2.	İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	51
2.2.3.	İzolatların Bazı Kemotaksonomik Özelliklerinin Belirlenmesi	52
2.2.3.1.	İzolatların Çözülebilir Hücre Proteinlerinin Profilinin Çıkarılması	52
2.2.3.1.1.	Çözünebilir Hücre Proteinlerinin İzolasyonu	52
2.2.3.1.2.	Protein Konsantrasyonunun Tayini	52
2.2.3.1.3.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	52
2.2.3.2.	İzolatların Yağ Asidi İçeriklerinin Ortaya Çıkarılması	52
2.2.4.	İzolatların Bazı Genotipik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	53
2.2.4.1.	İzolatların Genomik DNA'larının İzolasyonu.....	53
2.2.4.1.1.	Marmur Prosedürü	54
2.2.4.1.2.	Sambrook ve Arkadaşlarının Prosedürü	55
2.2.4.2.	İzolatların rRNA Analizleri	56
2.2.4.2.1.	16S rRNA Geninin PCR ile Çoğaltımı.....	56
2.2.4.2.2.	16S rRNA Geninin Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve GenBank'taki Sıralarla Karşılaştırılması	57
2.2.4.2.3.	16S rRNA Çok Değişken (HV) Bölgesi.....	57
2.2.4.3.	<i>recN</i> Geninin PCR ile Çoğaltımı	57
2.2.4.4.	<i>rpoB</i> Geninin PCR ile Çoğaltımı.....	58
2.2.4.5.	<i>rpoB</i> ve <i>recN</i> Genlerinin Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve GenBank'taki Sıralarla Karşılaştırılması	58
2.2.4.6.	16S rRNA, HV Bölgesi, <i>recN</i> ve <i>rpoB</i> Gen Dizilerine Göre Filogenetik Ağaç Çizilmesi	59
2.2.4.7.	% G+C Baz Kompozisyonunun Belirlenmesi	59
2.2.4.8.	DNA-DNA Hibridizasyonu.....	60
2.2.5.	<i>A. kaynarcensis</i> D1021 ^T 'de Glukoz İzomerez Aktivitesinin Tespiti.....	60
2.2.6.	GI Üzerinde Yapılan Moleküler Çalışmalar.....	61
2.2.6.1.	Glukoz İzomerez Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi.....	61
2.2.6.2.	GI geninin pET-28a+ Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	62
2.2.7.	Enzim Üretimi	63
2.2.8.	GI'nın Saflaştırılması	63

2.2.8.1.	Isı Bozunumu.....	63
2.2.8.2.	İyon Değişim Kromatografisi.....	64
2.2.8.3.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi.....	65
2.2.9.	GI enziminin Karakterizasyonu.....	65
2.2.9.1.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi.....	65
2.2.9.2.	Enzim Kinetiği.....	66
2.2.9.3.	Optimum Sıcaklık.....	66
2.2.9.4.	Optimum pH.....	66
2.2.9.5.	Isıl Kararlılığı.....	67
2.2.9.6.	pH Kararlılığı.....	67
3.	BULGULAR.....	68
3.1.	Termofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	68
3.2.	İzolatların 16S rRNA Genlerinin Baz Dizileri.....	69
3.3.	İzolatların Çözünebilir Protein Profillerinin Belirlenmesi.....	79
3.4.	<i>Brevibacillus</i> Cinsine Ait İzolatların 16S rRNA Çok Değişken (HV) Bölgelerinin Analizi.....	81
3.5.	<i>Aneurinibacillus</i> Cinsine Ait İzolatların 16S rRNA Çok Değişken (HV) Bölgelerinin Analizi.....	83
3.6.	<i>Geobacillus</i> Cinsine Ait İzolatların Bazı Genotipik Özellikleri.....	85
3.6.1.	16S rRNA Çok Değişken (HV) Bölgelerinin Analizi.....	85
3.6.2.	<i>recN</i> Geni Analizleri.....	87
3.6.3.	<i>rpoB</i> Geni Analizleri.....	88
3.7.	<i>Anoxybacillus</i> Cinsine Ait İzolatların Bazı Genotipik Özellikleri.....	93
3.7.1.	<i>Anoxybacillus</i> Cinsine Ait İzolatların <i>rpoB</i> Gen Analizleri.....	93
3.7.2.	% G+C Kompozisyonunun Belirlenmesi.....	98
3.7.3.	DNA-DNA Hibridizasyonu.....	98
3.7.4.	Bazı Fenotipik Karakterlerin Belirlenmesi.....	99
3.7.5.	Yağ Asidi İçeriği.....	99
3.8.	<i>Thermus</i> Cinsine Ait İzolatların Bazı Genotipik Özellikleri.....	99
3.8.1.	DNA Baz Kompozisyonunun Belirlenmesi.....	100
3.8.2.	DNA-DNA Hibridizasyonu.....	100
3.9.	<i>Schlegelella</i> Cinsine Ait İzolatın Bazı Genotipik ve Kemotaksonomik Özellikleri.....	100
3.9.1.	Yağ Asidi İçeriği.....	101

3.9.2.	DNA Baz Kompozisyonunun Belirlenmesi	102
3.9.3.	DNA-DNA Hibridizasyonu.....	102
3.10.	<i>Chelatococcus</i> Cinsine Ait İzolatın Bazı Genotipik ve Kemotaksonomik Özellikleri	102
3.10.1.	Yağ Asidi İçeriği	103
3.10.2.	DNA Baz Kompozisyonunun Belirlenmesi	104
3.10.3.	DNA-DNA Hibridizasyonu.....	104
3.11.	<i>Pseudoxanthomonas</i> Cinsine Ait İzolatın Bazı Genotipik ve Kemotaksonomik Özellikleri.....	104
3.11.1.	Yağ Asidi İçeriği	105
3.11.2.	DNA Baz Kompozisyonunun Belirlenmesi	106
3.11.3.	DNA-DNA Hibridizasyonu.....	106
3.12.	<i>A. kaynarcensis</i> D1021 ^T ’de Glukoz İzomeraz Aktivitesi.....	107
3.13.	<i>A. kaynarcensis</i> D1021 ^T GI Kodlayan <i>xylA</i> Geninin Baz ve Protein Dizilimi	107
3.14.	<i>A. kaynarcensis</i> D1021 ^T Glukoz İzomerazının Saflaştırılması.....	108
3.14.1.	Hücre Özütü Elde Edilmesi ve Isı Şoku Uygulamaları	108
3.14.2.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi.....	108
3.14.3.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi.....	108
3.15.	<i>A. kaynarcensis</i> D1021 ^T Glukoz İzomerazın Karakterizasyonu	110
3.15.1.	Deneylerde Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi	110
3.15.2.	Enzim Kinetiği.....	110
3.15.3.	Optimum Sıcaklık.....	111
3.15.4.	Optimum pH	112
3.15.5.	Isıl Kararlılığı	112
3.15.6.	pH Kararlılığı.....	113
4.	TARTIŞMA	114
5.	SONUÇLAR	135
6.	ÖNERİLER	137
7.	KAYNAKLAR	139
8.	EKLER	160
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

İZMİR VE AYDIN İLLERİNDEKİ BAZI KAPLICALARDAN İZOLE EDİLEN
TERMOFİLİK BAKTERİ İZOLATLARININ MOLEKÜLER TAKSONOMİSİ VE
D1021 İZOLATININ GLUKOZ İZOMERAZININ KARAKTERİZASYONU

Kadriye İNAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2011, 159 Sayfa, 62 Ek

Termofilik ortamlar, endüstriyel öneme sahip çeşitli enzimleri üreten termofilik organizmaları barındıran zengin kaynaklardır. Bu çalışmada, Karakoç Kaplıcası, Kaynarca Kaplıcası, Nebiler Kaplıcası, Alangüllü Kaplıcası, Çamköy Çamur Ilıcası ve Aydın Germencik Ömerbeyli Jeotermal sahasından su ve çamurlu su örneklerinden termofilik bakteri izolasyonları gerçekleştirildi. *Geobacillus* (12 izolat), *Anoxybacillus* (18 izolat), *Brevibacillus* (9 izolat), *Thermus* (5 izolat), *Aneurinibacillus* (4 izolat) ve *Pseudoxanthomonas* (1 izolat), *Schlegelella* (1 izolat) ve *Chelatococcus* (1 izolat) cinslerine ait izolatların tür seviyesinde sistematikleri yapılmaya çalışıldı. İzmir Kaynarca kaplıcasından izole edilen D1021 izolatın, *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğu belirlendi ve *A. kaynarcensis* D1021^T olarak adlandırıldı. Ayrıca yapılan genotipik analizler sonucunda, yeni tür olma potansiyeline sahip yeni *Brevibacillus* spp. ve *Geobacillus* spp. elde edildi. Bu çalışmada ayrıca, *A. kaynarcensis* D1021^T glukoz izomeraz geninin tüm baz dizilimi belirlendi ve pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlandı, üretilip kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı. *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sı optimum 80°C'de ve pH 7,0'de çalışan termofilik bir enzimdir. Enzimin *K_m*'si 101,75 mM *V_{max}*'ı ise 14,06 µmol/dk/mg protein olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler: *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Thermus*,
Aneurinibacillus, *Pseudoxanthomonas*, *Schlegelella*,
Chelatococcus, 16S rRNA, HV, *recN*, *rpoB*, DNA-DNA
hibridizasyonu, Glukoz izomeraz

PhD. Thesis

SUMMARY

MOLECULAR TAXONOMY OF THERMOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM HOT SPRINGS IN THE PROVINCES OF AYDIN AND IZMİR, AND CHARACTERIZATION OF GLUCOSE ISOMERASE OF THE ISOLATE D1021

Kadriye İNAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Ali Osman BELDÜZ
2011, 159 Pages, 62 Pages Appendix

Thermophilic environments are rich resources for thermophilic organisms which synthesize a variety of enzymes that have important industrial applications. Thermophilic bacteria isolations from Hisarkoy Hot Spring (Balıkesir), Dikili-Bergama Kaynarca Hot Spring (İzmir), Camkoy Camur Hot Spring (Aydın) and Hidirlar Hot Spring (Çanakkale) were made. Systematics of these isolates belonging to *Geobacillus* (12 isolates), *Anoxybacillus* (18 isolates), *Brevibacillus* (9 isolates), *Thermus* (5 isolates), *Aneurinibacillus* (4 isolates) ve *Pseudoxanthomonas* (1 isolate), *Schlegelella* (1 isolate) ve *Chelatococcus* (1 isolate) genus were studied to be made at the species level in these study. D1021 isolate belonging to *Anoxybacillus* genus from İzmir Kaynarca hot spring was new species designated as *A. kaynarcensis* D1021^T. Based on genotypic analyses, some isolates had potential of being new species belonging to *Brevibacillus* and *Geobacillus* genus. Gene coding for thermophilic glucose isomerase of *A. gonensis* G2^T was isolated and its complete nucleotide sequence was determined. The gene has been cloned to plasmid vector pET-28a+ and overexpressed in *E. coli* BL21(DE3). The enzyme was purified by column chromatography techniques. The purified GI showed optimal activity at 80°C in pH 7.0. Its *K_m* and *V_{max}* value were 101,75 mM and 14,06 µmol/dk/mg protein, respectively.

Key Words: *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Thermus*, *Aneurinibacillus*, *Pseudoxanthomonas*, *Schlegelella*, *Chelatococcus*, 16S rRNA, HV, *recN*, *rpoB*, DNA-DNA hybridization, Glucose isomerase

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Türkiyenin 500 m derinlikteki yer altı sıcaklıkları	6
Şekil 2.	<i>Brevibacillus brevis</i> suşlarının HV bölgesi dizin analizi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	21
Şekil 3.	<i>rpoB</i> ve 16S rRNA gen dizin benzerliklerinin, DNA-DNA hibridizasyon değerleriyle karşılaştırılması	27
Şekil 4.	<i>Bacillus</i> türlerinin 16S rRNA gen dizin analizi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	38
Şekil 5.	D-glukozun D-fruktoza, D-ksilozun da D-ksiluloza GI aracılığıyla dönüşümlü izomerizasyonu	43
Şekil 6.	<i>Thermus</i> tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	70
Şekil 7.	<i>Aneurinibacillus</i> tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	71
Şekil 8.	<i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Schlegelella</i> ve <i>Chelatococcus</i> cinslerine ait izolatların, <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Schlegelella</i> ve <i>Chelatococcus</i> tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	72
Şekil 9.	<i>Brevibacillus</i> tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	74
Şekil 10.	<i>Geobacillus</i> tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	76
Şekil 11.	<i>Anoxybacillus</i> tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	78
Şekil 12.	<i>Anoxybacillus</i> cinsine ait olan 18 izolattan saflaştırılan çözünebilir hücre proteinlerinin % 12'lik SDS-PAGE'de analizi	79
Şekil 13.	<i>Thermus</i> cinsine ait olan 12 izolattan saflaştırılan çözünebilir hücre proteinlerinin % 12'lik SDS-PAGE'de analizi	80
Şekil 14.	<i>Brevibacillus</i> cinsine ait olan 9 izolattan saflaştırılan çözünebilir hücre proteinlerinin % 12'lik SDS-PAGE'de analizi	80
Şekil 15.	<i>Geobacillus</i> cinsine ait olan 12 izolattan saflaştırılan çözünebilir hücre proteinlerinin % 12'lik SDS-PAGE'de analizi	81

Şekil 16.	<i>Brevibacillus</i> tür ve izolatlarının HV bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	83
Şekil 17.	<i>Aneurinibacillus</i> tür ve izolatlarının HV bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	84
Şekil 18.	<i>Geobacillus</i> tür ve izolatlarının HV bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	86
Şekil 19.	<i>Geobacillus</i> tür ve izolatlarının <i>recN</i> genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	88
Şekil 20.	<i>Geobacillus</i> tür ve izolatlarının <i>rpoB</i> genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	89
Şekil 21.	<i>Anoxybacillus</i> tür ve izolatlarının <i>rpoB</i> gen dizini açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	95
Şekil 22.	Saflaştırılmış rekombinant <i>A. kaynarcensis</i> D1021 glukoz izomerazının SDS-PAGE analizi.....	109
Şekil 23.	<i>A. kaynarcensis</i> D1012'in glukoz izomerazının Michaelis-Menten eğrisi	110
Şekil 24.	<i>A. kaynarcensis</i> D1021'in glukoz izomerazının Lineweaver-Burk eğrisi	111
Şekil 25.	<i>A. kaynarcensis</i> D1021'in glukoz izomerazının optimum sıcaklık grafiği.....	111
Şekil 26.	<i>A. kaynarcensis</i> D1021'in glukoz izomerazının optimum pH grafiği.....	112
Şekil 27.	<i>A. kaynarcensis</i> D1021'in glukoz izomerazının ısı kararlılığı	113
Şekil 28.	<i>A. kaynarcensis</i> D1021'in glukoz izomerazının pH kararlılığı	113

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Termofilik bakterilerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar	13
Tablo 2. Ticari öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünleri (GI)	48
Tablo 3. Termofilik suşlar ve bu suşların izole edildiği termal alanlar	69
Tablo 4. <i>Thermus</i> cinsine ait izolatların, <i>Thermus</i> türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi.....	70
Tablo 5. <i>Aneurinibacillus</i> cinsine ait izolatların, <i>Aneurinibacillus</i> türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi	70
Tablo 6. <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Schlegelella</i> ve <i>Chelatococcus</i> cinslerine ait izolatların, <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Schlegelella</i> ve <i>Chelatococcus</i> türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi	71
Tablo 7. <i>Brevibacillus</i> cinsine ait izolatların, <i>Brevibacillus</i> türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi	763
Tablo 8. <i>Geobacillus</i> cinsine ait izolatların, <i>Geobacillus</i> türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi	75
Tablo 9. <i>Anoxybacillus</i> cinsine ait izolatların, <i>Anoxybacillus</i> türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi.....	77
Tablo 10. <i>Brevibacillus</i> cinsine ait 9 izolatın, <i>Brevibacillus</i> türlerinin 16S rRNA ve HV bölgeleri arasındaki benzerliklerinin yüzdesi.....	82
Tablo 11. <i>Aneurinibacillus</i> cinsine ait 4 izolatın, <i>Aneurinibacillus</i> türlerinin 16S rRNA ve HV bölgeleri arasındaki benzerliklerinin yüzdesi.....	84
Tablo 12. <i>Geobacillus</i> cinsine ait 12 izolatın, <i>Geobacillus</i> türlerinin 16S rRNA, HV, <i>recN</i> ve <i>rpoB</i> genleri arasındaki benzerliklerinin yüzdesi.....	90
Tablo 13. <i>Anoxybacillus</i> cinsine ait 14 izolatın, <i>Anoxybacillus</i> türlerinin 16S rRNA ve <i>rpoB</i> genleri arasındaki benzerliklerinin yüzdesi.....	96
Tablo 14. PDF7 izolatının yağ asidi içeriklerinin <i>Schlegelella aquatica</i> LMG 23380 ^T ve <i>Schlegelella thermodepolymerans</i> DSM 15344 ^T ile karşılaştırılması.....	101
Tablo 15. PDF20 izolatının yağ asidi içeriklerinin <i>Chelatococcus daeguensis</i> DSM 22069 ^T ve <i>Chelatococcus asaccharovorans</i> DSM 6462 ^T ile karşılaştırılması.....	103

Tablo 16. PDF31 izolatının yağ asidi içeriklerinin <i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> KCTC 22832 ^T ve <i>P. broegbernensis</i> DSM 12573 ^T ile karşılaştırılması.....	105
Tablo 17. <i>A. kaynarcensis</i> D1021 glukoz izomerazına ait saflaştırma tablosu.....	109

SEMBOLLER DİZİNİ

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
BSA	Bovin Serum Albumin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	Food and Drug Administration
GI	Glukoz izomeraz
HFCS	High Fructose Corn Syrup
HV	Çok değişken
IPTG	İzopropil β -D-1- tiyogalaktopiranosid
ITS-PCR	Internally Transcribed Spacer PCR
LFRFA	Düşük Sıklıklı Restriksiyon Fragmenti Analizi
M	Molar
mM	Milimolar
MOPS	3-(N-Morfolino) propansülfonik asit
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
<i>recN</i>	DNA repair and genetic recombination protein
Rep-PCR	Tekrarlanan Dizilere Dayalı PCR
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz Enzimi
<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Dünya üzerindeki yaşamın olağanüstü çeşitliliği, insanları geçmişten beri cezpt etmektedir. Sadece, canlıların ilgi çekici çeşitliliği değil, bu canlıların çok farklı zaman ve mekânlardaki dağılımları ve işlevleri de oldukça merak uyandırıcı bir konudur. Ancak; çeşitlilikle ilgili bilgilerin oldukça önemli bir kısmı, bitki ve hayvanlar üzerine yapılan biyoçeşitliliğin dağılımı ve korunması üzerine dayanan araştırmalardan elde edilmiştir. Mikrobiyal çeşitliliğin çok büyük bir kısmı (> % 95) hala keşfedilmemiş haldedir (Hugenholtz ve Pace, 1996; Ward vd., 1990). Prokaryotların dünya üzerindeki toplam tür çeşitliliğinin $4-6 \times 10^{30}$ olduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde geçerliliği kabul edilen tanımlanmış prokaryot türlerin bu tahmin edilen sayının ancak % 1'ini oluşturduğu hesaplanmıştır. Dolayısı ile günümüzde prokaryotların gerçek çeşitliliği hakkında çok az şey bilinmektedir (Whitman vd., 1998).

Sistematik çalışmalarındaki gelişmelere rağmen, günümüzde doğal habitatlarda bulunan prokaryotik tür sayısını tam olarak tahmin etmek mümkün değildir (Curtis vd., 2002; Ward vd., 1998; Stach vd., 2003; Curtis ve Sloan, 2004.) Prokaryotlar içinde ise en fazla çeşitliliğe sahip olan ve kültürü yapılabilen grup *Actinobacteria*, *Proteobacteria* ve düşük G+C oranına sahip Gram + bakterilerdir. Bakteriler, dünya üzerinde, en fazla miktarda bulunan ve en çok çeşitliliğe sahip olan canlı gruplarından bir tanesidir. Ancak bakterilerin ekolojik önemine rağmen, bakteriyel çeşitlilikle ilgili araştırmalar ancak son zamanlarda yapılmaya başlamıştır (Ward vd., 1998; Tunlid, 1999). Bakteri türleri ve fonksiyonel çeşitlilikleri hakkında çok az bilgi bilinmektedir ve bakterilerin ekosistemdeki rolleri ve oluşturduğu etki ve işlevleriyle ilgili bilgiler, araştırılması gereken bilgilerin temelini oluşturmaktadır.

Özellikle son birkaç yıldır bakteriyel çeşitlilikte, ekstrem çevrelerdeki biyoçeşitliliğe ilginin büyüdüğü görülmektedir. Ekstrem çevre koşullarının, canlı çeşitliliği üzerine baskın olduğu teorisi bu ilginin kaynağı olarak düşünülmektedir. Ekstrem çevrelerin biyoçeşitliliğini araştırmanın en önemli sebeplerinden biri ise, endüstriyel uygulamalarda kullanılan extremozymes'leri içeren doğal bakteri içeriğidir. Mikrobiyal çeşitlilik ve ekoloji hakkında tam bir bilgi olmadan; sürdürülebilirlik ile ilgili ekolojik çalışmalar tam

anlamıyla açıklığa kavuşturulamaz (Sly, 1998). Ekstrem çevre koşulları; termofilik-çok yüksek (55-121°C) ya da çok düşük (-2 -20°C) sıcaklık, yüksek tuzluluk (2-5 M NaCl) ve çok yüksek alkali (pH > 8) ya da çok yüksek asitli (pH < 4) koşullardır. Ekstrem çevreler; böyle şiddetli ve ekstrem ortam koşulları altında hayatta kalabilmek ve büyümek için genetik ve fizyolojik kapasiteye sahip mikroorganizmaların doğal ortamlarıdır. Bu nedenle ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar, biyoteknolojik araçlar olarak kullanım potansiyeli yüksek olan benzersiz fizyolojik özellikler sağlarlar. Termofilik ortamlar, endüstriyel öneme sahip çeşitli enzimleri üreten termofilik organizmaları barındıran zengin kaynaklardır (Olsen vd., 1994; Woese, 1987).

Ekstrem sıcaklık şartlarında yaşamaya adapte olmuş olan termofilik bakteriler, ilk kez 1888 yılında Miquel tarafında izole edilmiştir. Miquel'in bu keşfinden sonra dünyanın farklı bölgelerindeki jeotermal kaynaklardan çok sayıda termofilik mikroorganizma izole edilmiştir. İzole edilen bu termofilik bakteriler, *Bacillus* ve *Alcyclobacillus* cinsleri altında gruplandırılmış ve özellikle *Bacillus* cinsi tanımlanan termofilik türlerin büyük bir çoğunluğunu içermekteydi (Rainey vd., 1994). Sonraki yıllarda, moleküler tekniklerin gelişmesiyle beraber, *Bacillus* cinsi bakterilerinin geniş ve çeşitli grupları yeni cinslere bölünmüştür. Bu cinsler; *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Salibacillus*, *Gracilibacillus*, *Ureibacillus*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus* ve son olarak *Aeribacillus*'tur. Bu yeni cinsler 16S rRNA gen dizin analizleri baz alınarak ayrı filogenetik gruplara dahil edilmiştir (Banat vd., 2004; Minana-Galbés vd., 2010).

Termofilik bakterilerin sistematğinde; 16S rRNA gen dizin analizleri baz alınarak yapılan sınıflandırma, halen daha çok başarıyla kullanılmasına rağmen, özellikle birbirine aşırı derecede benzeyen organizmaların ayrılmasında ve bakterilerin filogenetik akrabalıklarının ortaya çıkarılmasında çok başarılı olmadığı görülmüştür (Yoon vd., 1997). 16S rRNA geninin, bir bakteri genomunda birçok kopya halinde bulunması ve yakın türler arasında aşırı korunmuşluk göstermesi, ortaya bu tip problemlerin çıkmasına sebep olmuştur. Bu nedenle, taksonomik çalışmalar, 16S rRNA gen dizin analizine alternatif olarak protein kodlayan genlerin incelenmesi yönüne kaymıştır.

Yapılan tüm çalışmalar ışığında, 2002 yılında bakteri sistematik otoriteleri tarafından, protein kodlayan en az beş genin dizin analizinin, bir bakteri türünü yakın akrabalarından ayırmak için yeterli seviyede filogenetik verileri sağladığı sonucuna varılmıştır. Bu yöntem kullanılarak bir tür tanımlandığı zaman, kullanılan genlerden tek bir tanesinin dizin verilerinin, bu türe suşların ilave edilmesi için yeterli olacağı belirlenmiştir (Stackebrandt

vd., 2002). Sınıflandırma çalışmalarında protein kodlayan genlerin kullanılmaya başlanması ile, sınıflandırmanın daha kesin ve doğru olarak yapılabildiği pek çok çalışmada gösterilmiştir (Kuhnert ve Korczak, 2006; Tourova vd., 2010). DNA tamiri ve genetik rekombinasyon proteinini kodlayan *recN* geni ve RNA polimerazın β alt ünitesini kodlayan *rpoB* geninin, sistematik çalışmalarında önemli yer tuttuğu ve pek çok cinsin tür seviyesinde sınıflandırılmasında başarılı olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir (Adekambi vd., 2008a,b; Case vd., 2007; Zeigler, 2005; Glazunova vd., 2010)

Termofilik organizmalar, mikrobiyologlar ve biyokimyacılar için oldukça cazip edici bir konudur. Termofilik organizmaların hücre bileşenleri termal kararlı olduğu gibi, aşırı derecede asidik ve alkali şartların denatürasyonlarına da dirençlidir (Haki ve Rakshit, 2003). Bu nedenle termofilik organizmalar içerdikleri termofilik enzimlerden dolayı, genetik mühendisliği ve biyoteknoloji açısından oldukça önemlidirler (Brock, 1969).

Termofilik enzimlerin pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı gösterdikleri kararlılık ve bu yüksek sıcaklığın getirdiği pek çok avantajlardan dolayı, termofilik enzimler birçok endüstriyel alanda tercih edilmektedirler. Bununla birlikte bu enzimlerden bazıları, son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir ve bu enzimler moleküler biyoloji alanında, nişasta endüstrisi, gıda endüstrisi, petrol endüstrisi, kimya endüstrisi, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi gibi pek çok endüstri alanında geniş ölçüde kullanılmaktadır (İnan, 2005).

Glukoz izomeraz, glukozun fruktoza izomerizasyonunu katalizlediği için endüstriyel alanda, özellikle HFCS (High Fructose Corn Syrup) üretiminde, ticari bir öneme sahiptir. Fruktoz şuruplarının endüstriyel uygulamalarda başarıyla uygulanabilmesinin altında yatan sebep glukoz izomerazın keşfi olmuştur. Glukoz izomeraz, D-ksilozun D-ksiluloza dönüşümünü katalizlediği gibi D-glukozun D-fruktoza dönüşümünü de katalizlemektedir. Bu ikinci özelliği, HFCS (fruktoz şurubu) üretiminde endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Glukoz izomeraz bugün dünyada ticari amaçla en çok kullanılan üç enzimden biridir. HFCS diğer tatlandırıcı şekerlere nazaran bir takım avantajlara sahiptir. 2000 yılı itibariyle, dünya çapında yıllık HFCS tüketimi 10 milyon ton kuru ağırlığa ulaşmıştır. Bugün için gıda endüstrisinde, glukoz izomeraz kullanımı ile üretilen fruktoz şurupları, sıklıkla gazlı ve gazsız içecekler, fırın ürünleri, çeşitli hububat ürünleri, süt mamulleri ve işlenmiş gıdalarda yoğun miktarlarda kullanılmaktadır. Sahip olduğu endüstriyel önemden dolayı glukoz izomeraz enzimi birçok araştırmacı için ilgi odağı olmuş ve bugüne kadar birçok glukoz izomeraz geni klonlanmış ve karakterize edilmiştir (Karaoğlu, 2010).

Yapılan bu çalışmanın amacı, yerden çıkış sıcaklıkları 70°C'nin üzerinde olan Karakoç Kaplıcası, Kaynarca Kaplıcası, Nebiler Kaplıcası, Alangüllü Kaplıcası, Çamköy Çamur Ilıcası ve Aydın Germencik Ömerbeyli Jeotermal sahasından termofilik bakterilerin izole edilmesi ve daha önce üzerinde çalışma yapılmamış olan bu kaplıcalardan yeni termofilik suş ve/veya türlerin elde edilip sistematığe kazandırılmasıdır. Bu çalışmada ayrıca, İzmir Kaynarca kaplıcasından izole edilen ve dünya literatürüne yeni tür olarak kazandırılan *Anoxybacillus kaynarcensis* D1021^T'de glukoz izomeraz aktivitesi belirlendi ve *A. kaynarcensis* D1021^T'e ait glukoz izomeraz (GI) enzimini kodlayan genin klonlanması, enzimin biyokimyasal özelliklerinin ve kinetik parametrelerinin belirlenmesine çalışıldı.

1.2. Termofilik Bakteriler ve Habitatları

Dünya üzerinde yaşayan canlılara bakıldığında bunların üç ana grup altında toplandığı görülmektedir. Bunlar, ökaryotlar, bakteriler ve arkeolardır (Trent, 2000). Bakteriler dünya üzerinde çok geniş bir yayılım göstermektedir ve üreyebildikleri en uygun sıcaklıklılara göre üç grup altında toplanırlar. Sakrofiller, -10°C'ye kadar olan düşük sıcaklıklarda büyüeyebilen fakat optimum büyüme sıcaklığı 15°C veya daha düşük sıcaklıklar olan bakterileri içermektedir. Mezofiller normal ortam sıcaklıklarında (15-50°C) büyüeyebilirler ve insan sağlığı açısından patojen olan bakterileri içermektedirler. Termofiller ise genel olarak 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabilen, hatta bazı türlerinin ise 100°C' nin üzerindeki sıcaklıklarda bile yaşayabildiği bakteri grubudur.

Optimum büyüme sıcaklıkları 50-105°C arasında olan pek çok termofilik bakteri türü tanımlanmıştır. Bu bakteriler yüksek sıcaklıklarda yaşayabildikleri için, bunlar aşırı termofiller ve çok aşırı termofiller olarak adlandırılmaktadırlar. Termofiller ve aşırı termofiller yüksek sıcaklıklarda yalnızca hayatta kalmazlar, ayrıca onların büyümeleri ve çoğalabilmeleri için bu yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyarlar. Termofillerin optimum büyüme sıcaklığı 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklarken, aşırı termofillerin optimum büyüme sıcaklığı 80°C'nin üzerindedir. Ayrıca aşırı termofiller genellikle 60°C'nin altındaki sıcaklıklarda büyüyemezler.

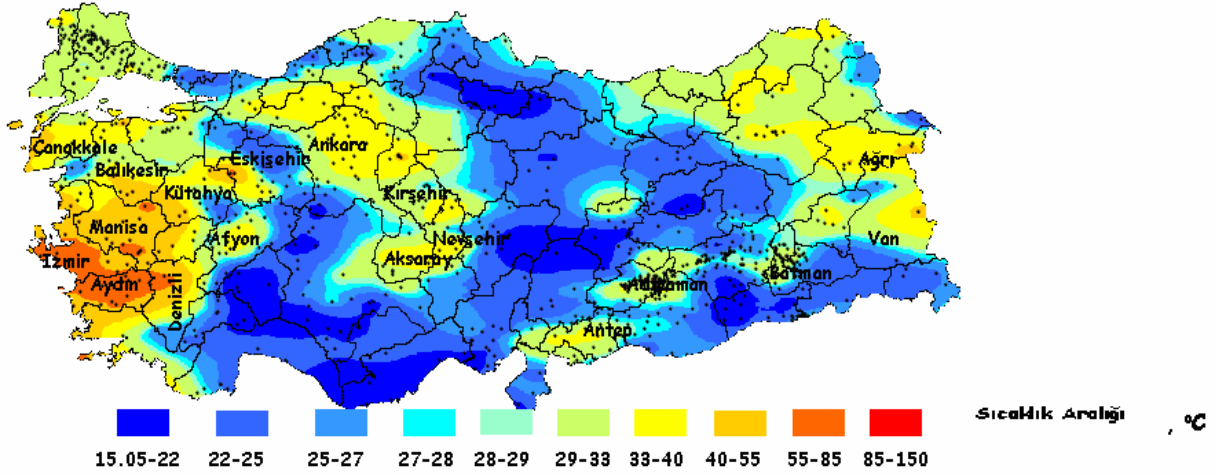
Termofilik bakterilerin doğal yaşam alanları, dünya üzerinde çok geniş yayılım gösterir. En yaygın ve erişilebilir alanları, termal alanlar, kaplıcalar ve jeotermal sıcak

topraklardır. Termofiller, ayrıca derin kara ve okyanus dipleri gibi daha az ulaşılabilir jeotermal alanlarda da bulunurlar (Takami vd., 1997).

Yer altı kaynakları, volkanik özellik taşımayan soğuk alanlar ile sıcak olan volkanik alanlar diye ikiye ayrılırlar. Volkanik özellik taşımayan alanlarda sıcaklık, derinliğin her kilometresinde 25°C yükselir, bu yüzden termofilik organizmalar derin yer altı alanlarında üreyebilmektedirler (Marteinsson vd., 2001). Pek çok termofilik bakteri, kıtasal ve deniz diplerindeki petrol kaynaklarından (Greene vd., 1997), ve ayrıca sıcaklığı 113°C'yi geçmeyen derinlerde bulunan diğer kaynaklardan izole edilmiştir (Pedersen, 2000). Volkanik alanlarda ise, yerkabuğunun çeşitli derinliklerinde olağandışı birikmiş ısının oluşturduğu bir termal enerji mevcuttur. Bu termal enerji bazen yeryüzünde kaplıcalar olarak görülebilirken, bazen de volkanik patlamalar şeklinde görülebilir. Volkanik alanlarda, bu ısı yeryüzüne doğal olarak sıcak su kaynağı veya lav şeklinde ulaşabildiği gibi, sondajlarla sıcak su, sıcağısız-buhar ve buhar şeklinde de ulaşmaktadır.

Termofillerin en fazla çalışılan doğal yaşam alanları kaplıcalardır (Hugenholtz vd., 1998). Nötral pH'lı kaplıcalar, asidik ve kükürtlü kaplıcalar, demirce zengin kaplıcalar gibi çeşitli özelliklerde kaplıcalar bulunmaktadır. Kaplıca sularının sıcaklıkları genellikle 50-130°C'dir ve yeryüzüne sıcak halde çıkan bu sular geçtikleri alanlardaki bazı mineralleri çözerek mineral maddelerce zengin duruma gelirler. Bu suların çoğı, hidrojen, kükürt, karbondioksit, düşük moleküler ağırlıktaki organik karbon bileşikleri, metan, amonyak ve eser elementlerce zengin oldukları bilinmektedir. Bu sulardaki klor ve bikarbonat iyonları genellikle baskın olan anyonlardır. Termal suların tam muhteviyatları, suyun yeryüzüne çıkması sırasında içinden geçtiğı kayalara ve suyun sıcaklığına göre değişmektedir.

Ülkemiz coğrafi yapısı gereğı deprem kuşağında yer almakta olup, buna bağılı olarak da sıcak su kaynakları bakımından oldukça zengindir. Jeotermal kaynaklar açısından oldukça zengin olan ülkemizde, MTA 1996 ve MTA 2005 envanterleri değerlendirildiğinde, ülke genelinde resmi kayıtlara alınmış 277 alanda jeotermal etkinliğin olduğu görölmektedir. Türkiye'nin 500 m derinlikteki yer altı sıcaklıklarını gösteren, yer altı sıcaklık dağılım haritası incelendiğinde, ülkenin batı bölgesinin diğer bölgelere göre daha yüksek sıcaklıklar sergilediğı görölmektedir (Şekil 1). Özellikle de Ege bölgesinde, İzmir, Aydın ve nispeten Denizli ve Manisa illerinin yüksek sıcaklık gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 1. Türkiye'nin 500 m derinlikteki yer altı sıcaklıkları

Doğal oluşan termal alanlar dışında, birçok insan yapımı sabit sıcak çevreler de yeryüzünde oluşturulmuştur. Sıcak su boru hatları, ev ve fabrikalardaki ısı değiştiriciler, yanan kömür refüz boruları ve termofilik atık arıtım tesisleri, güneş enerjisiyle ısıtılan havuz ve topraklar, biyolojik kompost, saman, çöp ve gübre yığınları bunlara örnek verilebilir. Çok sayıda iyi bilinen termofilik mikroorganizma, bu tür insan yapımı sıcak su kaynaklarından izole edilmiştir (Sarigül, 2007).

Termofilik bakteriler ilk olarak 1879 yılında Miquel tarafından topraktan, çöplerden, dışkı ve pisliklerden, kanalizasyon ve nehir çamurlarından izole edilmiştirler. İzole edilen bu termofilik bakteriler, 72°C'de büyüebilmekteydiler (Miquel, 1888). Termofilik bakterilerin büyüüp çoğalabilmeleri için yüksek sıcaklıklara ihtiyaçları vardır, yani termofiller yüksek sıcaklıklarda iyi bir şekilde bölünüp çoğalabilirken, oda sıcaklığında çok zayıf veya üreyemezler.

Yüksek sıcaklıklardaki büyümeyle ilgili yapılan son zamanlardaki araştırmalarda, sıcaklığı yaklaşık 115°C olan kaynak sularından aşırı termofilik bakteriler izole edilmiştir. Bunlardan bazıları *Pyrodictum* ve *Pyrolobus* cinsine ait bakterilerdir ki, bu bakterilerin optimum büyüme sıcaklıkları 100°C'nin üzerindedir. Ayrıca, sıcaklığı 110°C olan petrol alanlarından da aşırı termofilik bakteriler izole edilmiştir (Wharton, 2002).

Volkanik alanlarda sıcaklığı 125-140°C olan aşırı sıcak sularda büyümenin olduğu bildirildiği için, daha yüksek sıcaklıklarda büyüeyebilen bakterilerin izole edilmesi

mümkündür (Cavicchioli, 2002). Bu nedenle, bakteriyal yaşam için sıcaklık sınırının 150°C'ye kadar çıkabileceği düşünülmektedir.

1.3. Termofililiğin Moleküler Temelleri

Yüksek sıcaklıklarda büyümeyi sınırlayan faktörlerin ne olduğu veya büyümenin üst sıcaklığının ne olduğu, halen açıklanamamaktadır. Ancak, termofilik bakteriler yüksek sıcaklıklarda hücre ve moleküllerinin fonksiyonel halde kalmasına izin verecek çeşitli adaptasyonlara sahiptirler. Bu adaptasyonlar şu şekilde sıralanabilir.

1) DNA yapısı: Lineer çift zincirli DNA 65°C'de termal denatürasyona uğrarken süpersarmal plazmitlerin en az 107°C'ye kadar termal denatürasyona dirençli olduğu görülmektedir. Plazmit DNA'sı topolojik olarak kapalı olduğu için termal denatürasyona karşı daha dirençlidir. Plazmit DNA'sı termal denatürasyona dirençli olmasına rağmen, termal degradasyona karşı dirençli değildir. Marguet ve Foreterre (1994) yapmış oldukları bir çalışmada, yüksek tuz konsantrasyonunun, çift zincirli DNA'yı 107°C'de termal degradasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. Tuzlar tarafından DNA'nın termal degradasyona karşı korunması, termofilik bakterilerin yaşamı ile ilgilidir. Çünkü termofilik bakteriler, hücre içi yüksek tuz konsantrasyonuna sahiptirler.

Reverse giraz (RG) enzimi, bütün hipertermofillerde, bazı termofilik bakterilerde ve arkeolarda bulunur. RG, pozitif süper sarmal DNA oluşmasını ve DNA'daki bağlantı sayısının artmasını sağlar (Duguet, 1995; Forterre vd., 1996). Bağlantı sayısındaki aşırılık, DNA'nın yüksek sıcaklıklarda fonksiyonel halde kalması için gereklidir. Mezofilik bakterilerin ve birçok canlının DNA'sı RG enzimini içermediği için, negatif süpersarmallık gösterirler. Bu yapı DNA'nın daha kolay denatüre olmasına sebep olur. Yani pozitif süper sarmal DNA, termal denatürasyona karşı negatif süpersarmal DNA'dan daha dirençlidir. Ayrıca DNA'ya bağlanan histon ve histon benzeri proteinler yüksek sıcaklıklarda DNA'nın çift zincirli yapıda kalmasında önemli rol oynarlar (Lopez-Garcia, 1999).

Önceleri, genomik DNA'nın yüksek G+C içeriğinin DNA'yı denatürasyona karşı koruduğuna inanılırdı. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalar, kromozomal DNA'nın G+C içeriği ile hipertermofillerin optimum büyüme sıcaklıkları arasında hiçbir bağlantının olmadığını göstermektedir (Marguet ve Foreterre, 1994).

2) Protein yapısı: Termal proteinler, mezofilik proteinlerin denatüre olduğu yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini korurlar ve kararlı halde kalırlar. Proteinin termal kararlılığı

hem bilim hem de endüstriyel alanlarda çok önemli olmasına rağmen, yıllardır yapılan deneysel ve teorik çalışmalar proteinin termal kararlılığını sadece kısmen açıklayabilmiştir (Vogt vd., 1997). Termofillerin ve mezofillerin homolog proteinlerinin tersiyer yapıları ve dizi analizlerinin karşılaştırılması, teorik çalışmaların temelini oluşturur. Protein yapısında mutasyonları meydana getiren protein mühendisliği ise deneysel analizlerin favori şeklidir ve kararlılığı artırır.

Querol ve arkadaşları (1996) yaptıkları bir çalışmada, proteinlerin termal kararlılığını arttıran en az 13 farklı fiziksel ve kimyasal faktörün olduğunu göstermiştir. Bu faktörlerden bazıları tuz köprülerinin optimizasyonu, daha kısa halkalar, halkalarda glisin miktarının azaltılması ve prolin miktarının artırılması, hidrojen bağları ve proteinlerin iç kısımlarındaki hidrofobik paketlemelerdir. Bu faktörler üzerine bir çok araştırmacı tarafından yapılan araştırmalar mevcuttur (Grupta, 1995; Querol vd., 1996; Vieille vd., 1996; Colacina ve Crichton, 1997; Vogt vd., 1997; Jaenicke ve Bohm, 1998; Scandurra vd., 1998).

Kumar ve arkadaşları (2000) yaptıkları bir çalışmada, mezofilik ve termofilik proteinler arasındaki sistematik farklılıkları araştırdılar. Yapılan bu çalışmada, hipertermofilik *Pyrococcus furiosus* ve mezofilik *Clostridium symbiosum* bakterilerindeki glutamat dehidrojenaz enzimi incelendi. Termofilik glutamat dehidrojenaz 168 tuz köprüsü içerirken, mezofilik glutamat dehidrojenazın ise 107 tuz köprüsü içerdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda termofilik proteinlerdeki tuz köprüsü sayısı, mezofilik proteinlere oranla yaklaşık % 70 daha fazladır. Tuz köprülerinin sayısı ile proteinin termal kararlılığı arasında kuvvetli bir korelasyon vardır. Bunun nedeni tuz köprüleri yüksek sıcaklıklarda daha karardır ve yüksek sıcaklıklardaki tuz köprülerini kırmak için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulur. Böylece tuz köprüleri yüksek sıcaklıklarda protein çözülmesine karşı kinetik kararlılık sağlar (Das ve Gerstein, 2000).

Haney ve arkadaşları (1999) yaptıkları bir çalışmada termofilik bir arkeo olan *Methanococcus jannaschii*'den izole edilen 115 adet termofilik protein ile, mezofilik *Methanococcus* türlerindeki bu 115 adet proteinin homoloğu olan proteinlerin sıralarını karşılaştırmıştır. Yaptıkları çalışma sonucunda proteinin termal kararlılığının oluşmasında, aminoasit değişimlerinin önemli bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır. Termofilik proteinlerin yüklü aminoasit (Arg, Lys, His, Asp ve Glu) içeriğinde, valin ve izolösin içeriğinde artış görülürken, yüklenmiş polar aminoasit (Ser, Thr, Gln, Asn, Cys) içeriğinde ve denatürasyona sebep olan asparagin ve glutamin içeriğinde azalma olduğu görülmüştür.

Bir proteinin hidrofobikliği, toplam polar olmayan yüzey alanı dışında kalan gömülü polar olmayan yüzey alanın fonksiyonu olarak hesaplanır (Tsai ve Nussinov, 1997). Hidrofobik etki, proteinin katlanmasında etkin bir güce sahiptir. Bu nedenle de termofilik proteinler mezofilik proteinlere göre daha büyük bir hidrofobik merkeze sahiptirler (Haney vd., 1997).

Termofilik proteinler mezofilik proteinler ile karşılaştırıldığında, bunların daha fazla halka delesyonuna maruz kaldığı görülür ve bu yüzden termofilik proteinler mezofilik proteinlerden daha kısadır. Halka delesyonu proteinin üç boyutlu yapısının entropisini düşürerek, serbest enerjisini artırır. Yani proteinlerdeki halka delesyonu protein kararlılığını artırır (Thompson ve Eisenberg, 1999). Aynı zamanda termofilik proteinler üç boyutlu yapısına katlanırken, daha küçük ve daha az sayıda oyuklar oluşturabilecek daha etkili bir paketlemeye sahiptirler (Russell vd., 1997, 1998).

Sıcak şok proteinlerinin bir türü olan şaperonlar, yüksek moleküler ağırlıklı kompleks proteinlerdir ve bunların görevi denatüre edilmiş proteinlere bağlanmak ve onların aktif formları içerisinde tekrar katlanmalarını sağlamaktır. Ayrıca, organik çözünenler de protein yüzey alanını azaltarak proteinin üç boyutlu yapısının korunmasını sağlar (Das ve Gerstein, 2000).

3) Hücre membran yapısı: Normal sıcaklıklarda yaşayan canlı organizmalar, lipid bilayer yapısında bir hücre membranına sahiptirler ve lipid bilayer membran yapısı ısıya karşı dirençli değildir. Hipertermofiller, yüksek sıcaklıklarda hayatta kalabilmeleri için lipid monolayer yapısında olan değişik bir membran yapısına sahiptirler. Bu hücre membranı, yüksek sıcaklıklarda erimeye karşı direnç gösterir. Ayrıca arkeolar, hücre membran yapılarında sıcaklığa ve degradesyona karşı dirençli olan eter lipitlerini içerirler (Daniel ve Cowan, 2000).

Termofilik organizmaların hücre membran proteinlerinin en önemli özelliği, daha etkili ve sıkı bir şekilde katlanabilen aminoasitlere daha yoğun bir şekilde sahip olmasıdır. Aspartik ve glutamik asitler içerdikleri amin gruplarından dolayı heliks yapısını kuvvetlendirirken, glisin ve serin kuvvetli hidrojen bağı yapma özelliklerinden dolayı proteinin daha iyi katlanmasını ve ısıya karşı daha yüksek bir direnç göstermesini sağlar (Senes vd., 2000; Zhou vd., 2001; Adamian ve Liang, 2002; Rinia vd., 2002)

Sıcaklık arttıkça sitoplazma membranının proton geçirgenliği artar. Artan proton geçirgenliği, yüksek sıcaklıklarda bakterilerin büyümesini engeller. Düşük proton geçirgenliği yüksek sıcaklıklarda büyüme için önemli bir etkidir. Bu nedenle termofilik

bakteriler, yüksek sıcaklıklarda taşıma sisteminde iyon olarak daha az geçirgen olan sodyum iyonunu kullanırlar (Tolner vd., 1997).

4) RNA yapısı: Galtier ve arkadaşları (1999) yapmış oldukları bir çalışmada, rRNA'nın GC içeriği ile optimum büyüme sıcaklıkları arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca baz modifikasyonları ve protein bağlanma bölgelerindeki değişmelerin RNA'ları kararlı hale getirdiği belirtilmektedir (Fang vd., 2001). Termofilik bir bakteri üzerinde yapılan bir çalışmada, transfer RNA geninin bir bazındaki tek bir atomun değişmesi yüzünden bakterinin ısıya karşı direnç özelliği kazandığı kaydedilmiştir (Watanabe vd., 1976). Yapılan bu çalışmada, *Thermus thermophilus*'un tRNA'sındaki timin-55 pozisyonundaki oksijen atomu yerine bir kükürt atomu sokulmuştur.

5) Küçük moleküller: Termofillerin sahip olması gereken diğer bir özellik ise, küçük moleküllerin karalılığıdır. GTP, translasyon, RNA sentezi ve diğer birçok işlem için gerekli olan bir moleküldür ve bu molekülün 100°C'deki yarılanma ömrü birkaç saniyedir. Ayrıca, ATP, UTP, NAD ve FAD gibi diğer birçok küçük molekülle de ısıya karşı dirençli değildir. Termofilik bakterilerde bu sorunun üstesinden gelmek için ihtiyaç duyulan moleküller kullanılacakları zaman sentezlenir (Çanakçı, 2003).

1.4. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı

Termofilik organizmalar, mikrobiyologlar ve biyokimyacılar için oldukça cezbedici bir konudur. Termofilik organizmaların hücre bileşenleri termal kararlı olduğu gibi, aşırı derecede asidik ve alkalik şartların denatürasyonlarına da dirençlidir (Haki ve Rakshit, 2003). Bu nedenle termofilik organizmalar biyoteknoloji açısından oldukça önem taşımaktadır. Biyoteknolojide termofilik organizmalar, bazı yakıt ve kimyasalların üretilmesinde ve genetik manipulasyonların yapılabilmesinde kullanılmasına rağmen, biyoteknoloji açısından en önemli özellikleri biyokimyasal reaksiyonları çok yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen termofilik enzimleri üretmeleridir.

Termofilik enzimlerin pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı gösterdiği kararlılık, bu enzimlerin endüstri alanlarında tercih edilme nedenleridir. Termofilik enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta bile kararlı ve aktiftirler. Bu yüksek sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini önemli derecede azaltır, çünkü biyolojik döngüde kontaminasyona sebep olan bakterilerin çoğu mezofiliktir (Burg, 2003). Ayrıca bu yüksek sıcaklıklarda,

reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve çözünürlükleri önemli derecede artar ve bu da daha fazla ürün oluşumunu sağlar (Mozhaev, 1993; Kumar ve Swati, 2001). Bu sıcaklıklarda suyun yüzey geriliminin ve vizkositesinin azalması, özellikle büyük fermentörlerde havalandırma için daha az enerjinin kullanılmasını sağlar.

Termofilik enzimler, belirtilen bu avantajlarından dolayı birçok endüstriyel alanda tercih edilmektedirler. Bununla birlikte bu enzimlerden bazıları, son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, amilazlar, ksilanazlar, kitinazlar, selülazlar, proteazlar, lipazlar ve gıda ve kimya endüstrilerinde DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir. Bu enzimler moleküler biyoloji alanında, nişasta endüstrisi, gıda endüstrisi, petrol endüstrisi, kimyasal endüstrisi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi gibi pek çok endüstri alanında geniş ölçüde kullanılmaktadır.

Moleküler çalışmaların temelini, PCR kullanımı oluşturmaktadır. DNA'yı arttırma kapasitesine sahip olan PCR yöntemiyle, genetik mühendisliğinde önemli bir ilerleme kaydedilmiştir. Bu yöntemde peş peşe gelen üç adım, 90-95°C'de DNA zincirlerinin denatürasyonu, 55-70°C'de renatürasyonu ve 75°C de sentez aşamasıdır (Saiki vd., 1988). Bu nedenle bu reaksiyonlarda kullanılan enzimlerin bu sıcaklıklara dayanıklı olması gerekmektedir.

PCR yönteminin kullanıldığı ilk zamanlarda, primer DNA zincirinin uzatılmasını katalizleyen DNA polimerazlar *E. coli*'den izole edilirdi. Bu enzimler yüksek sıcaklıklarda enzimatik aktivitelerini kaybettiklerinden her bir denatürasyon ve renatürasyon aşamasından sonra yeni bir polimeraz enziminin konulması gerekmekteydi. Bu nedenle de PCR, çok fazla zaman harcayan ve pahalı bir yöntemdi (Erlich vd., 1988). Termal kararlı polimerazların bulunmasıyla, PCR yöntemi oldukça kolaylaştı ve önemli ölçüde gelişti. İlk termal kararlı DNA polimeraz, termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan karakterize edildi (Chien vd., 1976). Daha sonra *Phyrococcus furiosus* ve *Thermococcus litoralis* bakterilerinin de DNA polimeraz enzimleri karakterize edildi. Bu mikorganizmalardan elde edilen DNA polimerazlar, 99°C'de bile aktivitelerinin önemli bir kısmını korumaktadırlar.

Taq DNA polimeraz enzimleri, PCR reaksiyonlarını katalizledikleri için dünya ticaretinde büyük paya sahiptirler. Bu reaksiyonlar, spesifik DNA sıralarını hızlı ve verimli bir şekilde arttırdığı için besin analizi, klinik tıp ve adli tıp alanlarında önemli araştırmalar

ve incelemeler yapılırken kullanılmaktadırlar. Ayrıca bu reaksiyonlar bugün biyoteknoloji ile ilgili birçok işlemin oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır (Aguilar, 1996).

Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi en hızlı büyüyen endüstrilerden biridir. Bu alanda, klorlu bileşiklerin yerine termal kararlı ksilanazların kullanımı artmaktadır. Kraft kâğıt hamurunun ağartılmasında çok fazla miktarda kullanılan klorlu bileşikler, toksik ve mutajenik olan sürekli biriken yan ürünleri oluşturur. Bu yan ürünler de çevresel kirliliğe ve biyolojik sistemlerde sorunlara sebep olur. Bu nedenle, günümüzde bu kimyasalların kullanımını en aza indirmek amacıyla, kâğıt endüstrisinde ksilanazlar kullanılmaktadır (Vikari vd., 1994; Eriksson ve Heitmann, 1998). Ksilanazlar kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisindeki kullanımlarından başka, zirai hayvan yemlerinin besin değerini arttırmakta, hasır ve keten gibi bitki elyafının zamkının giderilmesinde ve meyve sularının ağartılmasında kullanılmaktadır.

Dünya üzerinde en fazla miktarda bulunan ve yenilenebilir fosilsiz karbon kaynağı selülozdur. Selülozun hidrolizi için endoglukanazlar, ekzoglukanazlar ve β -glukosidazlar kullanılmaktadır. Endüstriyel işlemlerde, termal kararlı selülitik enzimler deterjanların yapısına katılarak yıkama sonucunda çamaşırların yumuşak ve daha parlak renkte olmasını sağlarlar. Ayrıca tekstil endüstrisinde, çöp ve atıkların işlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Bhat, 2000).

Lipazlara duyulan ilgi, endüstrideki uygulama alanlarından dolayı, özellikle son on yıldır oldukça artmıştır. Termal kararlı lipazlar, gıda endüstrisinde tat ve hoş koku bileşeni olarak, kozmetikte yağlayıcı madde ve katkı maddesi olarak, kâğıt endüstrisinde kâğıt hamurundaki zifti uzaklaştırıcı madde olarak kullanılır ve ayrıca süt endüstrisinde, ilaç endüstrisinde, deterjan endüstrisinde ve deri ve tekstil endüstrisinde de kullanılmaktadırlar.

Dünya enzim marketlerinin % 65'inden fazlasını teşkil eden proteazlar, endüstriyel açıdan önemli enzimlerdir (Rao vd., 1998). Bu enzimler geniş ölçüde gıda, ilaç, deri ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu enzimlerin ana kaynağı *Phyrococcus*, *Thermococcus*, *Bacillus* ve *Staphylococcus* cinslerine ait mikroorganizmalardır. Optimum olarak 75°C'de aktif hücre dışı bir proteaz, *Bacillus stearothermophilus* TP26 suşundan izole edilmektedir (Gey ve Under, 1995).

Nişasta endüstrisi, termofilik enzimlerin en geniş kullanıldığı alanlardan biridir. Endüstriyel nişasta işlemleri, nişastanın glukoz, maltoz veya oligosakkarit şuruplarına hidrolizini içerir. Nişastanın tam hidrolizi için pek çok enzim kullanılmaktadır. Bu enzimler, amilazlar, pullulanazlar, siklodekstrin glikoziltransferazlar, glukoamilazlar ve

glukoz izomerazlardır (Poonam ve Dalel, 1995). Bu enzimler veya bu enzimleri içeren şuruplar nişastanın işlenmesi yanında içecek endüstrisinde, ekmek yapımında ve peynir yapımı endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca tatlandırıcı üretiminde ve pek çok gıda ürününün koku, yapı ve görünüşünün değişime uğratılmasında da bu enzimler yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Nişasta endüstrisi, termofilik enzimlerin yıllık endüstriyel tüketiminin % 30'unu oluşturmaktadır (Van der Maarel vd., 2002).

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

Tablo 1. Termofilik bakterilerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar

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

1.5. Bakteri Sistematğinde Kullanılan Bazı Yöntemler

Son zamanlarda, prokaryot taksonomistleri güvenilebilir bir sınıflandırmanın, sadece sistematğin kabul edilmiş bir modeli olan “çok yönlü sistematik” teknikleriyle

yapılabileceğinde hemfikirdirler. Prensip olarak, çok yönlü sistematik bütün genotipik ve fenotipik bilgiyi birleştirmektedir. Genotipik bilgi, hücre yapısındaki nükleik asitlerden (DNA, RNA) elde edilirken, fenotipik bilgi ise organizmanın fiziksel ve biyokimyasal karakterlerinden ve genomdan ekspres edilen diğer özelliklerinden elde edilir. Genotipik ve fenotipik yöntemler kullanılarak, genotipik ve fenotipik bilgi mümkün olduğu kadar geniş ölçüde araştırılabilmektedir ve bu sayede de bakterilerin farklı sistematik seviyelerde sınıflandırılması ve karakterizasyonu yapılabilmektedir.

1.5.1. Genotipik Yöntemler

Bakteri sistematğinde kullanılan moleküler tekniklerin keşfinden önce, sınıflandırmada sadece organizmanın morfolojisi ve fizyolojisi gibi genotipin görülebilir ifadesi, yani fenotipik özellikleri kullanılmaktaydı. Fenotipik özellikler ise bakteri genomunun çok küçük bir dilimini ifade ederler ve çevre şartlarından direkt olarak etkilenirler. Bu nedenle de, fenotipik yöntemler bakterilerin filogenetik akrabalıklarının ortaya çıkarılmasında yeterli olmayabilirler (Sow vd., 2005). Teknolojik ilerlemeler sonucu, sistematik çalışmalarda genotipik yöntemlerin kullanılmaya başlanmasıyla sınıflandırmanın daha kesin ve doğru olarak yapılabilmesi sağlanmıştır. Çevresel değişimlerden etkilenmeyen ve evrimsel olarak yayılım gösteren genomik bilgiyi kullanan genotipik yöntemler, sistematik çalışmalarının temelini oluşturmaktadır (Vandamme vd., 1996).

Prokaryotik türlerin sınıflandırılması, sadece ilişkili sınıflar arasındaki genotipik farklılıkların ortaya çıkarılmasıyla yapılabilirken; ilişkili sınıflar, fenotipik özellikler ile veya ribozomal ribonükleik asit (rRNA) diziniyle tanımlanabilir (Gonzalez ve Saiz-Jimenez, 2005).

1.5.1.1. DNA Baz Kompozisyonu

Bir organizmanın DNA'sındaki genetik bilgi, dört nükleotid bazı adenin (A), timin (T), guanin (G) ve sitozin (C) tarafından şifrelenmektedir. DNA'nın çift zincirli yapısından dolayı, G/C ve A/T oranları genellikle sabittir. Ancak $(G+C) / (A+T)$ oranı ise genomdan genoma değişiklik gösterir (Johnson, 1985). Bir DNA molekülünün baz oranı, genellikle

G+C çiftinin bolluğu olarak tanımlanır ve çoğunlukla G+C içeriği diye adlandırılır. DNA baz oranı, G+C'nin yüzdesiyle hesaplanır; $\% \text{ G+C} : (\text{G+C}) / (\text{A+T+G+C}) \times 100$. Bu yöntem, prokaryotların sistematüğinde kullanılan ilk genotipik yöntemdir (Lee vd., 1956) ve bu yöntem ilk olarak fenotipik olarak benzer ve genotipik olarak farklı suşları birbirlerinden ayırmakta rutin olarak Goodfellow ve O'Donnell (1993) tarafından kullanıldı. Bugün, bu yöntem genellikle tür ve cinslerin ayrımı için kullanılmaktadır ve bakteri sistematüğünün standart tanımlamalarından birisidir.

Bakterilerin $\% \text{ G+C}$ içeriği $\% 24-76$ arasında değişmektedir (Torsvik vd., 1995). Bu oran tür için spesifiktir fakat seçici değildir, yani benzer G+C içeriğine sahip iki suş, aynı türe ait olabilirler veya olmayabilirler. Ancak, bu suşların G+C içerikleri $\% 5$ 'ten fazla farklılık gösteriyorsa bu suşlar aynı türün üyeleri olamazlar. Deneysel olarak, G+C içerikleri $\% 10$ 'dan fazla farklılık gösteren bakterilerin aynı cinse ait olmadıkları gösterilmiştir (Rossello-Mora ve Aman, 2001).

Bakteri genomunun G+C içeriğini belirlemek için birkaç farklı yöntem kullanılmaktadır; bunlar, termal denatürasyon yöntemi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), florimetrik boya bağlayıcı yöntemler ve buoyant yoğunluk yöntemleridir (Gonzalez ve Saiz-Jimenez, 2002). Yaygın olarak HPLC ve termal denatürasyon yöntemleri kullanılmaktadır. HPLC güvenilir bir teknik olmasına rağmen pahalı bir sistem gerektirmektedir. Bu nedenle genelde, termal denatürasyon yöntemi kullanılmaktadır ve bu yöntem DNA'nın termal denatürasyonu süresince absorbans ölçümlerine dayanmaktadır. Bu işlem sıcaklık ünitesine sahip spektrofotometreler ile yapılabilmektedir. DNA moleküllerinin erime sıcaklıkları ile $\% \text{ G+C}$ içerikleri arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Marmur ve Doty, 1962; De Ley vd., 1970).

1.5.1.2. DNA-DNA Hibridizasyonu

Bakteri türlerinin tanımlanması için çok fazla sayıda teknik geliştirilmesine rağmen, nükleik asit dizileri arasındaki benzerliği belirleyen DNA-DNA hibridizasyonu, bugün tür tanımlaması için "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Rossello-Mora ve Aman 2001; Zeigler, 2003). DNA'nın karakteristik özelliği, hibridizasyon veya yeniden birleşme özelliği göstermesidir. DNA denatüre edildiği zaman, uygun deneysel koşullar altında doğal çift zincirli yapılarını oluşturmak için yeniden birleşebilirler. Standardize edilmiş

koşullar altında; farklı bakterilerin DNA'ları, onların nükleotit sıralarının benzerliklerine göre birleşirler ve genellikle bu % benzerlik olarak ifade edilir.

DNA-DNA benzerliğini belirlemek için birkaç yöntem vardır ve bunların hepsi aynı prensibe dayanmaktadır. İki farklı bakteri DNA'sı karıştırılır ve ardından denatüre edilerek tek zincirli DNA moleküllerinin bir karışımını içeren solüsyon elde edilir. Kontrollü deney koşulları altında, DNA birleşmelerinin meydana gelmesiyle hibrit moleküller (heterodubleks DNA'lar) oluşturulur. Bu hibrit moleküllerin miktarı, iki farklı DNA arasındaki benzerlik derecesine bağlıdır, yani iki bakteri arasındaki genetik benzerlik ne kadar fazla ise, onlar o kadar fazla benzer nükleotit baz sırasına sahiptirler ve o kadar fazla hibrit oluşumu (hibridizasyon) meydana gelecektir. DNA'ların karışımı ile bu iki bakterinin ayrı ayrı saf DNA'ları (homodubleks DNA'lar) ile elde edilen sonuçlar arasındaki karşılaştırma, bu bakteriler arasındaki genomik benzerliğin derecesini vermektedir (Gonzalez ve Saiz-Jimenez, 2005).

Genomlar arasındaki akrabalık veya benzerlik derecesini ölçmek için esas olarak iki parametre kullanılmaktadır. Bunlar; nispi bağlanma oranı (RBR) ve denatürasyon sıcaklıkları arasındaki farklılıktır (ΔT_m). Bu iki parametre farklı özellikleri kullanmalarına rağmen, elde edilen sonuçlar birbirleriyle uyumludur ve bu sayede tür ayrımında bağımsız olarak ayrı ayrı kullanılabilirler (De Ley vd., 1970; Rossello-Mora ve Aman 2001). ΔT_m DNA çift zincirlerinin termal kararlılığını yansıtmakta olup homodubleks DNA T_m 'si ile heterodubleks DNA T_m arasındaki farkı ifade etmektedir. RBR ise homodubleks DNA'larla karşılaştırmalı olarak, heterodubleks DNA'ların miktarını yansıtmaktadır (homodubleks DNA'ların yeniden birleşme oranının % 100 olduğu düşünülmektedir). Her iki parametre değeri, dolaylı olarak pimer yapı seviyesinde genomik dizi benzerliğini yansıtmaktadır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993) ve bu yüzden de DNA'nın ayrılıp yeniden birleşmesine dayanan bu yaklaşımlar, birbirleriyle yakın ilişkili prokaryotlar arasındaki genotipik akrabalığın belirlenmesinde çok kullanışlı yöntemlerdir.

Tam olarak tanımlanmış prokaryotik türler ile birçok çalışmalar yapılmıştır ve bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak bakteriyal sistematik komitesi, bakteri türlerinin kesin ve doğru olarak tanımlanabilmesi için DNA-DNA hibridizasyonunun uygulanması gerektiğini vurgulamaktadır. Ayrıca bakteri türlerinin sınıflandırılmasında kullanılacak sınırlar da aynı türe ait bireyler için , % 70 veya daha fazla DNA-DNA benzerliği ve 5°C veya daha düşük ΔT_m değerleri olarak belirlenmiştir (Wayne vd., 1987).

1.5.1.3. Ribozomal RNA Analizi (rRNA)

Bakteri sistematğinde, DNA-DNA hibrizasyonu, tür tanımlaması için hala daha “altın standart” olarak kabul edilmesine rağmen, bu yöntem oldukça zahmetli, zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir. Bu zorluklarından dolayı, DNA-DNA hibridizasyonu, sadece birkaç laboratuarda yapılabilmektedir. Bunun için, moleküler analizlerde alternatif yöntemlerin arayışına gidilmiştir.

Son 25 yılda, ribozomal RNA (rRNA) veya rRNA’yı kodlayan genlerin (rDNA) analizini içeren pek çok teknik, prokaryotik sınıflandırmada kullanılmaktadır. Protein sentezi için gerekli olduğundan bütün organizmaların yapısında bulunan rRNA’lar yüksek derecede yapısal ve fonksiyonel olarak korunurlar (Olsen vd., 1986). Kısaca; rRNA’lar evrensel, değişmeyen, çevre şartlarından etkilenmeyen ve önemli ölçüde genetik bilgiyi içeren büyük moleküllerdir. Bu özelliklerinden dolayı rRNA’lar, bakterilerin filogenetik analizlerinde önemli derecede kullanılmaktadırlar (Maidak vd., 1996).

Prokaryotlarda, rRNA gen lokusları rRNA’nın unsurlarını kodlayan genleri içerir; 16S, 23S, 5S. Bazı istisnalar olmakla birlikte, bir RNA operonu içerisindeki rRNA genlerinin en yaygın dizilimi 16S-23S-5S sırasında olup, bu rRNA genleri bağlantı bölgeleriyle birbirinden ayrılırlar. Son zamanlarda geliştirilen PCR ve her bir rRNA genindeki korunmuş bölgelerin varlığının ortaya çıkarılmasıyla, bu genlerin ve genler arasındaki bölgelerin PCR çoğaltımı mümkün olmaktadır. Çoğaltılan bu bölgelerin uzunluğu ve nükleotid sırası, bakterilerin sistematğinde kullanılan önemli kriterlerdir (Nguimbi vd., 2003).

1.5.1.3.1. 16S rRNA’nın Tür Tayininde Kullanılması

16S rRNA geni, hem bütün organizmalarda bulunan yüksek oranda korunmuş 8 adet korunmuş değişmeyen bölgeye, hem de 9 adet benzersiz ve değişken bölgeye sahiptirler (Gray vd., 1984). Bu nedenle de 16S rRNA genleri, bakteriler arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemede yaygın şekilde kullanılırlar. Bu korunmuş bölgeler, primer çoğaltma teknikleri için geniş ölçüde uygulanabilir başlangıç bölgelerini sağlarken, benzersiz değişken bölgeler de bakteriler arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek için kullanılır. Korunmuş 16S rRNA sıralarını esas alan primerler kullanılarak, 16S rRNA’lar polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla arttırılmışlardır. PCR veya diğer bazı izolasyon

yöntemleri ile elde edilen 16S rRNA'nın baz dizi analizi, restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve hibridizasyon özellikleri kullanılarak türler arasında karşılaştırma yapılmaktadır. Fox ve arkadaşları (1992) yapmış oldukları bir çalışmada; 16S rRNA dizi analizleri % 97'den daha az benzerlik gösteren suşların, farklı türler olduğunu ortaya koydular.

Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar, 16S rRNA dizi analizinin bazı türlerin ayırımında, çok etkin bir kriter olmadığını göstermektedir. Tonjum ve arkadaşları (1998), yaptıkları bir çalışmada *Mycobacterium* cinsine ait iki farklı tür olan *Mycobacterium marinum* ve *Mycobacterium ulcerans*'ın 16S rRNA dizin analizlerinin % 99,8 benzerlik gösterdiğini ve yapılan DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda da bu iki bakterinin sadece % 37 oranında benzerlik gösterdiklerini ortaya koydular. Ayrıca Belduz ve arkadaşları (2003) yaptıkları bir çalışmada da, Balıkesir Gönen kaplıcasından izole ettikleri *Anoxybacillus* cinsine ait G2^T suşu ile *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T suşunu karşılaştırdılar. 16S rRNA analizi sonucunda; G2^T suşu, *A. flavithermus* DSM 2641^T'a % 98 benzerlik göstermesine rağmen, yapılan DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda bu iki bakteri arasındaki benzerliğin sadece % 53,4 olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında; 16S rRNA gen dizi analizinin, cinslerin ve birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilen türlerin ayırımında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, birbirlerine aşırı derecede benzeyen türlerin ayrılmasında kullanılamaz olduğu görülmektedir.

1.5.1.3.2. 16S rRNA'nın Çok Değişken (HV) Bölgesi

16S rRNA geninin (1,5 kb) tüm dizin analizinin, yakın ilişkili türlerin ayırımında yeterli olmadığı belirlenmiş, fakat cins seviyesini belirlemede kullanılacak ilk kriter olarak taksonomik çalışmalarda yerini almıştır. 16S rRNA geninin tüm sırası, türler arasında çok büyük korunmuşluk göstermesine karşın, 16S rRNA gen sırasının sadece belirli bir bölgesinin, asetik asit bakterilerini ve *Streptomyces* cinsine ait bakterilerin sınıflandırılması ve tanımlanmasında oldukça etkili olduğu belirlenmiştir (Yamada vd., 1997; Kataoka vd., 1997). Goto ve arkadaşları 2000 yılında, 16S rRNA geninin en çok bilgi verici yani en fazla farklılık gösteren bölgesini belirlemek için, 69 *Bacillus* türünün (tip suşların) 16S rRNA genlerinin tüm sıralarını analiz etmişler ve CLUSTAL W programını kullanarak karşılaştırma yapmışlardır. Karşılaştırma sonucunda, 16S rRNA geninin 5' uç kısmında yer alan bir bölgenin türler arasında yüksek değişkenlik gösterdiği belirlenmiş ve bu bölge

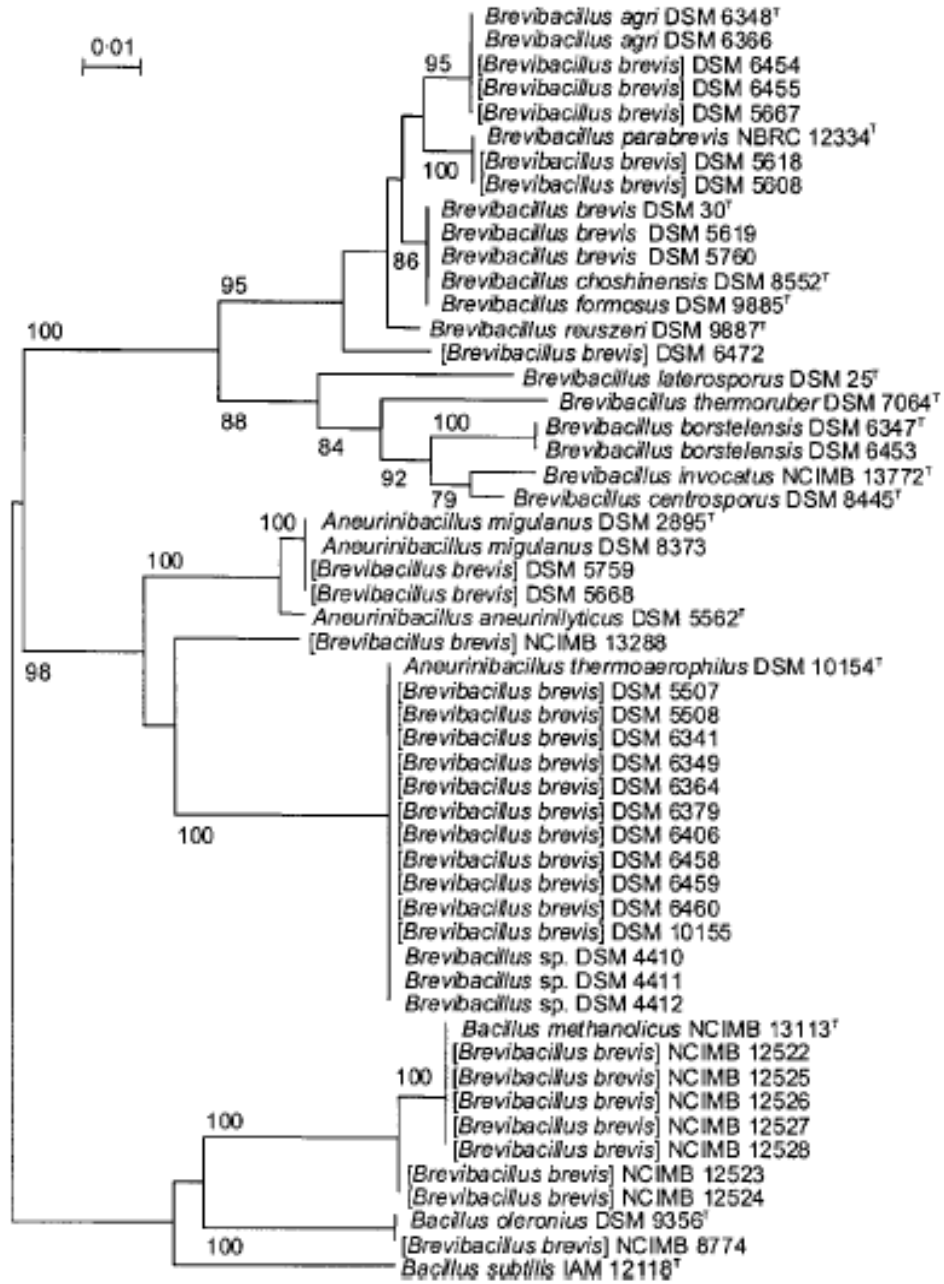
çok değişken bölge (HV) diye adlandırılmıştır. HV bölgesi, *Bacillus subtilis* 16S rRNA gen sırası referans alındığında, 70 ila 344 nolu nükleoitlerin arasındaki 275 bp'lik bölgeyi ifade etmektedir. Goto ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada, 69 *Bacillus* tip suşuna ait HV bölgelerinin, çoğunlukla % 90'dan daha az benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak da, HV bölgesinin *Bacillus* suşlarını tür seviyesinde tanımlamak için etkili olduğu belirtilmiştir.

Goto ve arkadaşları 2002 (a) yılında yaptıkları başka bir çalışmada, HV bölgesinin *Paenibacillus* cinsi içerisindeki ayırım gücünü belirlemeye çalıştılar. Bu amaçla, *Paenibacillus* cinsine ait 28 tip suş ve *Paenibacillus* türlerine ait 31 suşun HV bölgesi analiz edildi. Karşılaştırma sonucunda, bir türe ait suşun, üyesi olduğu türün tip suşuna % 100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Analizler sonucunda, *Paenibacillus* cinsinin çoğu üyesi için, HV bölgesinin bir tür içerisinde yüksek derecede korunmuş olduğu, bununla beraber *Paenibacillus* türlerini gruplandırabilecek ve tanımlayabilecek kadarda türler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Yine Goto ve arkadaşları 2002 (b) yılında yapmış oldukları iki ayrı çalışmada; HV bölgesinin *Alicyclobacillus* cinsi içerisinde tür seviyesinde ayırım gücüne sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, *Alicyclobacillus* cinsine ait 24 suşun HV bölgesi analiz edildi ve 16S rRNA geninin tüm sırasıyla karşılaştırıldı. HV bölgesinin tip suşlar arasında % 82,3-94,5 oranında benzerlik gösterdiği, 16S rRNA geninin tüm sırasının ise % 91,5-98,5 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. HV bölgesinin, tür içi korunmuşluğunu gözlemek için, 17 *Alicyclobacillus* suşunun HV bölgesi analiz edildi ve suşların, üyesi olduğu türlerin tip suşlarına % 99,1'den fazla benzerlik gösterdiği belirlendi (Goto vd., 2002 b). Goto ve arkadaşlarının 2002 (c) yılında yaptıkları üçüncü bir çalışmada, Japonya'daki çeşitli asidik çevrelerden *Alicyclobacillus* cinsine ait 60 suş izole edildi ve HV bölgeleri analiz edilip, tür seviyesinde sistematığı yapıldı. HV sonuçlarına göre yapılan sınıflandırma sonuçları, DNA-DNA hibridizasyon analiziyle de teyit edildi. HV bölgesi analiz sonuçlarının, DNA-DNA hibridizasyon analiz sonuçlarıyla örtüştüğü belirlendi (Goto vd., 2002c).

2004 yılında yine Goto ve arkadaşları, *Brevibacillus* türleri üzerine çalışma yapmışlardır. Aynı grup araştırmacıların bundan önceki çalışmalarında; HV bölgesinin, *Bacillus*, *Paenibacillus* ve *Alicyclobacillus* türlerinin gruplandırılması ve tanımlanması için elverişli bir markır olduğunu belirlemişlerdi. Bu çalışmada, HV bölgesinin *Brevibacillus* türlerinde ne kadar iyi korunduğunu belirlemek için, *Brevibacillus brevis* olarak

adlandırılan 29 suşun HV bölgesi analiz edildi ve bu 29 suşun kesin tür tayinleri DNA-DNA hibridizasyon analiziyle teyit edildi. 16S rRNA HV bölgesinin sıra analizi sonucunda, benzerlikleri dendogram olarak gösteren neighbour-joining ağacı çizildi (Şekil 2). Bu ağaç incelendiğinde, *Brevibacillus brevis* suşlarının, *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus parabrevis*, *Brevibacillus brevis*, *Brevibacillus borstelensis*, *Aneurinibacillus migulans*, *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, *Bacillus oleronius* ve *Bacillus methanolicus* olmak üzere 8 dalda kümelendiği görülmüştür. Sadece iki *Brevibacillus brevis* suşunun bu gruplardan ve birbirlerinden ayrı olarak, farklı iki dal oluşturdıkları belirlenmiştir. DNA-DNA hibridizasyon sonuçlarında, HV analizine göre farklılık gösteren bu iki *Brevibacillus brevis* suşunun, *Brevibacillus* ve *Aneurinibacillus* cinslerine ait birer yeni tür oldukları belirlendi. Ayrıca, 8 dalda kümelenen *Brevibacillus brevis* suşlarının, küme içerisinde % 100 benzerlik gösterdiği ve DNA-DNA hibridizasyon sonuçlarıyla da bu kümelenmenin doğruluğu teyit edildi. Bu sonuçlar, Goto ve arkadaşlarının daha önce yapmış oldukları sonuçlarla benzer olup, HV bölgesinin *Brevibacillus* ve *Aneurinibacillus* cinslerine ait aynı türlerin suşları içerisinde yüksek oranda benzerlik gösterdiği, bu cinslere ait türlerin gruplandırılması ve tanımlanmasını sağlayacak derecede de türler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 2. *Brevibacillus brevis* suşlarının HV bölgesi dizinleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç

1.5.1.3.3. 16S-23S rRNA Genleri Arasındaki “Spacer” Bölgeler

16S-23S rRNA genleri arasındaki “spacer” bölgesinin uzunluğu ve nükleotit sırası yakın ilişkili suşlar arasında bile önemli miktarda çeşitlilik gösterdiğinden, bakterileri tür ve suş seviyesinde ayırt etmek ve karakterize etmek için etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Gurtler ve Stanisich, 1996).

Bakteriyal kromozomda bulunan rRNA operonlarının sayısı 1-14 arasında değişmektedir ve 16S-23S rRNA genleri arasındaki “spacer” bölgesinin uzunluğu, türler ve suşlar arasında çeşitlilik gösterdiği gibi aynı hücredeki farklı operonlar arasında bile çeşitlilik göstermektedir (Young ve Cole, 1993; Condon vd., 1995). 16S-23S rRNA genleri arasındaki spacer bölgesi, tRNA genleri gibi birkaç fonksiyonel dizini ve ayrıca ribonukleaz III ve boxA sıraları gibi, enzimlerin tanınmasından sorumlu sıraları içerebilmektedir ve bu sayede de bu bölgenin uzunluğu oldukça çeşitlilik göstermektedir (Bram vd., 1980; Harvey vd., 1988; Gurtler ve Stanisich, 1996).

16S-23S rRNA genleri arasındaki “intergenik” transkribe edilen boşluk bölgelerinin (ITS) uzunluklarının belirlenmesi *Listeria*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Enterococcus* gibi bazı bakteri cinslerine ait bakterilerin tür ayrımında geçerli bir teknik olarak kullanılmaktadır (Jensen vd., 1993; Tyrrell vd., 1997). Fakat, bazı yakın ilişkili türlerde ITS uzunluğunun aynı olduğu ve bu nedenle de yakın ilişkili türlerin ayrımında ITS uzunluğunun geçerli olmayabileceği belirtilmiştir (Garcia-Martinez vd., 1999; Mora vd., 2003).

16S-23S rRNA genleri arasındaki spacer bölgesindeki dizin kompozisyonunun üç genel modeli vardır; tRNA^{Ile} ve tRNA^{Ala} dizinlerinin bulunması; tRNA dizinlerinin bulunmaması ve tRNA^{Ile}, tRNA^{Ala} ve tRNA^{Glu} dizinlerinden birinin bulunması. Yakın ilişkili türlerde, tRNA fonksiyonel dizinleri iyi bir şekilde korunurken, fonksiyonel olmayan dizinlerde ise sık sık insersiyon-delesyon olayları meydana gelmektedir ve bu sayede de fonksiyonel olmayan dizinler yakın ilişkili türler arasında bile yüksek derecede çeşitlilik göstermektedir (Nguimbi, vd., 2003). Ancak, bir bakteri kromozomunda birden fazla benzer olmayan rRNA operonunun bulunması, karışıklıklara neden olabileceği için, bakteri sınıflandırılmasında ITS baz dizilimi, bazı bakterilerin tür ve suş ayrımlarının yapılmasında başarıyla kullanılmasına rağmen (Willems vd., 2003; Conrads vd., 2005), bazı bakteri tür ve suşlarının ayrımında ise başarısız olduğu görülmektedir (Boyer vd., 2001; Song vd., 2004).

ITS baz dizi analizi yakın ilişkili türler arasındaki akrabalığı çoğunlukla doğru olarak yansıtmasına rağmen, yüksek ilişkili gruplar için ITS baz dilimindeki küçük farklılıklar DNA-DNA hibridizasyonu ile belirlenen tüm genom benzerliğini yansıtamamaktadır. Bu nedenle tür tayini çalışmalarında ITS dizi analizi, DNA-DNA hibridizasyonunun yerini alamaz. Ancak ITS dizi analizi ihtiyaç duyulan hibridizasyon deneylerinin sayısını önemli ölçüde azaltabilir (Willems vd., 2001).

1.5.1.4. Protein Kodlayan Genlerin Dizin Analizleri

16S rRNA gen dizinleri, evrimsel gelişim sürecinde çok yavaş değişimler gösterip, yüksek bir korunmuşluk gösterdiği için, yakın ilişkili olan farklı türlerde 16S rRNA gen dizinleri da büyük oranda benzerlik göstermektedir. Ayrıca, pek çok bakteri genomunda birden fazla ribozomal operonun bulunması, tür seviyesinde bu genlerin karşılaştırılma sonuçlarını da olumsuz yönde etkilemektedir. Bu kısıtlamalardan dolayı, yakın ilişkili türlerin ayırımında yetersiz kalan 16S rRNA dizin analizi, cins seviyesini tanımlamada kullanılan ana parametre olarak sistematikte kullanılmaktadır.

Bakteri sistematik otoriteleri, 16S rRNA gen dizin analizini, bakteri türlerinin tanımlanmasında uygulanması gereken ilk parametre olarak belirtmiş ve kesin tür tayininin yapılabilmesi için 16S rRNA gen dizin analizine ve altın standart olarak kabul edilen DNA-DNA hibridizasyonuna alternatif olarak protein kodlayan genlerin dizin analizini önermiştir.

Ancak, DNA-DNA hibridizasyon yöntemine alternatif olarak taksonomik çalışmalarda kullanılacak genlerin taşınması gereken bazı kriterler vardır (Zeigler, 2003). İlk olarak, sistematikte kullanılacak bu genler, yaygın olarak çoğu bakterinin genomunda bulunmalıdır. Gen ailelerinin varlığı, dizin analizini ve karşılaştırmayı zorlaştıracığından, taksonomide kullanılacak genin, çalışılacak genomda tek kopyalı olarak bulunması gerekmektedir. Gen dizini, filogenetik açıdan yeterli bilgiyi taşıyacak kadar uzun olmalı ve ekonomik açıdan, bir primer çifti kullanılarak dizin analizi yapılabilecek kadar da kısa olması aranan bir diğer özelliktir.

2002 yılında bakteri sistematik otoriteleri tarafından, protein kodlayan en az beş genin dizin analizinin, bir bakteri türünü yakın akrabalarından ayırmak için yeterli seviyede filogenetik verileri sağladığı sonucuna varılmıştır. Bu yöntem kullanılarak bir tür tanımlandığı zaman, kullanılan genlerden tek bir tanesinin dizin verileri, bu türe suşların ilave edilmesi için yeterli olacaktır (Stackebrandt vd., 2002).

Tüm genom yerine, genomun tüm özelliklerini yansıtacak olan genlerin karşılaştırılması ile bakteri sınıflandırılmasının kolay ve güvenilir bir biçimde yapılabileceği düşünülmüş ve bu amaçla pek çok farklı gen incelenmiştir.

1.5.1.4.1. *recN*

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

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

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

Zeigler (2005) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına göre; iki bakteri türünün *recN* gen dizileri arasındaki benzerlik % 84'den az ise, bakterilerin genomları arasındaki benzerliğin % 70'den az olduğundan % 95 emin olabiliriz ve buna göre bu bakteriler farklı türlere aittir. *recN* DNA dizileri arasındaki benzerlik % 96'dan fazla ise bakterilerin aynı türe ait olduğuna % 95 emin olabiliriz. *recN* dizileri arasındaki benzerlik % 84 ile % 96 arasında ise, genom arasındaki benzerliğin % 70'den az veya fazla olduğundan emin olamayız, bu nedenle bu bakterilerin benzerliği için kesin bir sonuca varılamaz.

Geobacillus cinsinin sistematğinde *recN* geninin kullanılabilirliği üzerine yaptığı çalışmada Zeigler (2005), bu genin cins içerisindeki tür ve alt türlerin yakınlık derecelerini yansıtmada son derece başarılı olduğunu görmüştür. Bununla beraber bu cinse ait bazı türlerin *recN* genlerinin tür ayrımında yeterli olmadığı görülmüştür. *G. kaustophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleoverans* farklı türler olmakla beraber *recN* genleri açısından birbirlerine % 96'dan fazla benzerlik göstermektedirler. Yine *G. lituanicus* ve *G. vulcani*'de kendi aralarında ve yukarıda adı geçen türlerle yüksek oranda benzerlik göstermektedirler.

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

Benzer bir çalışma Arahal ve arkadaşları (2008) tarafından *Leuconostocaceae* familyası üzerinde yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, *recN* geninin bu familya içerisinde yalnız başına olabileceği gibi 16S rRNA verileri ile birlikte de filogenetik bir markır ve tür tanımlanmasında kullanılabilecek bir araç olduğu saptanmıştır.

Glazunova ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada, *recN* dizin analizinin *Streptococcus* cinsinin sistematikte başarıyla kullanılabilirliğini gösterdiler. Yapılan bu çalışmada, *recN* gen dizin analizlerinin, 16S rRNA, *rpoB*, *sodA*, *roeL* and *gyrB* gen analizlerine göre çok daha iyi sonuçlar verdiğini ve *recN* dizin analizlerinin sadece türler arasında değil, suşlar arasında da ayrım yapabildiği belirlenmiştir.

1.5.1.4.2. *rpoB*

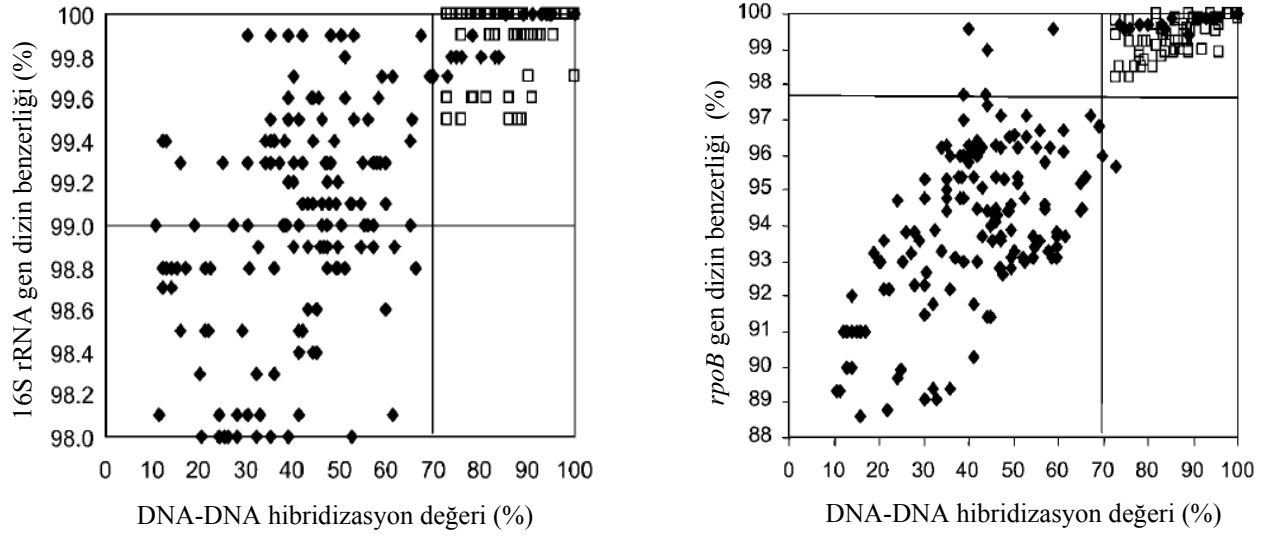
RNA polimerazlar, bir DNA veya RNA molekülündeki bilgiyi RNA molekülü olarak kopyalayan enzimlerdir. RNA polimeraz enzimleri, tüm canlılarda ve çoğu virüste bulunur. Bakterideki RNA polimerazlar beş alt birimden, ökaryot ve arkealardaki RNA polimerazlar ise en az 11 alt ünitelerden oluşurken; bakteriyofaj, mitokondri ve kloroplastlardaki RNA polimerazlar ise tek altbirimden oluşur. RNA polimeraz her grupta çok çeşitli alt ünite sayısına sahip olmasına rağmen, her gruptaki RNA polimeraz ortak bir protein ailesinden orjinlenmektedir (Rowland vd., 1993). Her gruptaki RNA polimerazların en büyük alt ünitelerinin (öbakterilerde β ve β' alt ünitelerine karşılık gelen) dizilerindeki korunmuşluk, bu genlerin evrimselliğini göstermektedir. β ve β' alt üniteleri üreten *rpoB* ve *rpoC* genleri, evrimsel süreçte ana orjin oldukları için, bu genlerin filogenetik

analizlerde son derece güçlü bir moleküler kronometre olabilecekleri belirtilmiştir (Morse vd., 1996).

rpoB gen uzunluğu, 3411 bp (*Staphylococcus aureus*) ile 4185 bp (*Neisseria meningitidis*) arasında değişiklik göstermektedir. İlk olarak, 1993 yılında Rowland ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, *Staphylococcus aureus* bakterisinin *rpoB* geni klonlandı ve dizin sırası ortaya çıkarıldı. Rowland ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptıkları bu çalışma, *rpoB* dizin analizinin taksonomik sınıflandırılmasında kullanılmasına öncülük etmiştir ve 1993 yılından beri, *rpoB* gen dizin analizi bakterilerin sınıflandırılmasında çok yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Mollet vd., 2000; Adekambi vd., 2008a).

Case ve arkadaşları 2007 yılında mikrobiyal ekoloji çalışmalarında, 16S rRNA ve *rpoB* genlerinin moleküler markırlar olarak kullanımlarını araştırmak üzere, NCBI Mikrobiyal Genom Veri Tabanı'ndan tüm genom dizin analizi yapılmış 111 bakteri genomu üzerinde çalışma yapmışlar. *Aquificae* (1), *Thermotogae* (1), *Deinococci* (1), *Cyanobacteria* (4), *Chlorobi* (1), *Alphaproteobacteria* (9), *Betaproteobacteria* (4), *Gammaproteobacteria* (29), *Epsilonproteobacteria* (4), *Bacillales* (11), *Lactobacillales* (12), *Clostridiales* (3), *Thermoanaerobacteriales* (1), *Mollivutes* (6), *Actinobacteria* (11), *Chlamydiae* (7), *Spirochaetes* (3), *Bacteroidetes* (1), *Fusobacteria* (1), *Planctomycetes* (1), taksonomik gruplarından parantez içerisinde belirtildiği sayıda genom dizileri çalışılmış ve bu tüm genom dizilerden 16S rRNA ve *rpoB* dizileri belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, 16S rRNA geninin çalışılan her genomda yaklaşık 4 kopyasının bulunduğunu, buna karşın *rpoB* geninin ise incelenilen her genomda tek kopya olarak bulunduğu belirlendi. Ayrıca bu çalışmada, *rpoB* geninin filogenetik analizlerde 16S rRNA genine göre oldukça daha fazla ayırım gücüne sahip olduğu ve sistematik çalışmalarında moleküler markır olarak kullanılabileceği, gösterilmiştir.

Adekambi ve arkadaşlarının 2008 (b) yılında yaptığı başka bir çalışmada, GenBank'ta mevcut olan 16S rRNA ve *rpoB* gen dizilerini, literatürde belirtilen DNA-DNA hibridizasyon analizi sonuçlarıyla karşılaştırarak, *rpoB* geninin DNA-DNA hibridizasyon yöntemine alternatif olarak taksonomik çalışmalarda kullanılabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada, 318 deney sonucu baz alınarak, DNA-DNA hibridizasyon değerleri, 16S rRNA ve *rpoB* gen dizin benzerlikleriyle karşılaştırılmıştır (Şekil 3). *rpoB* gen dizin benzerliğinin, bakteri tür tayininde 16S RNA gen dizin benzerliğine göre çok daha etkili olduğu gösterilmiştir.



Şekil 3. *rpoB* ve 16S rRNA gen dizin benzerliklerinin, DNA-DNA hibridizasyon değerleriyle karşılaştırılması

Ayrıca bu çalışmada, *rpoB* gen dizini ile DNA-DNA hibridizasyon değerleri arasında yüksek bir bağlantının olduğu belirlenmiş ve bu iki parametre arasındaki doğrusal ilişki, aşağıda belirtilen formül ile açıklanmıştır.

$$\text{DNA-DNA hibridizasyon değeri} = 5.98 (\text{rpoB benzerliği}) - 516,1$$

Yapılan bu çalışma sonucunda, *rpoB* gen dizin benzerliğinde % 97,7 ve yukarısının, tür tanımlanması için sınır olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. 16S rRNA gen dizin benzerliği $\geq$ % 99 ve DNA-DNA hibridizasyon değeri $\geq$ % 70 olan yakın ilişkili türlerin karşılaştırıldığı 85 çalışmanın 82'inde, *rpoB* dizin analizinin % 97,7 üzeri tür sınırı kullanılarak türler arası ayırım yapılabilmiştir. *rpoB* dizin benzerliği $\geq$ % 97,7 iken, DNA-DNA hibridizasyon değeri $\geq$ % 70 olan sadece üç çalışma belirlenmiştir (*Mycobacterium fortitium* X *Mycobacterium houstonense*; *Mycobacterium senegalense* X *Mycobacterium houstonense*; *Mycobacterium ulcerans* X *Mycobacterium marinum*). Bu üç çalışma kullanılan *Mycobacterium* türleri detaylı incelendiğinde, bu türler arasındaki tüm genom benzerliklerinin $\geq$ 98 olmasına rağmen DNA-DNA hibridizasyon değerlerinin $\geq$ % 59 olduğu görülmüştür. *Mycobacterium ulcerans* bakterisinin, 174 kb büyüklüğünde bir virüs plazmiti, iki bakteriyofaj ve IS2404'ün çok fazla kopyasını içermesi, DNA-DNA

hibridizasyon deęerindeki bu deęer dūřuklūęunū en azından kısmen açıklayabileceęi dūřūnūlmūřtur (Adekambi vd., 2008b; Adekambi ve Drancourt, 2004, Adekambi vd., 2003; Schinsky vd., 2004; Stinear vd., 2007; Yip vd., 2007).

Adekambi ve arkadaşları, 2008 (b) yılında yaptıkları bu çalıřmada sadece tūrlar arası *rpoB* gen dizin benzerlięini arařtırmamıřlar, ayrıca tūr içi *rpoB* gen dizin benzerliklerini de incelemiřlerdir. *Bacillales*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Lacyobacillales*, *Clostridia*, *Mollicutes*, *Actinobacteria*, *Chlamydia*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Deinococcus* řubelerine ait 44 cins içerisindeki 83 tūre ait 440 izolatın, *rpoB* gen dizin benzerlikleri incelenmiř ve tūr içi benzerliklerinin % 98,2–100 arasında deęiřtięi belirlenmiřtir.

rpoB geninin tūm dizin benzerlikleri, ayrıca *Geobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Acinetobacter*, *Pasteurellaceae*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* ve *Wolbachia* (Weng vd., 2009; Drancourt vd., 2004; La Scola vd., 2006; Korczak vd., 2004, Taillardat-Bisch vd., 2003) gibi daha pek çok cinsin tūr bazındaki sınıflandırılmasında kullanıldıęı belirlenmiřtir. *rpoB* geninin tūm dizin benzerlikleri, taksonomik çalıřmalarda tūr seviyesinde ayırım için molekūler markır olarak kullanılabildięi gibi, *rpoB* geninin belirli bōlgeleri de sistematikte molekūler markır olarak kullanılmaktadır. Kısmi *rpoB* gen dizinlerinin, tūm *rpoB* gen sırasına gōre, izolatlar arasında daha fazla oranda farklılık gōsterebildięi bazı çalıřmalarda belirlenmiřtir. *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Raoutalla* ve *Staphylococcus* cinsleri ūzerine yapılan çalıřmalarda, uzunluęu 300-600 bp arasında deęiřen kısmi *rpoB* dizin analizlerinde, incelenilen cinslerde tūr sınırının en az % 94-95 olduęu belirlenmiřtir (Khamis vd., 2003; Drancourt vd., 2001; Mellmann vd., 2006) . *Mycobacteria*, *Afipiai*, *Bosea* ve *Bartonella* cinsleriyle yapılan ū çalıřmada, uzunluęu 600-825 bp arasında deęiřen kısmi *rpoB* dizin dizileri analiz edilmiř ve tūr sınırının en az % 96-97 olması gerektięi belirlenmiřtir.

Mota ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları bir çalıřmada, azot fiske eden *Paenibacillus* cinsinin 8 tip tūrūnūn *rpoB* geninin 375 bp'lik dizin analizini yapmıřlar ve 16S rRNA gen dizinleriyle karřılařtırmıřlardır. Karřılařtırma sonucunda, 16S rRNA (1,5kb) gen dizinlerinin % 91,6-99,1 oranında benzerlik gōsterirken, 375 bp'lik *rpoB* gen dizinlerinin ise % 77,9-97,3 oranında benzerlik gōsterdięi belirlenmiřtir. Bu sonuçlar doęrultusunda, *Paenibacillus* cinsi içerisinde *rpoB* gen dizin analizlerinin, 16S rRNA gen dizin analizine gōre yaklařık 3 kat daha fazla ayırım gōcūne sahip olduęu gōsterilmiřtir.

Benzer bir çalışma, Meintains ve arkadaşları tarafından 2008 yılında *Geobacillus* cinsine ait tip türler kullanılarak yapılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda, Mota ve arkadaşları 2004 yılında *Paenibacillus* ile yaptığı çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde, *rpoB* geninin 375 bp'lik dizin analizinin, *Geobacillus* cinsi içerisinde, 16S rRNA gen analizine göre yaklaşık 3 kat daha fazla ayırım gücüne sahip olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Legionella*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Mycoplasma* cinsi gibi daha birçok cinsin sistematğinde, kısmi *rpoB* gen dizin analizinin kullanılabilirliği araştırılmıştır (Drancourt ve Raoult, 2002; Ko vd., 2002; Kim vd., 2003; Korczak vd., 2004; Korczak vd., 2006;). Bu çalışmalar sonucunda kısmi *rpoB* dizin analizinin; türler arasında büyük farklılık gösterdiği, aynı türe ait suşlar arasında büyük oranda korunduğu belirlenmiş ve bu sebeple taksonomik çalışmalarda moleküler markır olarak kullanılabilirliği ortaya konulmuştur.

1.5.1.5. DNA Parmak İzi Analizleri

DNA parmak izi analizlerine dayalı sınıflandırma metotları, genellikle tür içi farklılıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu metotlar sayesinde, fenotipik verileri destekleyici sonuçlar elde edilmektedir (Vandamme vd., 1996). Genomik DNA parmak izlerinin belirlenmesinde iki ana teknik kullanılmaktadır.

1.5.1.5.1. Genomik DNA'nın Restriksiyon Analizi

Genomik DNA, restriksiyon enzimleriyle kesilerek DNA parçalara ayrılır. Genel restriksiyon enzimleri 4-6 bazın oluşturduğu spesifik şifreleri tanırlar. Bakteri genomu çok büyük olduğu için, genel restriksiyon enzimleriyle kesilince farklı büyüklüklerde çok karmaşık DNA parçaları oluşur ve çoğu durumda bu parçaları analiz etmek oldukça zordur. Buna karşın, 6-8 bazın oluşturduğu spesifik şifreleri tanıyan ve DNA'yı düşük sıklıkta kesen seçici restriksiyon enzimlerinin kullanılmasıyla, DNA parçalarının sayısı azaltılabilir. Bu teknik düşük sıklıklı restriksiyon parça analizi (LFRFA) olarak adlandırılır. Bu DNA parçaları çok uzun oldukları için sıradan agaroz jel elektroforezleri ile ayrılamazlar ve bu yüzden 10-800 kb arası uzunluklarını ayırt edebilen "Pulse Field Gel Elektroforezi" kullanılmaktadır (Maslow vd., 1993; Vandamme vd., 1996). Oluşan

restriksiyon parçalarının sayısal analizi, tür içindeki benzerlik gruplarının tanınmasını sağlar. Bu teknik “Southern Blot” hibridizasyonu ile birlikte kullanılarak genomun büyüklüğü ve organizasyonu hakkında bilgi edinilebilir (Palleroni, 1993).

Alternatif olarak, Genomik DNA’nın genel restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan karmaşık DNA parçaları, membrana transfer edilir ve ardından işaretlenmiş bir proba hibridizasyon yapılır. Bu gelişmelerin en tipik örneklerinden biri, prob olarak rRNA’yı kullanan “ribotyping” metodudur (Grimont ve Grimont, 1991). Bu metot, aynı türe ait olan suşları ayırt etmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Register vd., 1997).

1.5.1.5.2. PCR’a Dayalı Yöntemler

Taksonomik çalışmalarda PCR’a dayalı tekniklerin kullanılması çok yaygındır. Son on yıla bakıldığında, PCR reaksiyonları sonucunda oluşturulan parmak izlerinin, bakterilerin genetik çeşitliliğinin ortaya çıkarılmasında ve tiplendirilmesinde sıkça kullanıldığı görülmektedir (Daffonchio vd., 1998).

1.5.1.5.2.1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) tekniği, ilk kez Williams ve arkadaşları (1990) tarafından insan DNA örneklerini incelemek için kullanıldı ve daha sonra da birçok araştırmacı bu tekniği bakterilerde çalışmıştır (Welsh ve McClelland, 1990). RAPD tekniği genomda rastgele bölgelerin PCR tekniği ile çoğaltılmasına dayanır. Standart PCR reaksiyonlarının aksine, bu yöntemde 9-10 bazlık, kısa rastgele dizayn edilmiş tek bir primer kullanılır. PCR reaksiyonlarının düşük bağlanma (annealing, renatürasyon) sıcaklığında, bu rastgele primerler benzerlik gösterdiği kromozomal DNA dizilerine bağlanarak bakteri genomunda rastgele bölgelerin çoğaltılmasını sağlar (Olive ve Bean, 1999). Bakteri genomundaki rastgele primer bölgelerinin yeri ve sayısı, aynı türün farklı suşlarında büyük oranda farklılık göstermektedir. Ayrıca kolay ve maliyetinin de düşük olması nedeniyle, RAPD tekniği, bakteri sistematğinde suş seviyesinde ayırım yapmak için kullanılan güçlü bir tekniktir (Waltenbury vd., 2005).

Vila ve arkadaşları (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, bakteri sistematğinde suş seviyesinde ayırım yapmak için kullanılan RAPD tekniği PCR’a dayalı DNA parmak

izi teknikleriyle karşılaştırdı ve RAPD'in, 16S rRNA genlerinin ve 16S-23S rRNA ara bölge segmenti RFLP analizlerinden daha fazla ayırt edici olduğunu, buna karşın rep-PCR kadar ayırt edici olmadığını belirledi.

Ronimus ve arkadaşları (1997) yaptıkları bir çalışmada, termofilik bakterilerin tür ayrımında bir RAPD primerinin kullanılabileceğini göstermişlerdir. Fakat bu metodun daha çok örnek üzerinde denenmesi ve aynı tür olduğu söylenebilecek kadar benzer bantlaşma gösteren örneklerin DNA-DNA hibridizasyonu ile teyit edilmesi gereken, henüz yaygın olarak kabul görmemiş bir metottur.

1.5.1.5.2.2. Tekrarlanan Dizilere Dayalı PCR (Rep-PCR)

Pek çok Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerinin genomlarında, yüksek oranda korunmuş, birçok kopyalı, tekrarlanan DNA dizileri bulunmaktadır. rep-PCR genomik DNA parmak izi analizi, bu dizilere göre tasarlanmış primerleri kullanarak tekrarlanan bu DNA dizilerini çoğaltıp, karşılaştırılmasını sağlar (Versalovic vd., 1991). Bu tekrarlanan DNA dizilerinin üç temel seti, bakteri sistematğinde önemli yer tutmaktadır. Tekrarlayan “ekstrajenik palindromik” (REP) dizileri, önerilen “gövde-halka” yapısında değişken bir halka içeren palindromik ünitelerdir. REP dizileri, altı dejenere nokta içeren 38 bp'lik dizi ile korunmuş palindromik bir gövdenin kenarları arasındaki 5 bp'lik değişken halkadan meydana gelir (Bruijn vd., 1996). Tekrarlanan DNA dizilerinin ikincisi, 124-127 bp'lik enterobakteriyal tekrarlanan “interjenik” korunmuş (ERIC) dizilerdir. Sonuncusu ise 154 bp'lik BOX elementleridir. BOX elementleri, boxA, boxB ve boxC olarak bilinen farklı alt ünite dizilerinin oluşturduğu çeşitli kombinasyonlardan meydana gelir. Bu üç alt ünite dizilerinin moleküler uzunlukları sırasıyla 59, 45 ve 50 bp'dir. Bu alt ünite dizilerinden yalnızca boxA'nın, farklı bakteriler arasında yüksek derecede korunduğu gösterilmiştir (Genersch ve Otten, 2003).

Bu tekrarlayan DNA dizileri, genomda farklı bölgelerde ve her iki oryantasyonda da bulunurlar. Bunların PCR'ı için, REP ve ERIC dizilerindeki ters çevrili tekrarlardan ve BOX elementinin boxA alt ünitesinden dışarıya doğru DNA sentezini başlatabilecek PCR primerleri dizayn edilir. Bu primerler kullanılarak yapılan PCR reaksiyonları ile REP, ERIC veya BOX dizileri arasına yerleşmiş farklı genomik bölgelerin uzatılması sağlanır ve bu protokol sırasıyla REP-PCR, ERIC-PCR ve BOX-PCR olarak adlandırılırken, müşterek olarak rep-PCR olarak adlandırılır. rep-PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen profillerin

karşılaştırılması ile aynı türe ait olan suşlar arasındaki farklılık ortaya çıkarılabilir. Rademaker ve arkadaşları (2000) yaptıkları hibridizasyon çalışmalarında, DNA-DNA benzerlik çalışmaları ile rep-PCR genomik DNA parmak izi analizi arasında yüksek bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir.

1.5.1.5.2.3. Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)

Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP), restriksiyon enzimleriyle kesilmiş DNA parçalarının bir altkümesinin PCR ile uzatılmasına dayanan bir genomik DNA parmak izi tekniğidir (Vos vd., 1995). AFLP'nin iki çeşidi tanımlanabilir. Bunların birinde iki farklı restriksiyon enzimi ve çoğaltma için iki primer kullanılırken, diğerinde tek bir primer ve restriksiyon enzimi kullanılır. En yaygın olarak kullanılan birinci tekniktir ve bu yöntemde bakteri genomik DNA'sı iki farklı restriksiyon enzimiyle kesilir ve oluşan restriksiyon parçaları spesifik adaptörlere bağlanır. Bu spesifik adaptörlerin yapısında, hem restriksiyon bölgesi hem de PCR primerlerinin bağlanacağı bölge bulunmaktadır. PCR primerleri, spesifik adaptörlere homolog DNA sırasını ve ayrıca 3' uçlarında 1-2 tane seçici baz içerirler. Bu sayede seçici primerler, genomik restriksiyon parçalarının sadece bir alt kümesinin çoğaltılmasını sağlarlar (Lin, 1996; Janssen vd., 1996). Artırılan bu fragmentlerin uzunluğu aynı türe ait suşlar arasında polimorfizm gösterdiği için, AFLP aynı türe ait suşlar arasındaki farklılığı belirlemek için kullanılmaktadır (Rademaker vd., 2000, Duim vd., 2001).

1.5.2. Fenotipik Yöntemler

Fenotip, genomun görülebilir ifadesi olarak tanımlanır ve fenotipik yöntemler DNA ve RNA'yı aydınlatmayan bütün yöntemleri kapsamaktadır. Bu yüzden, fenotipik yöntemler kemotaksonomik yöntemleri de içermektedir.

Genomik bilgiler, filogenetik ağacın oluşturulmasında ve sistemlerin sınıflandırılmasında büyük bir rol oynamasına rağmen, genotipik ve fenotipik özelliklerin uyumlu bir şekilde belirlenmesi daha faydalı bir sınıflandırma sisteminin oluşturulması için gereklidir (Vandamme vd., 1996). Fenotipik yöntemler temel olarak iki başlık altında incelenir.

1.5.2.1. Klasik Fenotipik Analizler

Klasik fenotipik analizler, pek çok mikrobiyoloji laboratuvarında bakteri sistematigi analizlerinde kullanılmaktadır. Bu analizler, tür ve alt türden cins ve familyaya kadar taksonların belirlenmesi için temel teşkil etmektedir (Rossello-Mora ve Aman, 2001). Bakterilerin klasik fenotipik karakterleri, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini içermektedir. Bireysel olarak düşünüldüğünde, bu özelliklerin çoğu genetik akrabalıkların ortaya çıkarılmasında yeterli değildir, ancak bunların hepsi birlikte bir taksonun tanımlanmasını sağlayan özelliklerdir.

Bir bakterinin morfolojik özellikleri, hem hücresel karakterleri (hücre şekli, spor, kamçı, Gram boyama) hem de koloniye ait karakterleri (renk, boyut ve şekil) içermektedir. Hücre şekli, bakterilerin tür tayininde ilk olarak ortaya çıkarılması gereken özelliktir ve hücre şeklinin belirlenmesi için basit boyama yapılır ve mikroskop altında incelenerek hücre şekli belirlenir (Benson, 1985). Bakterinin spor üretilip üretilmediği ve spor şekli, spor boyama yöntemi kullanılarak tespit edilir. Dr. Christian Gram tarafından geliştirilen bir yöntem olan Gram boyama ile de, bakterilerin Gram (+) veya Gram (-) hücre duvarı yapısı ortaya çıkarılır.

Bakteri sistematiginde kullanılan fizyolojik özelliklerin en önemlileri, bakterilerin büyüme sırasında ihtiyaç duydukları bazı fiziksel parametrelerdir. Sistematikte önemli kriterler olan fiziksel özellikler; bakterinin üreyebildiği sıcaklık aralığı, üreyebildiği optimum sıcaklık, üreyebildiği pH aralığı, üreyebildiği optimum pH, üreme sırasında oksijene ihtiyaç duyup duymadıklarıdır. Bakteri sistematiginde kullanılan biyokimyasal aktiviteler ise bakterilerin sahip oldukları hücre içi ve hücre dışı enzimler yardımı ile gösterdikleri bazı özelliklerdir. Bu enzimlerin yardımı ile bazı büyük molekülleri parçalama özellikleri (nişasta, kazein, jelatin), bazı karbonhidratları karbon kaynağı olarak kullanımları (çeşitli şekerler ile bazı diğer karbohidratlar), bu parçalanma ve kullanım sonucunda meydana gelen bazı son ürünler ile parçalama basamaklarında kullanılan bazı ara ürünlerin ortaya çıkarılması, bakteri sistematigi açısından önemli olan kriterlerden bazılarıdır (Çanakçı, 2003).

1.5.2.2. Kemotaksonomik Yöntemler

Kemotaksonomi terimi, hücrenin kimyasal içeriğiyle ilgili çeşitli bilgileri sağlayan analitik yöntemlerin bakteri sistematikteki uygulamalarını açıklamaktadır. Kemotaksonomi, genellikle modern bakteri sınıflandırmasının gelişiminde önemli rol oynayan etkenlerden biri olarak düşünülmektedir ve bu nedenle taksonomik incelemelerde genellikle ayrı bir ünite olarak incelenmektedir (Vandamme vd., 1996). Ancak, bu parametre doğrudan bir organizmanın genetik bilgisinin ifadesini yansıttığı için fenotipik özellik olarak kabul edilmelidir (Rosello-Mora ve Aman, 2001).

Kemotaksonomi lipidlerin, proteinlerin, amino asitlerin, şekerlerin ve spesifik kimyasalların fasıllı dağılımını incelemektedir ve bunlar sınıflandırma ve tanımlamada kullanılan faydalı özelliklerdir (Goodfellow vd., 1993). Bakteri sistematikte kullanılan kemotaksonomik yöntemler şu şekilde sıralanabilirler; bakterilerin lipid ve yağ asidi içeriğinin, toplam protein profilinin, sitokrom özelliklerinin, bazı immünolojik özelliklerin ve enzim karakterizasyonları ile fermentasyon ürünlerinin profilinin ortaya çıkarılması. Ayrıca, genelde Gram pozitif bakterilerin sınıflandırılmasında hücre duvarının içerdiği peptidoglikanın tipi ve teikoik asitlerin analizi önemli bir rol oynamaktadır (Schleifer ve Kandler, 1972; Suzuki vd., 1993). Diğer yandan, prokaryotik hücrelerde bulunan polikationik bileşiklerden oluşan poliaminler de sistematik açıdan önem arz etmektedir (Busse ve Auling, 1988).

1.5.2.2.1. Çözünabilir Protein Profili

Protein profilinin temel yaklaşımı, bakterilerin içerdiği proteinlerin izole edilmesi ve protein bantlarının yoğunluğunun ve yerlerinin karşılaştırılmasıdır. Bu proteinler, tüm hücre lizatı olarak elde edilirler ve daha sonra sodyum dedosil sülfat (SDS) deterjanıyla denatüre edilerek negatif yük ile yüklenirler. Bakteri hücre lizatındaki protein konsantrasyonu, standart bir proteinin kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenir. Aynı konsantrasyondaki farklı örneklerden alınan proteinler, dikey poliakrilamid jeline yüklenir ve poliakrilamid jel elektroforeziyle (PAGE) birbirlerinden ayrılırlar ve Coomassie Brilliant Blue ile boyanarak görünür hale getirilirler. Bu yöntemle sodium dedocyl sulfate-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) denilir ve bu yöntemle elde edilen her bir protein profili birbirleriyle karşılaştırılır (Kersters ve De Ley, 1975).

SDS-PAGE ile elde edilen tüm hücre protein profillerinin karşılaştırılması, birbiriyle yakın ilişkili suşların çoğunluğunu gruplandırmak ve karşılaştırmak için kullanılan oldukça güvenilir bir yöntemdir (Kerstens vd., 1994; Pot vd., 1994). Ferguson ve Lambe (1984) yaptıkları bir çalışmada *Campylobacter* türlerinin, tüm hücre protein profillerinin karşılaştırılması ile ayrılabilmesini göstermişlerdir. Bu protein bantlarının profili tamamiyle DNA-DNA hibridizasyon sonuçlarıyla ilişkilidir. Kersters ve De Ley (1975) yapmış oldukları bir çalışmada sıcaklık ve büyüme ortamının protein bant profilini etkilediğini göstermesine rağmen, Ferguson ve Lambe (1984) büyüme şartları değiştirildiğinde türe spesifik bantların değişmediğini göstermiştir.

Delamare ve arkadaşları (2002) yaptıkları bir çalışmada, protein profilini *Aeromonas* türlerini ayırt etmek için etkili bir yöntem olarak kullanılırken, düşük kalitatif değişiklikler yüzünden bu tekniğin aynı türe ait suşları karakterize etmek için etkili olmadığını göstermişlerdir.

1.5.2.2.2. Lipit ve Yağ Asidi Kompozisyonu

Bakteri hücrelerinde çeşitli lipitler bulunmaktadır. Bakteriyal membranların yapısındaki lipitlerin büyük bir kısmını polar lipitler oluşturur ve bu polar lipitler sınıflandırmada sıklıkla kullanılmaktadır. Diğer lipit tipleri (sphingophospholipids vs.) ise sadece belli bir grup bakteride bulunmaktadır ve bu gruplar içinde önemli olduğu görülmektedir (Jones ve Krieg, 1984). Lipitlerin büyük bir kısmını oluşturan yağ asitleri, sınıflandırmada yoğun şekilde kullanılmaktadır. Yağ asitlerinin 300'den fazla farklı kimyasal yapısı tanımlanmıştır ve ana zincirdeki, çift bağların pozisyonundaki ve ilave gruplardaki çeşitlilik bakterilerin sınıflandırılması için oldukça faydalıdır (Suzuki vd., 1993). İlk defa Abel ve arkadaşları (1963) tarafından gaz kromatografisi ile belirlenen yağ asitleri, aynı tür içindeki suşlar arasında ve aynı cins veya familya içindeki organizmalar arasında ayırım yapmak için taksonomik olarak kullanılmaktadır (Mosca vd., 1998). Bununla birlikte organizmanın yağ asiti içeriği, büyüme ortamının muhteviyatı, inkübasyon sıcaklığı ve kültürün yaşı gibi birçok etken tarafından etkilenmektedir (Johnson, 1989).

Yağ asiti metil esterlerinin analizi, kullanılan kültür şartlarını yüksek oranda standardize edilmesini sağlayan kararlı bir parametredir. Bu yöntem ucuz ve hızlı olup,

taksonomi ve teşhis çalışmalarının yapıldığı laboratuvarlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Vauterin vd., 2000).

1.6. *Anoxybacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Anoxybacillus cinsi Pikuta ve arkadaşları tarafından 2000 yılında *Bacillus* cinsinden ayrılıp bakteri sistematığıne kazandırılmış olan yeni bir cinstir. Bu cinsin tip türü *Anoxybacillus pushchionensis* K1^T’dir. İlk izole edildiğinde *Anoxybacillus pushchionensis* bakterisinin anaerob bir bakteri olduğu düşünüldüğünden, üremesi için oksijen gerektirmeyen anlamına gelen “anoksi” eki cins isminin başına ilave edilmiştir. Ancak *Anoxybacillus pushchionensis* bakterisi üzerinde yapılan düzeltme çalışmasında bu tip türün tam olarak oksijensiz ortamda değil, oksijenin var olduğu ortamlarda da yaşabileceği ortaya çıkarıldı ve *Anoxybacillus* cinsinin zorunlu anaerob özelliği aerotoleran veya fakültatif anaerobi olarak değiştirildi (Pikuta vd., 2003). Bu cinse ait bakteriler Gram pozitif, hareketli veya hareketsiz, endosporlu, alkalofilik veya alkolotolerant orta derecede termofilik özellikteki bakterileri içermektedir. Bu cinsin % G+C içeriği % 42-50 arasında değişmekte olup şu an sistematığı yapılmış olan 14 türü içermektedir.

Anoxybacillus cinsini, *Bacillus* cinsinden ayıran en önemli özellik 16S rRNA gen sıralarıdır. 16S rRNA gen dizin analizini temel alan çalışmalara göre, *Anoxybacillus* cinsi üyeleri ile *Bacillus* cinsi üyeleri arasında % 95’den daha az bir benzerlik vardır. Ancak *Anoxybacillus* cinsi kendi üyeleri arasındaki 16S rRNA gen benzerliği % 97’den daha fazladır. Bu yüzden 16S rRNA gen dizi analizi *Anoxybacillus* cinsine ait türlerin ayrımında yeterli değildir, sadece cins seviyesindeki sınıflandırmada önemli rol oynar.

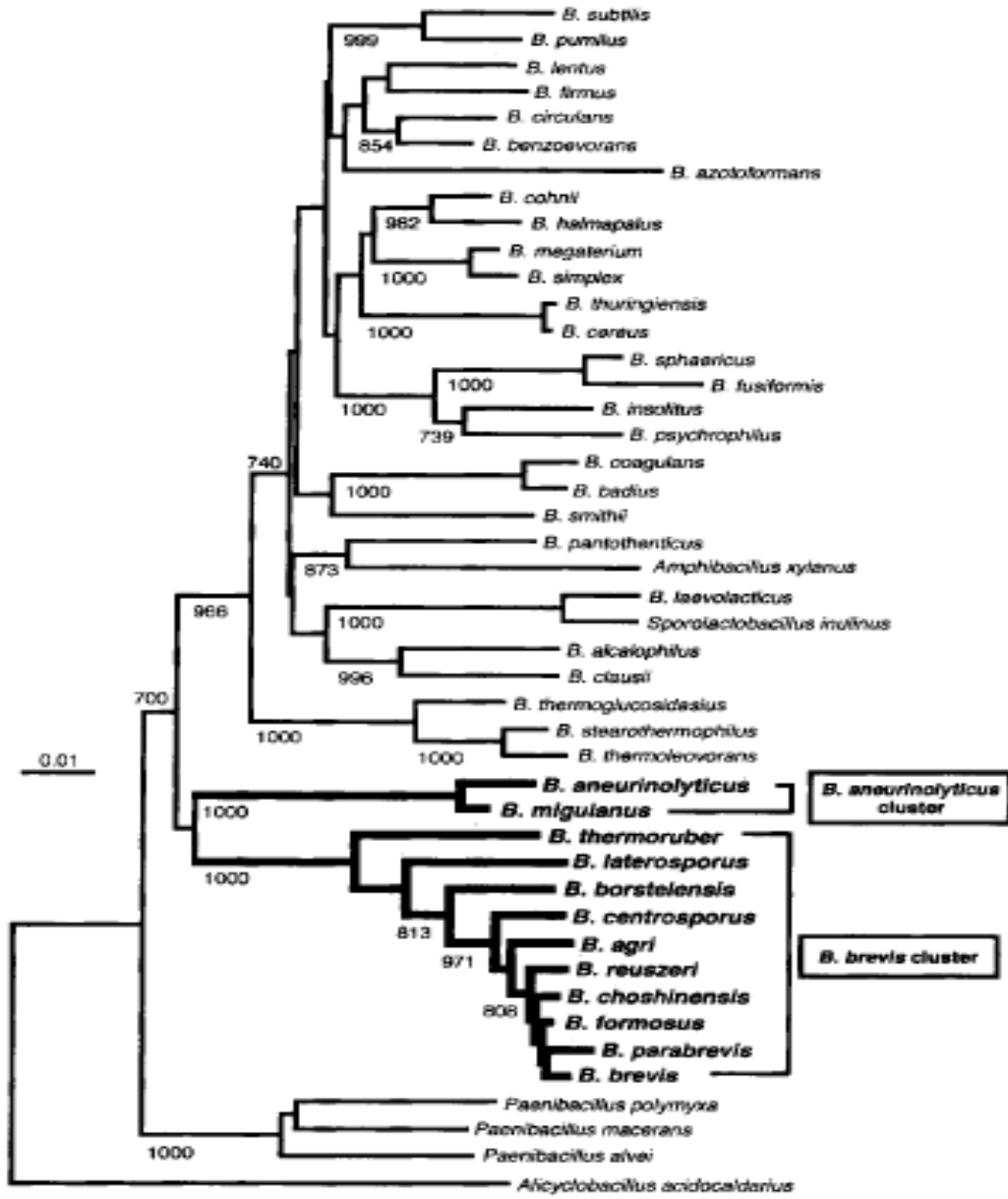
1.7. *Brevibacillus* ve *Aneurinibacillus* Cinslerinin Genel Özellikleri

Bacillus brevis ilk kez 1990 yılında Migula tarafından tanımlandı. 1990’lı yıllarda *Bacillus brevis* suşları üzerine yapılan detaylı taksonomik çalışmalar sonucunda (DNA-DNA hibridizasyonları), *Bacillus brevis* suşları, sekiz yeni *Bacillus* türü olarak yeniden adlandırıldı; *Bacillus agri*, *Bacillus centrosporus*, *Bacillus choshinensis*, *Bacillus parabrevis*, *Bacillus reuszeri*, *Bacillus formosus*, *Bacillus borstelensis* ve *Bacillus migulanus*. 1996 yılında Shida ve arkadaşları, *Bacillus brevis* suşlarının yeniden

sınıflandırılmasıyla oluşan bu 9 yeni *Bacillus* türünü ve bu türlerin yakın ilişkili olduğu diğer *Bacillus* türlerini ve diğer cinslerin türleri üzerine 16S rRNA dizin analizine dayalı genotipik çalışmalar yaptılar. Bu çalışmalar sonucunda, *Bacillus brevis* suşlarının yeniden adlandırılmasıyla oluşan 9 türden 8'inin, *Bacillus brevis*, *Bacillus thermoruber* ve *Bacillus laterosporus* ile aynı dalda yer aldığı belirlendi ve filogenetik ağacın bu dalı *Bacillus brevis* grubu olarak adlandırıldı (Şekil 4). *Bacillus migulanus*'ın ise *Bacillus aneurinolyticus* ile aynı dalda yer aldığı görüldü ve bu grub da *Bacillus aneurinolyticus* grubu olarak adlandırıldı.

Shida ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada, *Bacillus brevis* grubunda yer alan 10 türün birbirlerine % 93,2'den fazla benzerlik göstermesine rağmen, diğer *Bacillus* türlerine % 91,3'den daha az bir benzerlik gösterdiğini belirlediler. Aynı zamanda, yine bu çalışmada, *B. aneurinolyticus* grup üyelerinin birbirlerine % 98,6 benzerlik gösterirken; bu grubun, diğer *Bacillus* türlerine % 91,3'den az bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Shida ve ark., fenotipik karakterleri ve kemotaksonomik profilleri destekler niteliktedir. Elde ettikleri 16S rRNA dizin ve filogenetik verilerine dayanarak, *Bacillus brevis* grubu ve *Bacillus aneurinolyticus* grubunu iki yeni cins olarak tanımladı. *Bacillus brevis* grubu; *Brevibacillus* cinsi olarak adlandırıldı ve bu gruptaki 10 tür bu yeni cinse dâhil edilerek, *Brevibacillus brevis* bu cinsin tip türü olarak belirlendi. *Bacillus aneurinolyticus* grubu ise, *Aneurinibacillus* cinsi olarak tanımlandı ve bu gruptaki 2 tür bu yeni cinse dâhil edildi ve *Aneurinibacillus aneurinolyticus* tip türü olarak belirlendi.

Brevibacillus, kelime tabiriyle, kısa küçük çubuk anlamına gelmektedir. *Brevibacillus* cinsi, şu an sistematigi yapılmış 16 türü içermektedir. Bu cinsin üyeleri, Gram pozitif veya değişken, hücreleri çubuk şeklinde (0,7-0,9 µm, 3,0-5,0 µm), hareketli, elips şeklinde sporlara sahip, kolonileri düzgün, pürüzsüz ve sarımsı gri renktedir. Katalaz pozitif olup, başlıca kinonu, menakinon-7'dir. Bu cinsin % G+C içeriği, % 42,8-57,4 arasında değişmekte olup, başlıca yağ asitleri, iso-C_{15:0} ve anteiso-C_{15:0}'dir.



Şekil 4. *Bacillus* türlerinin 16S rRNA gen dizini analizi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç

Brevibacillus cinsinin pek çok türü, 16S rRNA gen dizini analizi açısından birbirlerine olan benzerlikleri % 97'den daha fazla benzer olduğu için, 16S rRNA gen dizini analizi *Brevibacillus* cinsine ait türlerin ayırımında yeterli değildir, sadece cins seviyesindeki sınıflandırmada önemli rol oynar.

Aneurinibacillus cinsinin tip türü olan *Aneurinibacillus aneurinolyticus* bakterisi, tiamini parçalama özelliğine sahip olduğundan, tiamin ile eş anlamlı olan “aneurin”

kelimesinden türevlenmiş “aneurini” eki cins isminin başına ilave edilmiştir. *Aneurinibacillus* cinsi, şu an sistematığı yapılmış 5 türü içermektedir. Bu cinsin üyeleri Gram pozitif olup, hücreleri çubuk şeklinde (0,7-0,9 µm, 3,0-5,0 µm), hareketli, elips şeklinde sporlara sahip, kolonileri düzgün, pürüzsüz ve sarımsı gri renktedir. Katalaz pozitif olup, başlıca kinonu, menakinon-7’dir ve tiamin hidrolaz tarafından tiamin parçalanır. Bu cinsin % G+C içeriği, % 41,1-43,4 arasında değişmekte olup, başlıca yağ asitleri, iso-C_{15:0} ve iso-C_{16:0}’dir (Shida vd., 1996).

Aneurinibacillus cinsinin kendi üyeleri arasındaki 16S rRNA gen benzerliği % 97’den daha fazla olduğu için, 16S rRNA gen dizi analizi *Aneurinibacillus* cinsine ait türlerin ayrımında yeterli değildir, sadece cins seviyesindeki sınıflandırmada önemli rol oynar.

Brevibacillus ve *Aneurinibacillus* cinslerine ait türler, geleneksel olarak tür tayininde kullanılan pek çok biyokimyasal testlerinde negatif sonuç veya çok zayıf reaksiyon verdiği için, bu cinslere ait türlerin kendi aralarında ayrımını yapmak oldukça zordur.

1.8. *Geobacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

1991 ve 1994 yıllarında, 16S rRNA dizin analizlerine göre, *Bacillus* cinsi, grup 1 ve grup 5 olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştı (Ash vd., 1991; Rainey vd., 1994). Grup 5, 16S rRNA dizinları (% 98,5-99,2) yüksek benzerlik gösteren, fenotipik ve filogenetik olarak birbirine çok benzer olan termofilik basillerden oluşan bir gruptu. Bu grup, *Bacillus stearothermophilus*, *B. thermovatenulatus*, *B. thermoleoverans*, *B. kaustophilus*, *B. thermoglucosidasius* ve *B. thermodenitrificans*’ı içeriyordu. Nazina ve arkadaşları 2001 yılında, farklı coğrafik alanlardan beş tane termofilik suş izole ettiler ve bu suşların 16S rRNA analiz verilerini, *Bacillaceae* familyasının üyeleriyle karşılaştırdılar. 16S rRNA analiz verilerininin karşılaştırılması, DNA-DNA benzerliklerinin, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi sonucunda, bu suşlardan ikisinin *Bacillus* cinsi Grup 5 içerisinde sınıflandırılan iki yeni tür olduğu belirlendi ve grup 5, *Bacillus* cinsinden ayrılarak *Geobacillus* adında yeni bir cins olarak sistematığe kazandırıldı.

Yeryüzü veya toprak basilleri anlamını ifade eden *Geobacillus* cinsi, şu an sistematığı yapılmış 16 türü içermektedir ve tip türü *Geobacillus stearothermophilus*’dur. Bu cinsin üyeleri Gram pozitif veya değişken, hücreleri çubuk şeklinde, hareketli, elips veya silindirik şeklinde terminal veya subterminal sporlara sahip, koloni morfolojisi ve

büyüklüğü değişkendir. Başlıca kinonu, menakinon-7'dir ve nötrofilik özelliktedirler. Bu cinsin % G+C içeriği, % 48,2-58 arasında değişmekte olup, başlıca yağ asitleri, iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0} ve iso-C_{17:0}'dir.

Geobacillus cinsinin kendi üyeleri arasındaki 16S rRNA gen benzerliği % 97'den daha fazla olduğu için, 16S rRNA gen dizi analizi *Geobacillus* cinsine ait türlerin ayırımında yeterli değildir, sadece cins seviyesindeki sınıflandırmada önemli rol oynar.

1.9. *Thermus* Cinsinin Genel Özellikleri

Brock ve Freeze'nin 1996 yılında, *Thermus aquaticus*'u keşfetmelerinden beri, termofilik araştırmalarının kayıtlarında hâkim olan bakteriler, *Thermus* cinsine ait bakterilerdir. Sıcak anlamına gelen “thermos” kelimesinden türetilerek isimlendirilen *Thermus* cinsi, şu an sistematigi yapılmış 10 türü içermektedir. *Thermus* cinsinin üyeleri, hem biyokimyasal hem de metabolik olarak oldukça benzerdirler.

Bu cinsin üyeleri, Gram negatif, endospor oluşturmeyen, sarı pigmentli, oksidaz pozitif, heterotrofik, hareketsiz, çubuk şeklinde, çoğu zorunlu aerobik, pH 6,0-10,5 aralığında, optimum nötr pH'da, ve 55-80°C aralığında, optimum 70°C'de gelişen, düşük konsantrasyonlu organik materyallerin bulunduğu ortamlarda çoğalabilen bakterilerdir.

1.10. *Proteobacteria* Şubesinin Genel Özellikleri

Proteobacteria, bakteri domainindeki en geniş ve en fazla çeşitlik gösteren ana gruptur. Bu gruba ait bakteriler, çok fazla metabolik çeşitlilik gösterirler ve tıbbi, endüstriyel ve tarımsal öneme sahip bilinen Gram negatif bakterilerin büyük çoğunluğunu temsil etmektedirler. Bakteri biçimlerinin çeşitliliğinden dolayı grup, ismini Yunan mitolojisinde yer alan, her şekle girebilen tanrı Proteus'tan almıştır.

Proteobacteria Gram negatif özelliklidir, dış zarları başlıca lipopolisakkaritlerden oluşur. Çoğu flagella ya da kayarak hareket ederken bazıları hareketsizdir. Çoğu fakültatif veya zorunlu anaerobik ve heterotrofiktir ama pek çok istisnası da mevcuttur.

Ribozomal RNA dizinleri arasındaki benzerliklere bağlı olarak *Proteobacteria* beş bölüme ayrılmışlardır, bunlar Yunan alfabesindeki alfa ile epsilon arasındaki harflerle adlandırılır. Bu bölümler genelde taksonomik sınıflar olarak değerlendirilir.

1.10.1. Alfaproteobacteria

Alfaproteobacteria enerji kaynağı olarak ışığı kullanan (fototrof) birçok cinsi içerir, ama bunlara ek olarak C1-bileşikleri metabolize edebilen cinsler, hayvan ve bitki simbiyotları ve tehlikeli bir patojen grubu olan *Rickettsiaceae*'yi da kapsar.

Chelatococcus cinsi, Auling ve arkadaşları (1993) tarafından sistematığe kazandırıldı. Bu cinsin tip türü olan *Chelatococcus asaccharovorans* kok şeklindeyken, 2008 yılında bu cinse katılan *Chelatococcus daeguensis* ise çubuk şeklindedir. Bu nedenle 2008 yılında cinsin tanımında bazı değişiklikler yapıldı. Bu cinsin üyeleri, kok veya çubuk şeklinde olabilir, Gram negatif, endospor oluşturmeyan bakterileri içermektedir. % G+C içeriği, % 63,3-68,3 arasında değişmekte olup, başlıca yağ asitleri, C_{18:1}w7c ve C_{19:0} cyclo w8c'dir.

1.10.2. Betaproteobacteria

Betaproteobacteria, yıkım yetenekleri bakımından zengin olan aerobik veya fakültatif anaerobik bakteri gruplarından oluşur, ama kemolitotrofik cinsler ve bazı fototrofları da içerir.

Schlegelella cinsi; Elbanna ve arkadaşları tarafından 2003 yılında, Betaproteobacteria'nın *Rubrivivax* altgrubuna ait yeni bir cins olarak sistematığe kazandırıldı. Bu cinsin tip türü, *Schlegella thermodepolymerans* DSM 15344^T olup, bu cinse ait, geçerli tanımı yapılmış 2 tür bulunmaktadır. Bu cinsin üyeleri Gram negatif, endospor oluşturmeyan, aerobik, çubuk şeklinde olan bakterilerdir. Oksidaz ve katalaz pozitif, sitrat, suksinat ve glukonat kullanımı pozitif ve başlıca yağ asitleri, C_{16:0}, cyclo-C_{17:0}'dir.

1.10.3. Gammaproteobacteria

Gammaproteobacteria arasında, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Xanthomonadaceae* ve *Pseudomonadaceae* gibi tıbben ve bilimsel olarak önemli sayılan gruplar bulunur. Çok fazla sayıda patojen bu gruba aittir.

Pseudoxanthomonas cinsi, Finkmann ve arkadaşları tarafından 2000 yılında sistematığe kazandırıldı. *Pseudoxanthomonas broegbernensis* bu cinsin tip türüdür. Bu cinsin üyeleri, Gram negatif, aerobik ve çubuk şeklinde olup, triptik soy agar ve nutrient agar üzerinde sarı renkli koloniler oluştururlar. Kinon tipi, Q-8 olup, başlıca yağ asitleri, iso-C_{15:0}, anteiso-C_{15:0}'dir

1.10.4. Deltaproteobacteria

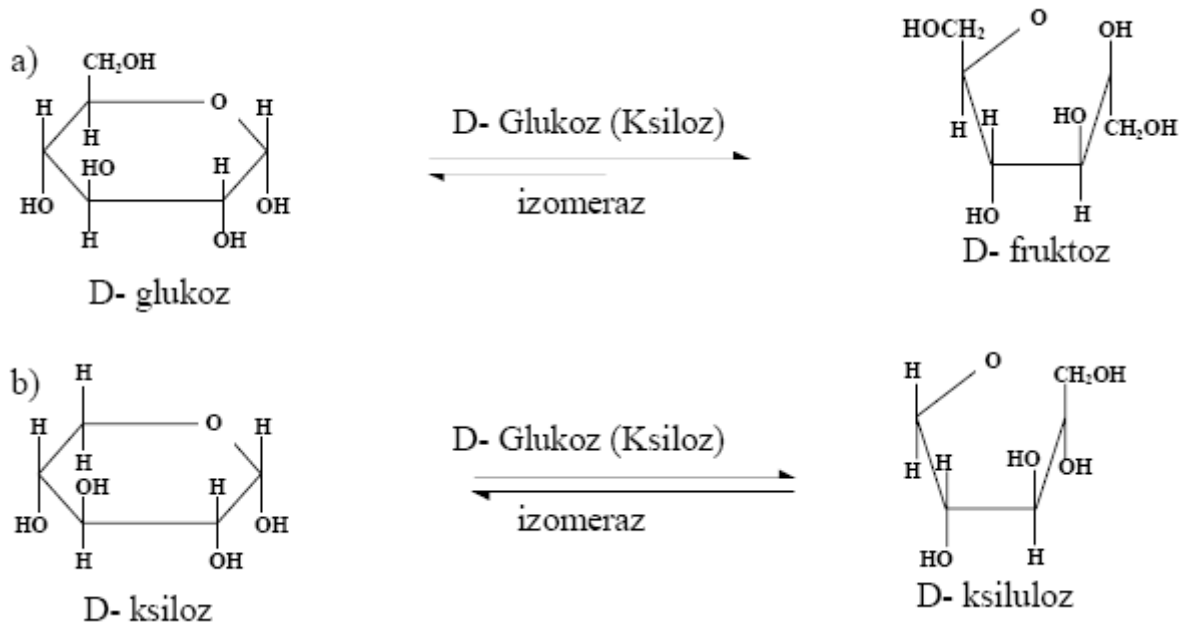
Deltaproteobacteria büyük oranda aerobik cinslerden, meyve gövdesi oluşturan mikrobakteriler ve zorunlu anaerobik cinslerin bir dalından oluşur. Bu gruba ait zorunlu anaeroblar arasında sülfat indirgeyici (*Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, v.s.) ve kükürt indirgeyici (örn., *Desulfuromonas*) bakteriler ile farklı fizyolojileri olan bazı başka anaerobik bakteriler (örn., demir-III indirgeyici *Geobacter* ve sintrofik *Pelobacter* ve *Syntrophus* türleri) bulunur.

1.10.5. Epsilonproteobacteria

Epsilonproteobacteria yalnızca birkaç cinsten oluşurlar. bunlar başlıca burgulu *Wolinella*, *Helicobacter* ve *Campylobacter* 'dir. Bunların hepsi insan ve hayvan sindirim sisteminde ya simbiyotik olarak (ineklerde *Wollinella*) ya da patojen olarak (midede *Helicobacter*, duodenumda *Campylobacter*) yaşarlar.

1.11. Glukoz İzomerazlar ve Biyoteknolojideki Önemi

D-glukoz / ksiloz izomeraz (D-ksiloz ketol izomeraz; EC 5.3.1.5) birçok mikroorganizma tarafından sentezlenen, izomeraz sınıfı, hücre içi bir enzimdir ve hem D-ksilozun D-ksiluloza hem de D-glukozun D-fruktoza dönüşümlü izomerizasyonunu katalizler (Bhosale vd., 1996) (Şekil 5).



Şekil 5. D-glukozun D-fruktoza, D-ksilozun da D-ksiluloza GI aracılığıyla dönüşümlü izomerizasyonu

Glukoz izomeraz, glukozun fruktoza izomerizasyonunu katalizlediği için endüstriyel alanda, özellikle HFCS (High Fructose Corn Syrup) üretiminde, ticari bir öneme sahiptir. Glukoz izomerazın keşfi, fruktoz şuruplarının endüstriyel uygulamalarda başarıyla kullanılmasını sağlamıştır. Ülkemizde ve AB mevzuatında fruktoz şuruplarının tanımı yer almamaktadır. FDA (2000)'e göre fruktoz şurupları; % 42 veya 55 fruktoz içeren tatlı, besleyici sakkarit karışımı olup, glukoz izomeraz enzimi kullanılarak mısır nişastası glukozunun fruktoza dönüştürülmesi ile elde edilen bir üründür.

Glukoz izomerazın keşfinden önce, yiyeceklerde tatlandırıcı madde olarak sakkaroz (sukroz) kullanılmaktaydı. Glukoz izomerazın keşfi ve özellikle 1958 yılındaki Küba devrimi sonrası meydana gelen sukroz yokluğu sebebiyle, fruktoz şuruplarının kullanımı hız kazanmıştır (Bhosale vd., 1996). Fruktoz şurupları, tatlandırıcı özelliklerinin yanı sıra gıdalarda lezzetin gelişmesinde de rol oynar. Fruktoz, sakkarozla göre dil üzerinde çok daha yoğun hissedildiği için; fruktoz şurupları gıdalarda lezzetin algılanmasını zenginleştirici etki olarak kullanılmaktadır (Howling, 1992). HFCS, sakkarozdan 1,3 ve glukozdan ise 1,7 kat daha tatlılık veren bir üründür. HFCS tatlandırma gücü temel alındığında, tatlandırma imal ücreti sakkarozunkine göre % 10–20 daha ucuzdur. Aynı zamanda HFCS sakkarozda olduğu gibi kristalleşme problemi meydana getirmez (Karaoğlu, 2010). Bu özelliklerinin sağladığı avantajların yanı sıra, fruktoz şuruplarının nemi tutarak kurumayı önlemeleri,

ozmotik basınçlarının yüksek olması ve fermente edilebilir şekerler açısından zengin olmaları gibi işlev özellikleri sayesinde fruktoz şurupları, sıklıkla gazlı ve gazsız içecekler, fırın ürünleri, çeşitli hububat ürünleri, süt mamulleri ve işlenmiş gıdalarda kullanılabilir (Wulff ve Helgeson, 1987).

Fruktoz şurupları su aktivitesini azaltıcı özelliğine sahiptir bu sayede salamura ürünlerde kullanılabilir. Ayrıca fruktoz şuruplarının sebze, çorba, domates sosları ve meyve gibi konserve ürünlerde de kullanımı yaygınlaşmaktadır (Hebeda, 1987; Nabors ve Gelardi, 1991; Anon, 1993). Fruktoz şuruplarının düşük viskozite özelliği, dondurma yapımında dondurmaya eriyebilirlik, pürüzsüzlük ve hacim kazandırmaktadır (Anon, 1979). Ayrıca fruktoz şurupları; ekmek, bisküvi, kek, kurabiye, tart dolguları ve jöle yapımında kullanılmaktadır (Pomeranz, 1985). Ekmekte fruktoz şurupları fermente edilebilir substrat olup, ekmeğin kabuk rengine ve lezzetine katkıda bulunmakta ve raf ömrünü uzatmaktadır (Kulp vd., 1991) İndirgen şekerler içerisinde en iyi bisküvi rengi fruktoz şurupları ile elde edilmiştir. Keklerde sakkaroz yerine fruktoz şurupları kullanımı içerdiği yüksek indirgen şekerler sebebiyle esmerleşmeyi arttırmakta ve kekin tazelik süresini uzatmaktadır (Johnson, 1989). Ayrıca fruktozun midede çok yavaş bir şekilde emilmesi ve kandaki glukoz seviyesine bir etki yapmaması sayesinde diyabetik bir tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Bhosale vd., 1996).

Glukozun ilk kez endüstriyel bir oranda enzimatik olarak izomerizasyonu 1957 yılında Amerika'da Clinton Corn Processing Co. tarafından başarılmıştır. 1974 yılında immobilize edilmiş glukoz izomeraz, ticari olarak elde edilebilir hale gelmiştir. İlerleyen yıllarda yiyecek endüstrisinde HFCS'ye olan talep her geçen gün artmış ve 1980'e kadar batı dünyasındaki tüm şekerlerle uğraşan büyük şirketler glukoz izomeraz teknolojisine başvurmaya başlamıştır. Bugün glukoz izomeraz, yiyecek endüstrisinde en büyük marketlerde yerini almıştır (Bhosale vd., 1996). Sahip olduğu endüstriyel önemden dolayı bugüne kadar birçok organizmanın glukoz izomeraz enzimi incelenmiştir (Suekane, 1978; Lee vd., 1989; Brown vd., 1993;) ve birçok bakterinin *xyIA* geni gen bankasındaki yerini almıştır (Collyer ve Blow, 1990; Dekker vd., 1991; Lee vd., 1993; Meadeu vd., 1994).

1.12. Glukoz İzomerazın Özellikleri

Çeşitli mikroorganizmalardan izole edilen GI'ların enzimatik ve biyokimyasal özellikleri yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Enzimin pH ve ısıl kararlılığı, substrat

spesifikliği, metal iyon gereksinimi gibi spesifik özellikleri hakkındaki bilgiler enzimin inhibe olmasını engellemek ve HFCS üretiminde ticari olarak uygulanabilirliğini değerlendirmek açısından önemlidir (Karaoğlu, 2010).

1.12.1. Substrat Seçiciliği

GI'nın pentoz, heksoz, şeker alkoller ve şeker fosfatları gibi geniş çeşitteki substratlarını izomerize etme yeteneği birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Farklı organizmalardan elde edilen enzimlerin substrat seçiciliği organizmadan organizmaya değişiklik göstermektedir. GI'nın en yaygın substratları D-ksiloz ve D-glukozdur. D-riboz, L-arabinoz, L-ramnoz, D-alloz ve 2-deoksiglukoz gibi şekerlerin de GI'nın birer substratı oldukları tespit edilmiştir. İster immobilize edilmiş olsun ister olmasın, çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen GI'nın katalizlediği D-glukozun D-fruktoza dönüşümü % 29 ile % 59 arasında değişkenlik göstermektedir (Bhosale vd., 1996).

1.12.2. Metal İyonu Gereksinimi ve İnhibitörler

GI maksimum aktivite için Co^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi bivalent katyonlara veya bunların kombinasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Co^{+2} ve Mg^{+2} aktivite için gerekli olmasına rağmen, her ikisi de farklı bir görevde rol oynarlar. Mg^{+2} , Co^{+2} 'ye nazaran daha etkin bir aktivatör iken, Co^{+2} istenilen konformasyonu sağlayarak (özellikle quarterner yapının sağlanmasında) enzimin kararlı hale gelmesinden sorumludur (Callens vd., 1988; Gaikwad vd., 1992). Kasumu ve arkadaşları her bir tetramer için 4 Co^{+2} 'nin varlığını tespit etmişlerdir (Kasumi vd., 1982). GI'nın katalitik aktivitesi; Ag^{+} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} ve belli bir oranda da Ca^{+2} ile inhibe olmaktadır. GI'nın bazı diğer inhibitörleri; ksilitol, arabitol, sorbitol, mannitol, lyksos ve Tris'dir (Smith vd., 1991).

1.12.3. Alt Ünite Yapısı

GI'nın sedimentasyon sabitleri 7,55 ile 11,45 arasında ve moleküler ağırlıkları da 52.000 ile 191.000 dalton arasında değişiklik göstermektedir. GI'nın alt ünite ve amino asit yapısına bakıldığında; molekül, birbirine benzer veya aynı 4 ya da 2 alt ünitelerden meydana

gelmektedir. Alt üniteler birbirlerine kovalent olmayan etkileşimlerle bağlıdır ve alt üniteler arasında disülfid bağları bulunmamaktadır. *Bacillus* sp.'den elde edilen ekstrasellular GI üç alt birimden meydana gelmektedir (Chauthaiwale ve Rao, 1994). Basuki ve arkadaşlarının *Streptomyces phaeochromogenes*'de varlığını gösterdikleri GI izoenziminin birbirinin aynı olmayan 4 alt birimden meydana geldiği gösterilmiştir (Bhosale vd., 1996). *Arthrobacter* ve *Streptomyces* türlerinde yapılan çalışmalarda molekülün biyolojik aktivitesinde rol oynayan birimin dimer ya da tetramerler olduğu ve monomer ünitelerin tek başlarına herhangi bir biyolojik aktiviteye sahip olmadıkları gösterilmiştir (Gaikwad vd., 1992; Rangarajan vd., 1992).

1.12.4. Optimum Sıcaklık ve pH

GI'nın optimum sıcaklığı çeşitli organizmalarda 60°C ile 80°C arasında değişiklik göstermektedir ve bu değerler Co^{+2} varlığı ile artış göstermektedir. Optimum pH değerleri ise genel olarak 7,0 ile 9,0 arasında değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte endüstriyel olarak arzu edilen düşük pH değerlerinde çalışabilen enzimler de bulunmaktadır. Örneğin *Lactobacillus brevis*'den elde edilen GI, pH 6 ile 7 arasında optimum aktivite göstermektedir. *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp., *Actinoplanes missouriensis* ve *Thermus thermosulfurogenes*'e ait GI'lar yüksek sıcaklıklarda kararlı enzimler oldukları halde *Lactobacillus* ve *Escherichia* spp.'ye ait GI'lar yüksek sıcaklıklarda az kararlıdır (Bhosale vd., 1996).

1.12.5. GI'ların DNA Dizi Benzerliği ve Reaksiyon Mekanizması

Glukoz izomerazların yapı ve işlevleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için çeşitli organizmalardan elde edilen GI (*xylA*) genlerinin amino asit dizilimleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda enzimin N-terminal ucunda 40-50 amino asitlik bir bölgenin olup olmasına göre 2 sınıfa ayrılmışlardır. N-terminal ucunda bu bölgeyi içermeyen GI'lar, Tip 1 olarak adlandırılır ve 390 amino asit içerirler. *Streptomyces* spp., *Actinoplanes* spp., *Ampullariella* spp., *Arthrobacter* spp. ve *Thermus thermophilus* gibi türlere ait GI'lar bu sınıftandır. *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, ve *Thermotoga* spp.

türlerine ait GI'lar ise 440 amino asitten meydana gelmişlerdir ve Tip 2 GI'lar olarak sınıflandırılırlar (Hess vd., 1998). Tip 2 GI'lar 8 sarmal ile çevrelenmiş birbirine paralel 8 β -levhadan ve diğer monomerlerle ilişkide bulunan uzamış bir C-terminal kuyruktan meydana gelirler. Enzimin aktif bölgesi açık bir fiçı şeklinde bir cepten meydana gelir ve bu cebin alt tarafında, genel olarak hidrofobik aminoasitler ile Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Co^{+2} gibi bivalent katyonlar ile birlikte çalışan glutamik asit, aspartik asit ve histidin gibi amino asitleri bulunmaktadır (Whitlow vd., 1991). Tip 1 ve Tip 2 glukoz izomerazlar arasında aminoasit dizilimi açısından büyük farklılıklar olmasına rağmen genel olarak; substrat ile ilişkide H100, T140, E231, K233, D338; metal iyonunun bağlanmasında E231, E267, H270, D295, D306, D308, D338; katalitik işlemlerde ise H100, D103, D338'in büyük ölçüde korunduğu görülmektedir. Filogenetik olarak uzak olan türlerin karşılaştırmalarında bile enzimin aktif bölgesine ait içeriğin birbirine oldukça yakın olduğu görülebilmektedir (Hess vd., 1998).

GI'nın çalışma mekanizması *Arthrobacter* ve *Streptomyces* GI'ları üzerinde yapılan X-Ray kristallografisi yöntemleriyle açığa çıkarılmıştır (Farber vd, 1989; Collyer vd., 1990). Enzimin biyokimyasal özelliklerine ait veriler ise aktif bölgede yapılan bölge spesifik mutasyonlar ile belirlenmiştir.

İlk zamanlar, GI'nın şeker fosfat izomerazlara benzer bir şekilde ene-diol mekanizması ile işlev gördükleri sanılmaktaydı (Rose vd., 1969). Fakat yapılan son çalışmalarla enzimin hidrit-sift mekanizması ile çalıştığı anlaşılmıştır. Enzimin yapısı ve işlevi arasındaki ilişkiyi açıklayabilmek için onun aktif kısmının konformasyonunu bilmek son derece önemlidir. Enzimin aktif kısmını çalışmak ve işlev mekanizmasını anlamak için kimyasal modifikasyon, X-Ray kristallografisi ve izotop değişimi gibi farklı yaklaşımlar denenmiştir. GI'nın katalitik mekanizması substrat halkasının açılması, hidritin C-1'den C-2'ye kaydırılması ve halkanın kapanması şeklinde cereyan etmektedir (Bhosale vd., 1996).

1.13. GI Üreten Mikroorganizmalar

Genel olarak bakıldığında, GI; birçok prokaryotik mikroorganizmada yaygın bir şekilde bulunmaktadır. *Pseudomonas hydrophila*'da bulunmasından sonra birçok bakteri ve *Actinomycetes* türünde GI aktivitesi saptanmıştır. Heterolaktik asidik bakteriler arasında *Lactobacillus brevis*'ten elde edilen GI, düşük pH değerlerinde aktif halde olmasına

rağmen, yüksek sıcaklıklarda ise kararlı değildi. Bu nedenle bu mikroorganizmalar ekonomik olarak elverişli değildi (Bhosale vd.,1996).

Hücre dışına sekresyonu yapılan GI'lara ait raporlar yaygın değildir. *Streptomyces glaucescens* (Weber, 1976) ve *S. flavogriseus* (Chen vd.,1979) türlerinde elde edilen GI'nın ekstrasellular olduğu rapor edilmiştir. Burada enzimin hücre içerisinden dışarı salınmasının hücre duvarının geçirgenliğindeki bir değişiklik ve hücrenin kısmi lizisi ile meydana geldiği kabul edilmiştir. *Chainia* sp. (Srinivasan vd., 1983; Vartak vd., 1984) ve alkalotermofilik bir tür olan *Bacillus* sp. (Chauthaiwale ve Rao, 1994)'den elde edilen ekstrasellular GI'lar, jel filtrasyon, iyon değişim kromatografisi ve preparatif poliakrilamid jel elektroforezi gibi yaygın saflaştırma teknikleri ile homojen bir şekilde saflaştırılmışlardır. *Streptomyces* spp. türlerinin yanı sıra *Bacillus* türleri de iyi miktarlarda GI üretmektedirler. *Candida utilis* (Wang vd., 1980) ve *Candida boidinii* (Vongsuvanlert ve Tani, 1988) gibi birkaç mayada da GI varlığı tespit edilmiştir. Çimlenmiş arpada (Bartfay, 1960) ve buğday tohumunda da (Pubols vd., 1963) GI'nın var olduğu gösterilmiştir.

1.14. Endüstriyel GI'lar

GI üreten ve ticari olarak önemli olan birkaç organizma Tablo 2'de verilmiştir. GI'nın büyük bir ticari önemi olmasından dolayı enzimi üreten birçok yeni organizma ve bu enzimin kullanımında geliştirilen birçok yöntem hakkındaki bilgi patentleşmiştir (Boguslawski ve Rynski, 1982; Hafner, 1985; Hafner ve Jackson, 1985; Iuzuka vd., 1971; Outtrup, 1974; Shieh, 1977; Weber, 1976).

Tablo 2. Ticari öneme sahip GI'ları üreten bazı mikroorganizmalar ve ürünleri (GI)

Organizma	Ürünün Ticari Adı	Üretici Firma
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Maxazyme	Gsit Brocades and Anheuser-Busch Inc.
<i>Bacillus coagulans</i>	Sweetzyme	Novo-Nordisk
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Optisweet	Miles Kali-Chemie
	Spezyme	Finnsugar
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	Swetase	Nagase
<i>Arthrobacter</i> sp.		Reynold Tobacco
<i>Streptomyces olivaceus</i>		Miles Laboratories Inc.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Besiyeri, Kimyasallar ve Vektörler

Nutrient broth, nutrient agar, bacteriological agar, tryptic soy broth, brain heart infusion broth, tryptic soy agar, trypton water, peptone, glucose, sodium chloride, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium perchlorate, lysozyme, crystal violet, safranin, malachite green, yeast extract, 2-propanol Merck'ten, gelatine Difco'dan, starch, glycerol, TRIS base, sodium dodecyl sulphate (SDS), potassium acetate, phenol:chloroform:isoamyl alcohol, phenol, acrylamide, bis-acrylamide, agarose, bromo phenol blue, coomassie brilliant blue-G 250, coomassie brilliant blue-R 250, ethidium bromide, bovine serum albumin (BSA), proteinase K, IPTG , RNase A, RNase T₁, ammonium acetate, isoamyl alcohol, D-Ksiloz, D-Glukoz, D-Fruktoz, MnSO₄, MOPS, perklorik asit, sistein, karbozol, Phenyl sepharose 6 Fast Flow, DEAE-Sepharose Sigma'dan; sodium acetate, methanol ve acetone Carlo Erba'dan; tripton, yeast ekstrakt, NaCl, EDTA, amonyom sülfat, sodyum asetat, K₂HPO₄, KH₂PO₄, CoCl₂ Merck'den, sülfürik asit Riedel-deHaen'dan, amfisilin, kanamisin Bioanalyse'dan, *EcoRI*, *NcoI*, T4 DNA ligaz NEB'den satın alındı. Genomik DNA İzolasyon Kiti, Jelden çıkarma kiti ve p-GEMT Easy Klonlama Kiti, *Taq* DNA polimeraz Promega'dan, API 20E ve Vitek *Bacillus* Biochemical Card (B) kitleri de Biomerieux Fransa'dan satın alındı.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türleri

Anoxybacillus flavithermus DSM 2641^T , *Anoxybacillus pushchinoensis* DSM 12423^T , *Anoxybacillus contaminans* DSM 15866^T , *Anoxybacillus kamchatkensis* DSM 14988^T , *Anoxybacillus bogrovensis* DSM 17956^T , *Anoxybacillus amylolyticus* DSM 15939^T , *Anoxybacillus rupiensis* DSM 17127^T , *Anoxybacillus thermarum* DSM 17141^T , *Brevibacillus thermoruber* DSM 7064^T , *Thermus scotoductus* DSM 8553^T , *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344^T , *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T , tip bakteri kültürleri Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

(DSMZ)'den, *Schlegelella aquatica* LMG 23380^T tip bakteri kültürü The Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCMTM)'den, *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T, *Anoxybacillus eryuanensis* KCTC 13720^T, *Anoxybacillus tengchongensis* KCTC 13721^T tip bakteri kültürleri Korean Collection for Type Cultures (KCTC)'den, *Anoxybacillus gonensis* NCIBM 13933^T, *Anoxybacillus kestanbolensis* NCIBM 13971^T ve *Anoxybacillus ayderensis* NCIBM 13972^T tip bakteri kültürleri KTÜ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim dalından ve *Anoxybacillus voinovskiensis* NCIBM 13956^T tip bakteri kültürü de, bu bakteriyi tanımlayıp literatüre kazandıran Isao Yumoto'dan temin edildi.

2.2. Metotlar

2.2.1. Kaplıcalardan Örneklerin Alınması ve Termofilik Bakterilerin İzolasyonu

Her bir kaplıcadan su ve çamurlu su örnekleri, ağzı kapaklı steril şişelere alındı. Alınan örnekler olabildiğince kısa sürede ve soğuk şartlar altında laboratuara getirildi. Daha sonra içerdikleri termofilik bakteriler, uygun besiyerler kullanılarak zenginleştirme kültürleri yapılmak suretiyle farklı sıcaklıklarda (50°C, 60°C, 70°C) çoğaltıldı. Çoğaltılan bu kültürler, uygun besiyerleri içeren agar petrilere tek koloni elde etmek amacıyla ekildi ve sonuçta petri üzerinde oluşan koloniler incelenerek birbirinden farklı olabilecek koloniler seçilip bunların saf kültürleri yapıldı (Benson, 1985).

2.2.2. İzolatların Bazı Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.2.1. İzolatların Klasik Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakterilerin klasik fenotipik karakterleri, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini içermektedir.

2.2.2.1.1. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Elde edilen bütün izolatların hücre şekillerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak basit boyamalar yapıldı. Ardından izolatların hücre duvarı özelliklerinin ortaya çıkarılması amacıyla Gram boyamalar yapıldı ve bu yöntemle göre izolatların Gram (+) veya Gram (-) hücre duvarına sahip olduğuna karar verildi. İzolatların spor yapılarını oluşturup oluşturmadığının ve sporun hücre içerisindeki pozisyonunun belirlenmesi amacıyla, spor boyamalar yapıldı. Ayrıca lam lamel arası preparat yöntemi kullanılarak, bakterilerin hareketli olup olmadıkları test edildi (Benson, 1985; Dulger, 1997).

2.2.2.1.2. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların maksimum, minimum ve optimum büyüme sıcaklıkları, nutrient broth besiyerinde farklı sıcaklıklarda üretilip spektrofotometrede OD₆₀₀'de yapılan ölçümlerle belirlendi. İzolatların maksimum, minimum ve optimum olarak büyüebildiği pH değeri, değişik pH'lara ayarlanmış (pH 5; 5.5; 6,0; 6,5; 7; 7.5; 8; 8.5; 9; 9.5) nutrient broth besiyerleri kullanılarak tespit edildi. Büyümenin olup olmadığı ve düzeyi ise yine spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçümler yapılarak ortaya çıkarıldı. İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla değişik oranlarda (% 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10) NaCl içeren nutrient broth besiyerleri kullanıldı ve 55-60°C'ye ayarlanmış etüvde 3-7 gün süre ile bekletilerek izolatların NaCl ihtiyaçları belirlendi. İzolatların atmosferik oksijen ihtiyaçları, "Brain Heart Infusion Agar" besiyerini ihtiva eden deney tüplerine yapılan inokülasyonlar sonucunda, büyümenin olduğu bölgeye göre belirlendi (Benson, 1985; Sneath, 1986; Cappuccino ve Sherman, 1992; Dulger, 1997).

Bakteri sistematiğindeki önemli karakterlerden bir diğeri, belirli karbonhidratları karbon kaynağı olarak kullanma özelliğidir. İzolatların bu özelliklerinin ortaya çıkarılması amacıyla, Vitek *Bacillus* Biochemical Card (B) ile birlikte VITEK 32 System'i kullanıldı.

Bakteriler nişastalı nutrient agar petrilere ekildi ve 3-7 günlük inkübasyon süresinden sonra lügol ilavesiyle izolatların amilaz üretilip üretmedikleri test edildi. İzolatların katalaz üretilip üretmedikleri ise katalaz testi uygulanarak tayin edildi (Benson, 1985; Sneath, 1986; Cappuccino ve Sherman, 1992; Dulger, 1997). Diğer bazı biyokimyasal özellikleri belirlemek amacıyla API20E kitleri kullanıldı.

2.2.3. İzolatların Bazı Kemotaksonomik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.3.1. İzolatların Çözülebilir Hücre Proteinlerinin Profilinin Çıkarılması

2.2.3.1.1. Çözünebilir Hücre Proteinlerinin İzolasyonu

İzolatların içerdikleri çözünebilir hücre proteinlerinin profilini çıkarmak için, öncelikle elde edilen her bir izolattan ve tür tayinleri yapılmış olan diğer şahit bakterilerden 10 ml gece kültürleri yapıldı. Hücrelerin, 14.000 rpm'de 15 dakika santrifuj edilmesiyle oluşturulan çökelek, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ve % 10 sakkarozdan oluşan TS tamponunda çözüldü ve sıvı azot (-94°C) tankında bir dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına alındı ve bu işlem iki kez tekrarlandı (Belduz vd., 1993). Oda sıcaklığında çözüldükten sonra, hacminin 1/20'si kadar 10 mg/ml'lik lizozim ilave edilerek hücre süspansiyonu 35 dakika buz üzerinde bekletildi, daha sonra 16.000 x g'de santrifuj edildi ve protein özütünü içeren sıvı kısım, steril bir tüpe alınarak -20°C'de saklandı.

2.2.3.1.2. Protein Konsantrasyonunun Tayini

Protein konsantrasyonunun tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. 100 ml boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg Commasie Brilliant Blue G-250, 5 ml % 95'lik etanol içerisinde iyice çözülerek üzerine 10 ml % 85'lik fosforik asit ilave edildi ve 100 ml'ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre kağıdı ile süzülerek temizlendi.

Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak BSA kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözelti 0,15 M'lık NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Ardından üzerine 5 ml yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan boya çözeltisinden ilave edildi ve vortekslenerek 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Örnekler için BSA yerine 10 µl her bir izolatdan izole edilen protein özütü kullanılarak aynı işlem gerçekleştirildi. Süre sonunda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein miktarı µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.2.3.1.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Herbir izolattan ve tür tayinleri yapılmış bakterilerden izole edilen protein özütlerinin konsantrasyonu hesaplandıktan sonra, bu protein özütlerinden uygun miktarlarda (40 µg) alınarak bu özütlere eşit miktarda 2 X muamele tamponu (0,15 M TRIS-HCl pH 6,8, % 4 SDS, % 20 gliserol, % 6 β-merkaptoetanol) ilave edildi ve sonrasında 65 °C’de 90 saniye bekletildi. Daha sonra Laemli (1970) tarafından tanımlanan % 12’lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklenerek ve 0,75 mm kalınlığındaki her bir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Ayırma işlemi tamamlandıktan sonra, jel Coomassie Brilliant Blue (% 0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, % 50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyandı ve Yıkama-I (% 50 metanol, % 10 asetik asit) solüsyonunda 1 saat bekletildi. Daha sonra Yıkama-II (% 7 asetik asit, % 5 metanol) solüsyonuna aktarıldı ve bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

2.2.3.2. İzolatların Yağ Asidi İçeriklerinin Ortaya Çıkarılması

İzolatların yağ asidi metil esterlerinin içeriklerini ortaya çıkarılması amacıyla, izolatlar Triptik soy agar besiyerinde 24 saat uygun sıcaklıklarda üretildi. İzolatların yağ asidi metil esterleri, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde Microbial Identifikasyon System’i (MIDI; Microbiol ID, Inc., DE, USA) kullanılarak belirlendi.

2.2.4. İzolatların Bazı Genotipik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.4.1. İzolatların Genomik DNA’larının İzolasyonu

İzolatların genomik DNA’ları, iki farklı yöntemle izole edildi. DNA-DNA hibridizasyonu ve G+C kompozisyonunun belirlenmesinde kullanılacak genomik DNA’lar, Marmur (1961) prosedürüne göre izole edilirken; diğer genotipik özelliklerin belirlenmesinde kullanılacak genomik DNA’lar ise, Sambrook ve arkadaşlarının (1989) prosedürüne göre izole edildi.

2.2.4.1.1. Marmur Prosedürü

Termofilik izolatlar uygun sıcaklıkta LB Broth'da bir gece inkübe edilerek sıvı kültürleri elde edildi. Elde edilen bu sıvı kültürler, üremelerinin exponansiyel fazında 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve üstteki sıvı kısım dökülerek pellet kısmı saklandı. Elde edilen bu pellet kısmı, 20 ml süspansiyon tamponuyla [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM sodyum EDTA (pH 8.0) ve 0,35M sukroz] çözüldü ve 250 ml'lik erlene aktarıldı. Erlenekteki hücre süspansiyonuna 50 mg lizozim ilave edildi ve bu karışım 37°C'de hücreler patlayana kadar inkübe edildi. Gram negatif bakteriler için yaklaşık beş dakikalık inkübasyon süresi yeterli iken, Gram pozitif bakterilerin lizis olmaları için daha uzun süreli inkübasyona ihtiyaç duyulabilir, hatta bazen bu inkübasyon süresi birkaç saat sürebilmektedir. Bakterinin lizis olup olmadığını test etmek amacıyla, inkübasyondaki hücre süspansiyonundan 0,1-0,2 ml örnek alındı. Alınan bu örnek küçük test tüplerine konuldu ve 1,5 hacim lizis solüsyonu (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.3 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), % 2 SDS, % 2 β -merkaptoetanol ve 100 μ g/ml proteinaz K). Lizis solüsyonu içerir. Ayrıca, kullanılmadan hemen önce 0,5 hacim 5 M sodyum perklorat ilave edildi ve bu solüsyon 50-60°C su banyosunda ısıtılarak çözüldü. 1,5 hacim lizis solüsyonu test tüplerine ilave edildiği zaman, hücre süspansiyonu bulanık halden oldukça yapışkan hale döndü ve bu değişim hücrelerin lizis olduğunu gösterdi.

Hücre süspansiyonunun lizis olduğu test edildikten sonra, erlenekteki hücre süspansiyonuna 30 ml lisiz solüsyonu ilave edildi ve 50-60°C'de 1-4 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda, erlene 12 ml fenol-CHCl₃ karışımı (% 50 fenol : % 48,5 CHCl₃ : % 1,5 izopentanol : % 0,1 hidroksikinolin) ilave edildi ve homojen bir karışım elde etmek için erlen 20 dakika çalkalayıcıda sallandı. Sonra hücre lizatı, 50 ml'lik polipropilen tüplerine aktarıldı ve 17.000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüplerin üst kısmındaki sıvı, pipetle alınarak temiz bir erlene aktarıldı. Aktarılan lizat üzerine 10 ml fenol-CHCl₃ karışımı ilave edildi ve tekrar 20 dakika çalkalayıcıda sallandı. Sonra hücre lizatı, 50 ml'lik polipropilen tüplerine aktarıldı ve 17.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüjden sonra tüplerin üst kısmındaki sıvı, pipetle alınarak temiz bir erlene aktarıldı. Bu işleme, üst kısımdaki sıvı ile fenol-CHCl₃ sıvısı arasındaki ara yüzeyde protein tabakası oluşmayıncaya kadar devam edildi. Son aşamada, üst kısımdaki sıvı 125 ml'lik erlene alındı ve üzerine 0,6 hacim izopropanol ilave edildi. Sonra erlen çalkalandı ve DNA'nın bir pellet oluşturması sağlandı. Erlenekteki sıvı boşaltıldı ve erlen sadece DNA

pelleti kaldı. Erlene % 80'lik soğuk etanol ilave edildi ve 5 dakika çalkalandıktan sonra erlendeki sıvı boşaltıldı. Bu etanolle yıkama işlemi, iki kez tekrar edildi. Son yıkama işleminden sonra, erlen yavaşça eğiltilerek DNA pelletinin erlenin dip kısmına yerleşmesi sağlandı. Daha sonra erlen ters çevrilerek bir havlu kâğıt üzerine yerleştirildi ve 15-30 dakika 37°C'de inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra, erlene 20 ml 0,1 X standart sodyum-sitrat (SSC: 0.015M TRIS-sodyum sitrat (pH 7,0), 0,15M NaCl) ilave edildi ve DNA'nın çözülmesi için erlen çalkalandı. DNA tamamiyle çözüldükten sonra, 0,25 ml RNase A ve 2,5 ml RNase T₁ solüsyonu ilave edildi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Sonra DNA solüsyonuna, 5ml CHCl₃-izopentanol (% 3 izopentanol içeren kloroform) ilave edildi ve 20 dakika çalkalayıcıda sallandı. Erendeki DNA solüsyonu, 30 ml'lik polipropilen tüpüne aktarıldı ve 17.000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, tüpün üst kısmındaki sıvı alındı ve 100 ml'lik behere aktarıldı. CHCl₃ sıvısı ile üst fazdaki sıvı arasında büyük bir protein tabakası oluşması halinde, CHCl₃-izopentanol aşaması birkaç kez tekrar edildi.

Behere 2 ml 3 M sodyum asetat ilave edilip karıştırıldı. Ardından 2 hacim % 95'lik etanol ilave edildi ve DNA'nın tekrar bir pellet oluşturması sağlandı. Bir cam çubuk beher içinde döndürülüp karıştırıldı ve DNA'nın cam çubuk üzerine sarılması sağlandı. Cam çubuk 10-20 ml % 80'lik soğuk etanol ile yıkandı ve bir test tüpü rakına dik şekilde konarak kurutulması sağlandı. Daha sonra cam çubuk 3-5 ml 0,1 X SSC içeren kapaklı test tüplerine yerleştirildi ve bir gece buzdolabında bekletildikten sonra DNA'nın çözülmesi sağlandı. Elde edilen çözülmüş DNA'lar -20°C'de saklandı.

2.2.4.1.2. Sambrook ve Arkadaşlarının Prosedürü

Termofilik izolatlar, uygun sıcaklıkta LB Broth'da bir gece inkübe edildi. Elde edilen sıvı kültürler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hücreler 13.000 rpm'de 3-4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pelletlerin üzerine, 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) ilave edildi ve vorteksenerek çözüldü. Üzerine 10 µg lizozim ilave edilerek karıştırıldı ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine 50 µl % 10'luk SDS eklendi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra her bir tüpe 3 M'lık 1/10 hacim sodyum asetat (pH 5,2) eklendi ve 65°C'de 30 dakika bekletildi. Her 10 dakikada bir, tüpler alt üst edildi. Hemen sonrasında üzerine 500 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25: 24: 1) ilave

edildi, alt üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst kısımdaki sıvı pipet yardımıyla yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve pellet kısımları atıldı. Bu tüplere 500 µl kloroform ilave edildi ve alt üst edilerek 13.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Bu kloroform aşaması 2 kez tekrarlandıktan sonra yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılan sıvının üzerine 1/10 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim % 96’lık soğuk etil alkol ilave edildi ve -20°C’de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvı atıldı. Kalan pellet üzerine 500 µl % 70’lik soğuk etanol ilave edildi ve 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst faz döküldü ve kalan pellet 37°C’de 10 dakika kurutuldu. Elde edilen DNA pelletleri, 100 µl TE’de çözülerek – 20°C’de muhafaza edildi.

2.2.4.2. İzolatların rRNA Analizleri

2.2.4.2.1. 16S rRNA Geninin PCR ile Çoğaltımı

16S rRNA genleri, her bir termofilik izolattan Sambrook ve arkadaşlarının prosedürüne göre izole edilen genomik DNA’dan UNI16S-L (5’-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3’) ileri ve UNI16S-R (5’-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA) geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarının şartları Beffa ve arkadaşlarına (1996) göre oluşturuldu. 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl’ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µl’lik tüplerde, “Biometra Personal Cycler”da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95°C’de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü 94°C’de 1 dakika (denatürasyon için), 56°C’de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72°C’de 2 dakika (polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl’si % 1,1’lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra “BioDocAnalyze” sistemiyle görüntülendi.

2.2.4.2.2. 16S rRNA Geninin Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bank'taki Sıralarla Karşılaştırılması

Yukarıda açıklanan PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rRNA genleri, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler izole edildiler. Daha sonra *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesim yapılarak, izole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığı belirlendi. Doğruluğu teyit edilen klonların baz dizin analizi, otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla ile (Macrogen, Güney Kore) belirlendi. Elde edilen yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rRNA dizileri GenBank'taki var olan diğer bakteriyal 16S rRNA dizileriyle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı. Cins seviyesinde izolatların sınıflandırılması sağlandı.

2.2.4.2.3. 16S rRNA Çok Değişken (HV) Bölgesi

HV bölgesi, *Bacillus subtilis* 16S rRNA gen sırası referans alındığında, 16S rRNA geninin 70 ila 344 nolu nükleotitlerin arasındaki 275 bp'lik bölgeyi ifade etmektedir. HV bölgesi çalışılacak izolatların 16S rRNA gen sıraları, *Bacillus subtilis*'in 16S rRNA gen sırası ile tek tek BLAST'ın "Align two (or more) sequence using BLAST" programı kullanılarak karşılaştırıldı. *Bacillus subtilis* 16S rRNA gen sırası referans alındığında, 70 ile 344 nolu nükleotitlerin arasındaki 275 bp'lik bölge HV bölgesi olarak belirlendi.

2.2.4.3. *recN* Geninin PCR ile Çoğaltımı

recN genleri, *Geobacillus* cinsine ait her bir termofilik izolatın genomik DNA'sından Zeigler'in 2005 yılında yaptığı bir çalışmada kullanılan F1-2 (5'-CGATTTGCGGCGACGATAC-3') ileri ve R1-1 (5'-TACACCATGCAAAAACGGTTAC-3') geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarında 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µl'lik tüplerde,

“Biometra Personal Cycler”da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95°C’de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü 94°C’de 1 dakika (denatürasyon için), 55°C’de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72°C’de 2 dakika (polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl’si % 1,1’lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra “BioDocAnalyze” sistemiyle görüntülendi.

2.2.4.4. *rpoB* Geninin PCR ile Çoğaltımı

Anoxybacillus ve *Geobacillus* cinsine ait her bir izolatın *rpoB* genleri, rpoB1698F (5’-AACATCGGTTTGATCAAC-3’) ileri ve rpoB2041R (5’-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3’) geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı (Dahllöf vd., 2000). PCR reaksiyonlarının şartları Dahllöf ve arkadaşlarına (2000) göre oluşturuldu. 50 ng kalıp DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 10 mM KCl, 25 pmol ileri primeri, 25 pmol geri primeri, 2,5 mM dNTP, 20 µg of BSA, 2,6 mM MgCl₂ ve 5 U/50 µl *Taq* DNA Polimeraz karışımı steril ddH₂O ile 50 µl’ye tamamlandı. Reaksiyon, 94°C’de 5 dakikalık ilk denatürasyon basamağının ardından, 25 döngü 94°C’de 30 saniye (denatürasyon için), 50°C’de 1,5 dakika (hibridizasyon için) ve 72°C’de 1,5 dakika (polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl’si % 1,4’lük agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra “BioDocAnalyze” sistemiyle görüntülendi.

2.2.4.5. *rpoB* ve *recN* Genlerinin Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve GenBank’taki Sıralarla Karşılaştırılması

Yukarıda açıklanan PCR reaksiyonu ile çoğaltılan *rpoB* ve *recN* genleri, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler izole edildiler. Daha sonra izole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığı belirlendi ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizin analizi, otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla ile (Macrogen, Güney Kore) belirlendi. Elde edilen yaklaşık 1200 bp ve 400 bp uzunluklarındaki *recN* ve *rpoB*

dizileri, GenBank'ta var olan diğer bakteriyal dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı.

2.2.4.6. 16S rRNA, HV Bölgesi, *recN* ve *rpoB* Gen Dizilerine Göre Filogenetik Ağaç Çizilmesi

Elde edilen 16S rRNA, HV, *recN* ve *rpoB* geni baz sıraları, moleküler analizlerde ham veri olarak kullanıldı. Her taksonun bu genlerine ait nükleotit baz dizileri, Clustal W (Thompson vd., 1997) programı kullanılarak alt alta hizalandı. Daha sonra bu sıralar analiz edilmek üzere sırasıyla Fasta, Nexus ve PHYLIP formatlarına dönüştürüldü.

Elde edilen veriler temel olarak 16S rRNA, HV, *recN* ve *rpoB* genlerine dayanarak çalışılan taksonlar arasındaki ilişkileri ortaya koymak amacıyla 16S rRNA, HV, *recN* ve *rpoB* genlerine ait baz dizinleri MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura vd., 2007) paket programı kullanılarak değerlendirildi.

2.2.4.7. % G+C Baz Kompozisyonunun Belirlenmesi

DNA baz kompozisyonu, Mandel ve Marmur (1968) tarafından geliştirilen termal denatürasyon yöntemine göre belirlendi. Marmur prosedürüne göre izole edilen genomik DNA'lar, konsantrasyonu 20 µg/ml olacak şekilde 0,1X SSC tamponu içerisinde seyreltildi. Seyreltilen DNA'lar kapaklı Quartz spektrofotometre küvetlerine konuldu ve hazırlanan bu DNA örnekleri, sıcaklık ünitesine sahip olan Varian Cary 100 Bio UV/VIS - spektrofotometre cihazına yerleştirildi. İlk olarak 60°C'de, 5 dakika bekletildi ve daha sonra 60°C'den başlayarak her 30 saniye için sıcaklık 1'er°C arttırıldı ve her sıcaklıktaki 260 nm dalga boyundaki absorbans değeri ölçüldü. Sıcaklığa karşı nispi absorbans değerlerini içeren bir grafik çizildi. Hiperkromik yükselmenin % 50'sine tekabül eden sıcaklık hesaplanarak T_m sıcaklığı belirlendi. Aşağıda belirtilen Formül 1 kullanılarak, DNA örneklerinin % GC içeriği hesaplandı.

$$GC : (T_m - 53,9) \times 2,44$$

(1)

2.2.4.8. DNA-DNA Hibridizasyonu

DNA-DNA benzerlik seviyesi, De Ley ve arkadaşlarının (1970) geliştirdiği DNA-DNA hibridizasyon yöntemine göre belirlendi. DNA-DNA benzerlik seviyesi belirlenecek iki bakterinin DNA'sı, Marmur prosedürüne göre izole edildi. İzole edilen genomik DNA'lar, konsantrasyonu 0,4 µg/ml olacak şekilde 0,1X SSC tamponu ile seyreltildi. Seyreltilen DNA'lar, Sartorius Labsonic M (BBI-8535035) sonikatöründe 0,4 mA'de 3 dakika sonikasyona maruz bırakıldı. Sonikasyondan sonra, DNA örnekleri % 1,4'lük agaroz jelde yürütüldü ve fragment uzunluğunun tekdüzeliği kontrol edildi. Kırılan DNA'lar, konsantrasyonu 75-80 µg/ml olacak şekilde 0,1X SSC tamponu içerisinde seyreltildi. Seyreltilen her iki bakterinin DNA'sı, ayrı ayrı kapaklı Quartz spektrofotometre küvetlerine konuldu ve üçüncü bir kapaklı Quartz spektrofotometre küvetine de, her iki bakterinin seyreltilen DNA'sı eşit hacimlerde konuldu. Daha sonra küvetler, sıcaklık ünitesine sahip olan Varian Cary 100 Bio UV/VIS -spektrofotometre cihazına yerleştirildi ve 95°C'de bekletilerek DNA'ların denatüre edilmesi sağlandı. Hemen sonra, sıcaklık optimum renatürasyon sıcaklığına (T_{OR}) indirildi ve 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belli aralıklarla ölçüldü. T_{OR} , aşağıda belirtilen Formül 2 ile hesaplandı.

$$T_{OR} : 0,51.(mol \% G+C) + 47 \quad (2)$$

Dakikaya karşı absorbans değerlerini içeren grafikler, her üç küvet için ayrı ayrı çizildi. Her bir grafiğin eğimi yani yeniden birleşme oranları (ϕ) ayrı ayrı hesaplandı ve aşağıda belirtilen Formül 3'te yerlerine konularak bu iki bakterinin DNA'ları arasındaki benzerlik hesaplandı.

$$\% D : \frac{4 \phi_M - \phi_A - \phi_B}{2(\phi_A \times \phi_B)^{1/2}} \times 100 \quad (3)$$

2.2.5. A. *kaynarcensis* D1021^T'de Glukoz İzomeraz Aktivitesinin Tespiti

Anoxybacillus kaynarcensis D1021^T bakterisi LB besiyerinde 55°C'de bir gün büyütüldü. Bu kültürden, 250 millitrelik bir erlen içerisindeki 50 ml LB besiyerine O.D.'si 0,1 olacak şekilde taze ekim yapıldı ve hücreler O.D.'si 0,6-0,9 oluncaya kadar 55°C'de

büyütülmeye bırakıldı. Hücrelerin O.D. değeri 0,6-0,9 olunca kültüre son konsantrasyonu % 0,5 olacak şekilde filtrasyon ile steril edilmiş D-ksiloz ilave edilerek hücreler, glukoz izomeraz üretmek üzere uyarıldılar. Bu şekilde 55°C’de 4 saat kadar büyütülen hücreler 7500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu yöntem ile 4 lt kültürden yaklaşık olarak 10 gr kadar hücre pelleti elde edildi. Çöken hücreler 0,5 mM CoCl₂ ve 5 mM MgSO₄ içeren 20 mM MOPS tamponunda (pH 6,5) yıkanarak temizlendi ve sonrasında tekrar 7500 rpm’de santrifüj ile çöktürüldü. Hücreler yukarıda belirtilen tamponun 15 ml’si içerisinde tekrar çözülerek 1 µg/ml lizozim ilavesiyle 37°C’de 30 dakika kadar inkübe edildi. Daha sonra 10 dakika Sartorius Labsonic M (BBI-8535035) marka sonikatör kullanılarak % 80 güçte 1 döngü aralığında patlatılan hücreler 15.300 rpm de 20 dk santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak sıvı kısmı oluşturan hücre özütü, GI aktivitesini belirlemek üzere kullanıldı.

GI aktivitesi tayini metodu Belfaqui ve Pennick (2000) tarafından geliştirilmiştir. 200 mM glukoz, 10 mM MgSO₄, 1 mM CoCl₂ ve 5 µg enzim özütü, pH’sı 7 olan 100 mM MOPS tamponu içerisinde, son hacim 100 µl olacak şekilde, 85°C’de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, inkübasyon süresi sonunda, buz üzerine alınarak sonlandırıldı. Oluşan fruktoz miktarı Dische ve Borenfreund’un (1951) geliştirdikleri sistein-karbozol-sülfürik asit metodu ile belirlendi. Reaksiyon çözeltisi üzerine 40 µl % 1,5’lik sistein hidroklorür ve hemen ardından 40 µl etil alkolde çözülmüş % 0,12’lik karbozol ilave edildi. Karışım vortekslendikten sonra üzerine 1,2 ml % 70’lik sülfürik asit ilave edildi ve tekrar vortekslendi. 15–20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Fruktoz miktarı hazırlanan fruktoz kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Enzim aktivitesi reaksiyon sonrası oluşan fruktoz miktarına göre µmol/dakika cinsinden hesaplandı.

2.2.6. GI Üzerinde Yapılan Moleküler Çalışmalar

2.2.6.1. Glukoz İzomeraz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi

Kendi laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarımızdan, *Anoxybacillus gonensis* G2^T bakterisinin GI geni 5’ ve 3’ uçlarına göre Xyla_Ex_F1 ve Xyla_Ex_R1 primerleri dizayn edilmiştir. Bu primerler kullanılarak *Anoxybacillus kaynarcensis* D1021^T’e ait genomik DNA’sından *A. kaynarcensis* D1021’e ait GI geninin çoğaltılması sağlandı. Xyla_Ex_F1

ve Xyla_Ex_R1 primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu, 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 1X PCR tamponu, 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, her bir primerden 25 pmol, 10–40 ng kalıp genomik DNA ve 1 U *Taq* DNA polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon şartları, 95°C'de 1 dakika ön denatürasyon sonrasında, 36 döngü olacak şekilde; 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 56°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 1,5 dakika uzama ve döngü sonunda 72°C'de 5 dakika son uzama safhası şeklinde gerçekleştirildi. Ürünler % 1,2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Elde edilen PCR ürünü, baz dizilimini belirlenmek üzere, pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı ve baz dizilim analizi MacroGen şirketi aracılığı ile yapıldı. Dizin sonuçları GenBank'taki verilerle karşılaştırıldı ve bu dizinin glukoz izomerase genine ait olduğu tespit edildi.

2.2.6.2. GI geninin pET-28a+ Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

PCR ürününün, dizin sonuçlarıyla glukoz izomerase genine ait olduğu kesinleştikten sonra, glukoz izomerase genini direkt olarak pET28a+ ekspresyon vektörüne klonlanabilecek şekilde, bu enzim geninin içerisinde kesim bölgesi olmayan ve ayrıca pET28a+ ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesinde kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerinin çalışabildiği özel primerler (*NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içerecek şekilde) dizayn edildi. *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içerecek şekilde dizayn edilen primerler:

Xyla_Ex_F2: 5' CGAGCTCCATGGCGTATTTTGAAAACG 3'

Xyla_Ex_R3: 5' CCGGAATTCGGCTATTAACGAGCTACAC 3'

pET28a+ ekspresyon vektöründeki *NcoI*-*EcoRI* bölgeleri arasına klonlayabilmek için, *NcoI* bölgesi içeren Xyla_Ex_F2 primeri ve *EcoRI* bölgesi içeren Xyla_Ex_R3 primerleri *A. kaynarcensis* D1021 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR şartları olarak Bölüm 2.2.6.1.'de anlatılan şartlar kullanıldı. PCR ürünü *NcoI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesilerek, aynı enzimlerle kesilmiş pET28a(+)'ya klonlandı ve klon pETD1021GI olarak adlandırıldı. pETD1021GI, sahip olduğu T7 promotorunun çalışmasına ve GI'nın ekspresyonuna imkân sağlayan *E. coli* BL21(DE3)

suşuna CaCl_2 transformasyonu ile aktarıldı, bu sisteme *E. coli* BL21/pETD1021GI adı verildi.

2.2.7. Enzim Üretimi

E. coli BL21/pETD1021GI'nin gece kültüründen sıvı LB besiyerine O.D.'si 0,1 olacak şekilde taze kültür aşılandı. Taze kültür O.D.'si 0,6-0,9 oluncaya kadar büyütülerek 1mM IPTG ile uyarıldı ve 3 saat sonra kültür 7500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöken hücreler 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponunda (pH 6,5) yıkanarak temizlendi ve müteakiben tekrar 7500 rpm'de santrifüj ile çöktürüldü. Hücreler yukarıda belirtilen tampon içerisinde tekrar çözülerek 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lizozim ile 37°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 10 dakika sonikatörle patlatıldı ve elde edilen hücre özütü 15.300 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak süpernatant alındı. Ekim için kullandığımız klonun doğruluğundan emin olmak için, süpernatantta tekrar GI aktivitesi bakıldı. GI aktivitesinden emin olduktan sonra, protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 300 μl örnek ayrılarak enzim saflaştırma işlemlerine başlandı.

2.2.8. GI'nın Saflaştırılması

2.2.8.1. Isı Bozunumu

E. coli BL21/pETG2GI sistemi ile üretilen GI enzimi termofilik karakter taşımaktadır. Dolayısı ile ekspresyon vektöründen ifade edilen enzimimiz dışında diğer tüm proteinler (*E. coli* BL21 hücrelerine ait) mezofilik karakterde olduklarından dolayı kısa bir ısı şoku uygulamasında bu proteinlerin çok büyük bir bölümü denatüre olmaktadır. Termofilik karakterli enzimimiz ise bu durumdan etkilenmemektedir. Saflaştırmanın ilk adımı olarak, mezofilik hücre (*E. coli* BL21/ pETG2GI) özütüne 80°C'de 15 dakika ısı şoku uygulandı.

Isı şoku sonrası denatüre olan tüm proteinler 15.300 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Enzimin aktivitesini koruduğundan emin olmak için süpernatantta tekrar GI aktivitesi bakıldı. GI aktivitesinden emin olduktan sonra, protein konsantrasyonunu,

spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 300 µl örnek ayrılarak iyon değişimi kromatografisi basamağına geçildi.

2.2.8.2. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi için 30 cm uzunluğunda ve 1,5 cm çapında bir kolon kullanıldı. Kolon malzemesi olarak DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma) kullanıldı. Kolon malzemesi ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazları vakum pompası kullanılarak alındı. Gazı alınmış olan kolon malzemesi oda sıcaklığına getirildikten sonra bir pastör pipeti yardımıyla yavaş bir şekilde kolona dolduruldu. Kolon 0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponunun (pH:6,5) 250 mililitresi ile dengeye getirildi. Sıcaklık uygulamasından elde edilen enzimi içeren örnek kolona akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde emdirildi. Örneğin kolana yüklenmesinden sonra tutunmayan proteinlerin kolondan uzaklaştırılması için 25–30 ml kadar tampon kolondan geçirildi. Kolondan çıkan örnekler bir tüp içerisinde biriktirilip bu tüp içerisinde glukoz izomerase aktivitesi arandı. Yapılan deney sonucunda çıkan solüsyonda glukoz izomerase aktivitesi bulunamadı. Bu durum enzimin kolon matriksine bağlandığını göstermektedir. Daha sonra kolonun NaCl konsantrasyonu sıfırdan başlayarak 0,6 molar kadar yükseltildi. Bunun için 0–0,6 M NaCl gradient köprüsü kullanıldı (iki beher içerisinde 200 ml tampon koyulup kaplardan birisinin içerisinde 0,6 M olacak şekilde NaCl ilave edildi, beherler arasındaki tampon geçişi ince bir cam boru ile sağlandı, peristaltik pompa 0 M tuz içeren tampondan sıvı çektiğiçe, 0,6 M tuz içeren beher içerisindeki tamponun 0 M tuz içeren behere geçişi sağlandı ve böylelikle tuz konsantrasyonu dereceli olarak arttırıldı). Kolondan çıkan fraksiyonlar 3,0 ml olacak şekilde cam tüpler içerisinde biriktirildi. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda glukoz izomerase aktivitesine bakıldı. GI aktivitesi bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Toparlanan enzim özütü (saflaştırma tablosu için gerekli verilere ulaşıldıktan sonra) vivaspin konsantrator kullanılarak 7500 g'de 10 dk santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı.

2.2.8.3. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi için 20 cm uzunluğundaki ve 0,75 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak Phenyl Sepharose 6 (Sigma) Fast Flow kullanıldı. Kolon malzemesinin gazı vakum pompası ile alındı ve oda sıcaklığına geldikten sonra bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Kolon doldurma işlemi bittikten sonra 1,3 M amonyum sülfat içeren 100 ml tampon (0,5 mM CoCl_2 ve 5 mM MgSO_4 içeren 20 mM MOPS tamponu) ile dengeye getirildi. İyon değişim kromatografisinden elde edilen enzim özütü ise 2,6 M amonyum sülfat içeren tampon ile bire bir oranında seyreltildi ve özütün amonyum sülfat içeriğinin 1,3 M olması sağlandı. Özüt kolona yüklenerek yüksek amonyum sülfat konsantrasyonunda proteinlerin hidrofobik kolon malzemesine bağlanması sağlandı. Daha sonra kolonun amonyum sülfat içeriği 1,3 M'den 0 M'ye düşürüldü. Bunun için 100'er ml'lik amonyum sülfat gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içinde 1,7 ml olacak şekilde toplandı. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda glukoz izomeras aktivitesi araştırıldı. GI aktivitesi bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Bir araya getirilen bu enzim solüsyonu ile karakterizasyon çalışmaları başlatıldı.

2.2.9. GI enziminin Karakterizasyonu

2.2.9.1. Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi

Deneylerde kullanılacak enzim miktarını belirlemek için; 1 μl , 2 μl , 3 μl , 4 μl , 5 μl , 6 μl , 8 μl , 10 μl , 15 μl , 20 μl , 30 μl , 40 μl , 60 μl enzim miktarlarıyla reaksiyonlar gerçekleştirildi. Reaksiyon 5 mM MgSO_4 ; 1 mM CoCl_2 içeren 50 mM MOPS (pH 6,5) tamponunda 50 mM glukoz varlığında 85°C'de 30 dk süre ile gerçekleştirildi. Reaksiyonlar sonucunda enzim miktarı – aktivite (%) grafiği oluşturularak karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak enzim miktarı belirlendi. Enzim miktarı-GI aktivite grafiğinde enzim miktarının ve aktivitenin doğrusal artış gösterdiği yani enzimin yarı doymun olduğu bir noktadaki enzim miktarı deneylerde kullanılmak üzere seçildi. Bu enzim miktarı da 15 μl olarak belirlendi.

2.2.9.2. Enzim Kinetiği

A. kaynarcensis D1021 glukoz izomeraz enziminin glukozla olan ilgisini belirlemek amacıyla 2, 4, 8, 10, 15, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 700 ve 1000 mM glukoz kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi. Deneyler, 5mM MgSO₄; 1 mM CoCl₂ içeren 50 mM MOPS (pH 7) tamponu içerisinde tamponunda, 100 µl son hacimde, 80°C’de, 30 dk, Biometra Personal Cycler PCR cihazında yapıldı. Glukoz izomeraz aktivitesi açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi ile hesaplandı. Ölçümler sırasında glukozdan kaynaklanan interferans sorunu; aynı derişimde glukoz içeren körler kullanılarak ortadan kaldırıldı. Michaelis-Menten sabiti (K_M) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri çizilen Michaelis-Menten eğrisi ile belirlendi. Ayrıca Michaelis-Menten eğrisi kullanılarak çalışmaların bundan sonraki kısımlarında kullanılacak olan substrat miktarı belirlendi. Bu amaç doğrultusunda Michaelis-Menten eğrisinde enzimin sustrata doyduğu alandan seçilen 250 mM substrat miktarı bir sonraki çalışmalar için kullanılacak olan substrat miktarı olarak belirlendi.

2.2.9.3. Optimum Sıcaklık

A. kaynarcensis D1021 glukoz izomerazının en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, pH’sı 6,5 olan 5 mM MgSO₄; 1 mM CoCl₂ içeren 50 mM MOPS tamponu içerisinde 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100°C sıcaklıklarda 250 mM glukoz konsantrasyonunda BioRAD Thermal Cycler cihazında yapılan aktivite deneyleriyle bulundu. Enzim aktivitesi için belirlenen optimum sıcaklık daha sonraki deneylerde reaksiyon sıcaklığı olarak kullanıldı (Lee vd., 1989).

2.2.9.4. Optimum pH

Glukoz izomeraz aktivitesine pH’ın etkisi, pH 5 - 5,5 - 6 aralığı için 50 mM asetat tamponunda; pH 6,5 - 8 aralığı için 50 mM MOPS tamponunda; pH 8,5 - 9,0 aralığı için 50 mM Tris-HCL tamponunda ve pH 9,5 -10,5 aralığı için 50 mM CAPS tamponunda, 250 mM glukoz konsantrasyonunda, 80°C’de 30 dakika, BioRAD Thermal Cycler cihazında gerçekleştirilen deneyler sonucunda belirlendi. Belirlenen optimum pH daha sonraki

karakterizasyon deney şartlarında kullanılacak olan reaksiyon pH'sı olarak belirlendi (Lee vd., 1989).

2.2.9.5. Isıl Kararlılığı

D1021^T glukoz izomerazın kararlılığına ısıнын etkisini belirlemek için saflaştırılan enzim özütü 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C'lerde 30 dakika boyunca inkübe edildi. Bu tüplerden örnekler alınarak, optimum çalışma şartlarında (5mM MgSO₄; 1 mM CoCl₂ içeren 50 mM MOPS tamponu içerisinde, 250 mM glukoz konsantrasyonunda ve 80°C'de 30 dk boyunca pH 7 olan MOPS tamponunda) aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin yüzde kalan aktivitesi hesaplandı (Lee vd., 1989).

2.2.9.6. pH Kararlılığı

Glukoz izomerazın, pH kararlılığını belirlemek için enzim, pH'ı 5 olan 50 mM asetat tamponunda, pH'sı 6 ve 7 olan 50 mM fosfat tamponlarında ve pH'sı 8 ve 9 olan Tris-HCl tamponlarında, 85°C'de inkübe edildi. Çeşitli zaman aralıklarında inkübe edilen enzimlerden 15'er µl alınarak optimum çalışma şartlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı. İlk anda alınan aktivite ölçümü % 100 olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, Karakoç Kaplıcası (İzmir), Kaynarca Kaplıcası (İzmir), Nebiler Kaplıcası (İzmir), Alangüllü Kaplıcası (Aydın), Çamköy Çamur Ilıcası (Aydın) ve Aydın Germencik Ömerbeyli Jeotermal sahasından elde edilen su ve çamurlu su örneklerinden *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Aneurinibacillus*, *Thermus*, *Pseudoxanthomonas*, *Schlegelella*, *Chelatococcus* cinslerine ait termofilik bakteriler izole edilerek bunların tür tayinleri yapılmaya çalışıldı. Çalışmada, izolatların tür tayinlerinin yapılması için bazı fenotipik ve genotipik özelliklerini belirleyici çeşitli testler uygulandı. Kesin tür tayinin yapılıp, *Anoxybacillus* cinsine ait yeni tür olduğu belirlenen *Anoxybacillus kaynarcensis* D1021 bakterisinde glukoz izomeraz aktivitesi araştırıldı. Bu bakterinin glukoz izomeraz geninin baz dizilimi belirlendi, pET28a+ vektörüne klonlanıp, ekspres edildi ve enzim karakterizasyon çalışmaları tamamlandı.

3.1. Termofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Her altı kaplıcadan izole edilen termofilik bakteri izolatlarının saf kültürleri yapıldıktan sonra, Karakoç Kaplıcasından 10, Kaynarca Kaplıcasından 7, Nebiler Kaplıcasından 8, Alangüllü Kaplıcasından 8, Çamköy Çamur Ilıcasından 8 ve Aydın Germencik Ömerbeyli jeotermal sahasından 10 adet olmak üzere birbirinden farklı olabilecek olan toplam 51 adet izolat seçildi (Tablo 3). Yapılan incelemeler sonucunda, bütün termofilik izolatların çubuk morfolojisine sahip olduğu, 51 izolattan 8 tanesinin Gram negatif, 43 tanesinin Gram pozitif olduğu belirlendi. İzolatların spor yapılarını oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla yapılan spor boyama sonucunda, 8 izolatın spor oluşturmadığı, 43 izolatın da terminal, subterminal ve sentral spor oluşturduğu belirlendi. Ayrıca lam lamel arası preparat yöntemi kullanılarak, bütün bakterilerin hareketli oldukları test edildi.

Tablo 3. Termofilik suşlar ve bu suşların izole edildiği termal alanlar

Suşların İzole edildiği Yer	İzole Edilen Termofilik Suşlar
Alangüllü Kaplıcası	PDF6, PDF19, PDF28, PDF32, TF1, , TF11, TF13, DF16
Aydın Germencik Ömerbeyli	PDF11, PDF1, PDF2, PDF22, TF2, TF3, TF14,
Jeotermal Sahası	TF16, TF17, DF20,
Çamköy Çamur Ilıcası	PDF4, PDF10 PDF15, PDF16, TH5, TH1, TH2, DF17
Karakoç Kaplıcası	TF15, PDF3, PDF18, PDF21, PDF7, PDF17, TF7, TF12, TH6, TH7
Kaynarca Kaplıcası	D1021, D1041, PDF29, PDF38, TF6, DF5, DF11
Nebiler Kaplıcası	PDF13, PDF24, D1042, TH4, PDF20, PDF27, PDF31, TF5

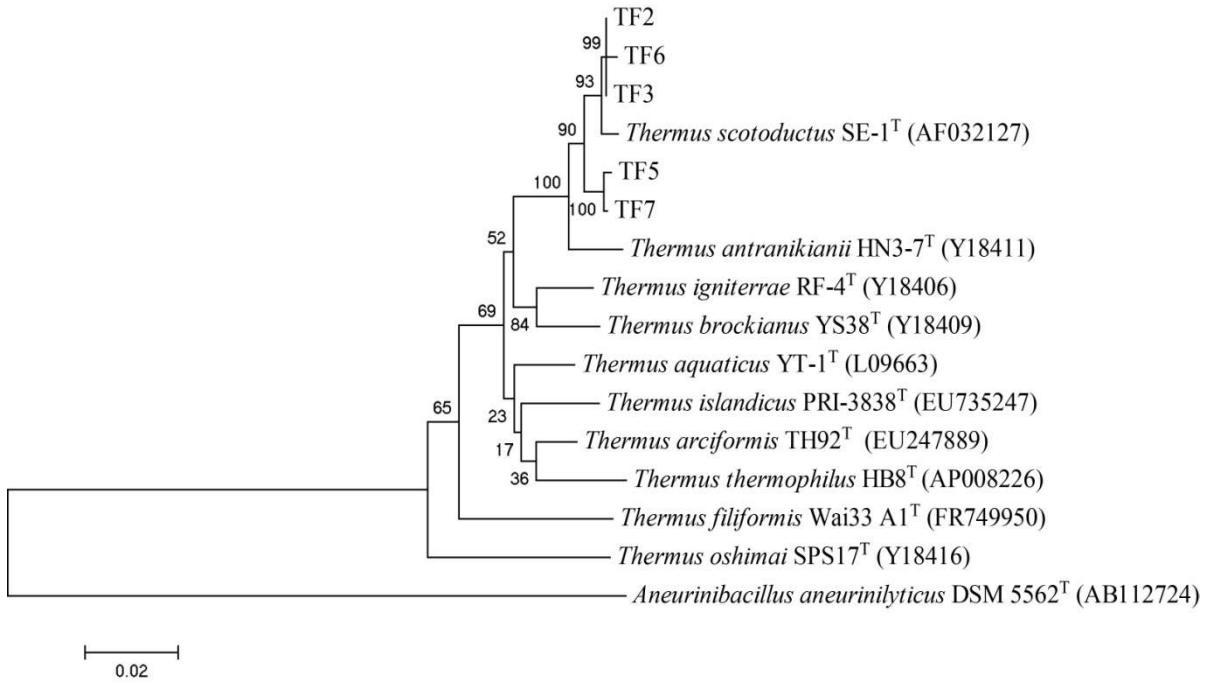
3.2. İzolatların 16S rRNA Genlerinin Baz Dizileri

Bilinmeyen bir bakterinin 16S rRNA genlerinin baz dizilerinin belirlenmesi, bu bakterinin sınıflandırılması için gerekli olan genotipik bilginin ilk ve temel adımıdır. Bu amaçla ilk olarak, kaplıcalardan izole edilen 51 adet izolatın 16S rRNA genlerinin baz dizileri belirlendi ve belirlenen 16S rRNA gen dizileri, GenBank'ta var olan diğer bakteriyel 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmalar sonucunda, 12 izolatın *Geobacillus*, 18 izolatın *Anoxybacillus*, 9 izolatın *Brevibacillus*, 5 izolatın *Thermus*, 4 izolatın *Aneurinibacillus* ve 1'er izolatında *Pseudoxanthomonas*, *Schlegelella* ve *Chelatococcus* cinslerine ait oldukları belirlendi. EzTaxon programı kullanılarak, bu izolatların 16S rRNA gen dizileri ile ait oldukları cinse ait türlerin 16S rRNA gen dizileri arasındaki benzerlik oranları belirlendi ve bu değerler Tablo 4, 5, 6, 7, 8 ve 9'da her cins için ayrı olarak gösterilmiştir.

Ayrıca, izolatların, ait oldukları cinslerdeki türlerle aralarındaki ilişkileri ortaya koymak amacıyla 16S rRNA genlerine ait baz dizinleri MEGA 4 paket programı kullanılarak değerlendirildi ve neighbour-joining programıyla 16S rRNA genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaçlar çizildi (Şekil 6, 7, 8, 9, 10 ve 11). Bu sekiz cinse ait 51 izolatın 16S rRNA gen dizileri Ekler bölümünde verilmektedir.

Tablo 4. *Thermus* cinsine ait izolatların, *Thermus* türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi

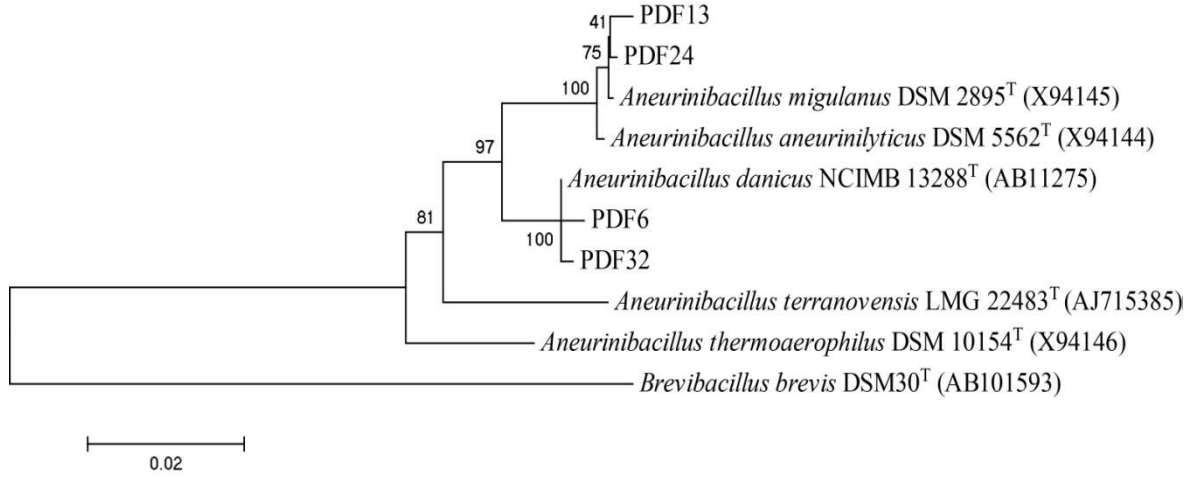
	TF2	TF3	TF5	TF6	TF7
<i>Thermus scotoductus</i>	99	99	99	99	99
<i>Thermus antranikianii</i>	98	98	98	97	98
<i>Thermus igniterrae</i>	96	96	96	96	96
<i>Thermus Brockianus</i>	96	96	96	95	96
<i>Thermus arciformis</i>	95	95	95	95	96
<i>Thermus aquaticus</i>	95	95	95	95	95
<i>Thermus islandicus</i>	95	95	95	95	95
<i>Thermus thermophilus</i>	94	94	95	94	95
<i>Thermus filiformis</i>	93	93	93	93	94



Şekil 6. *Thermus* tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç

Tablo 5. *Aneurinibacillus* cinsine ait izolatların, *Aneurinibacillus* türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi

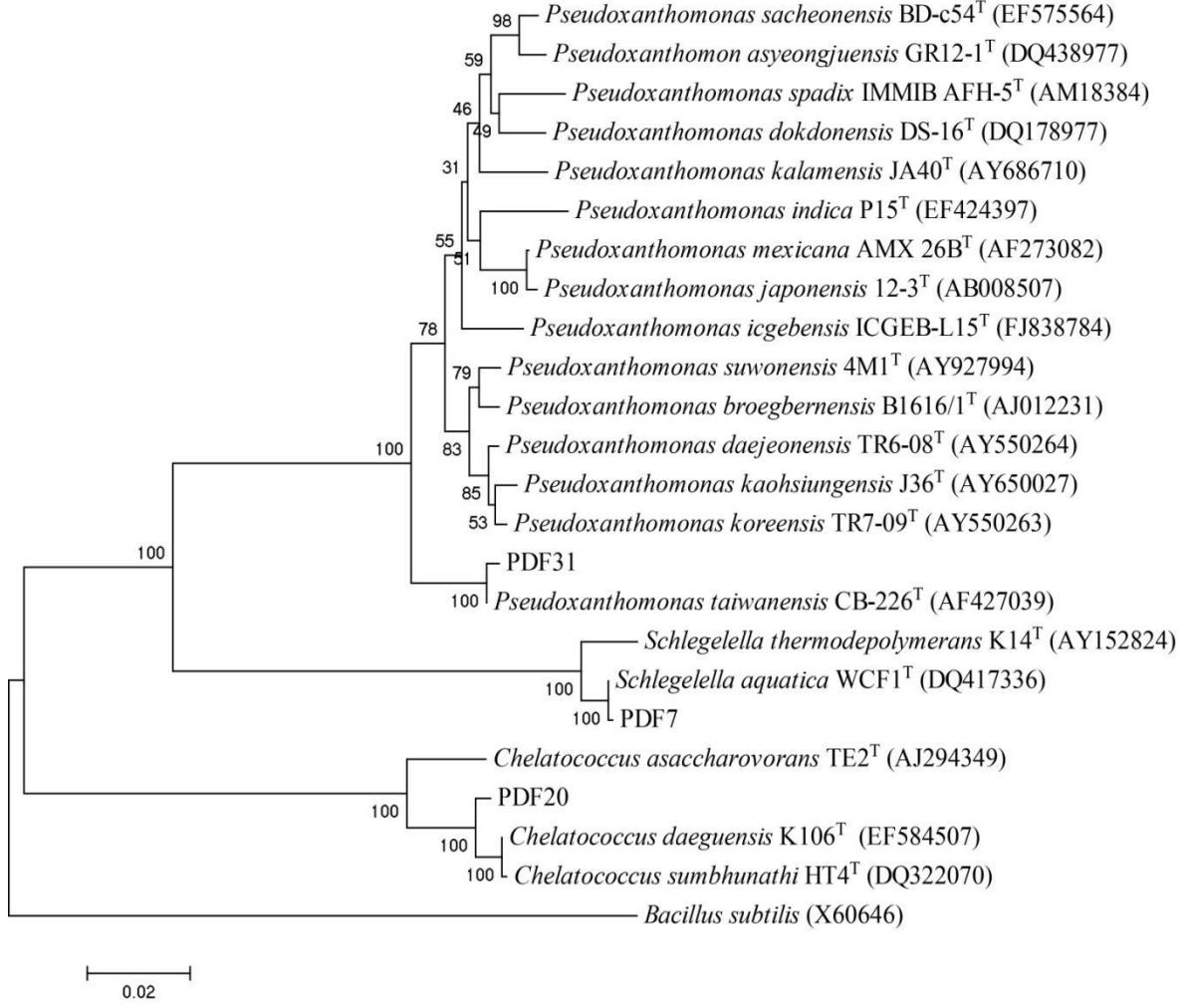
	PDF6	PDF13	PDF24	PDF32
<i>Aneurinibacillus danicus</i>	99	97	98	99
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	97	99	99	98
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	97	99	99	97
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	96	95	95	96
<i>Aneurinibacillus terranovensis</i>	95	95	96	96



Şekil 7. *Aneurinibacillus* tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç

Tablo 6. *Schlegelella*, *Chelatococcus* ve *Pseudoxanthomonas* cinslerine ait izolatların, *Pseudoxanthomonas*, *Schlegelella* ve *Chelatococcus* türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi

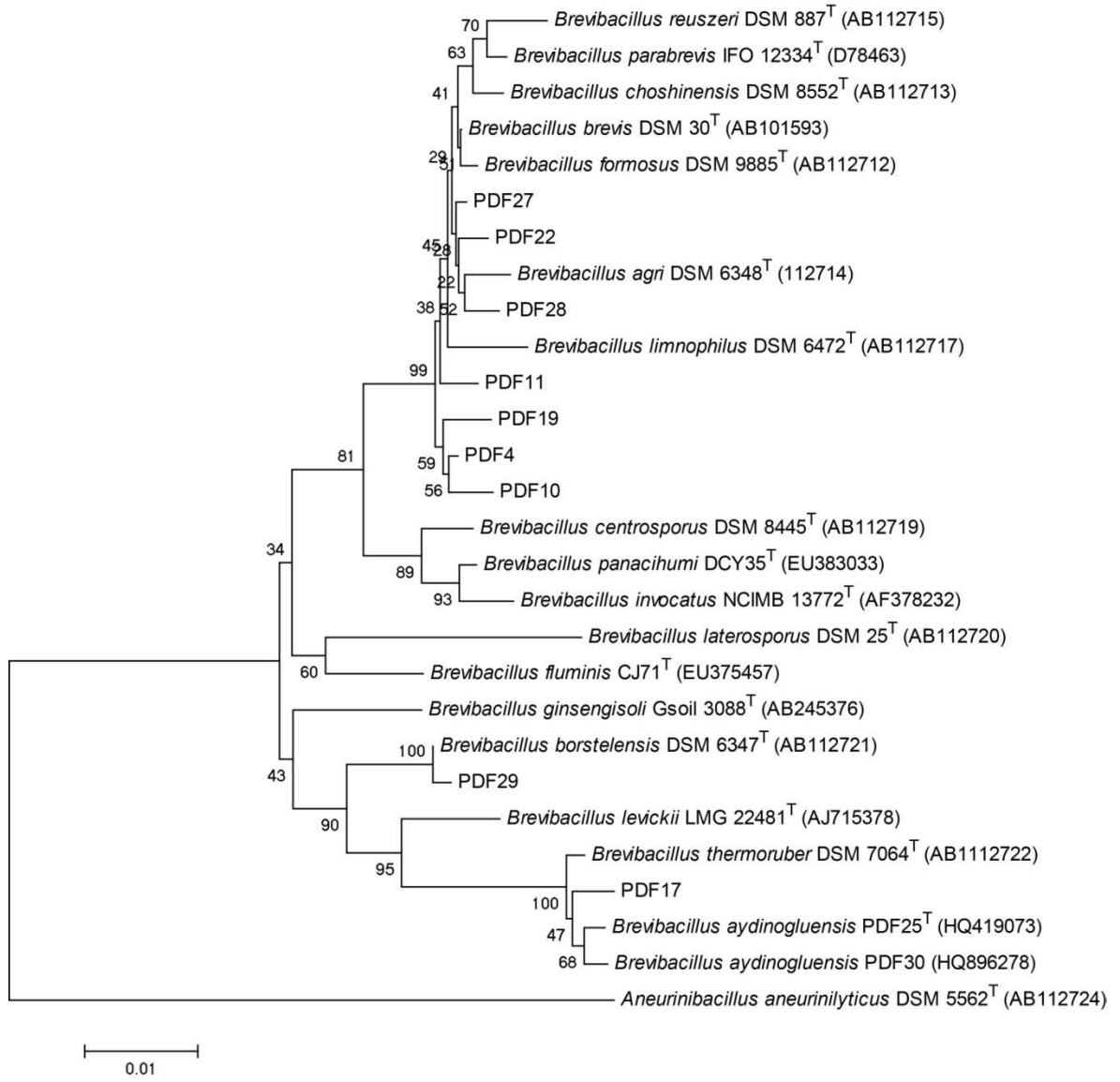
	PDF7	PDF20	PTF31
<i>Schlegelella aquatica</i>	99		
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	98		
<i>Chelatococcus daeguensis</i>		99	
<i>Chelatococcus sambhunathii</i>		99	
<i>Chelatococcus asaccharovorans</i>		96	
<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>			99
<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i>			96
<i>Pseudoxanthomonas broegbernensis</i>			96
<i>Pseudoxanthomonas daejeonensis</i>			96
<i>Pseudoxanthomonas koreensis</i>			96
<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>			95
<i>Pseudoxanthomonas kaohsiungensis</i>			95
<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>			95
<i>Pseudoxanthomonas icgebensis</i>			95
<i>Pseudoxanthomonas kalamensis</i>			94
<i>Pseudoxanthomonas indica</i>			94
<i>Pseudoxanthomonas sacheonensis</i>			93
<i>Pseudoxanthomonas spadix</i>			93
<i>Pseudoxanthomonas dokdonensis</i>			93
<i>Pseudoxanthomonas yeongjuensis</i>			93



Şekil 8. *Pseudoxanthomonas*, *Schlegelella* ve *Chelatococcus* cinslerine ait izolatların, *Pseudoxanthomonas*, *Schlegelella* ve *Chelatococcus* tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç

Tablo 7. *Brevibacillus* cinsine ait izolatların ve *Brevibacillus* türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi

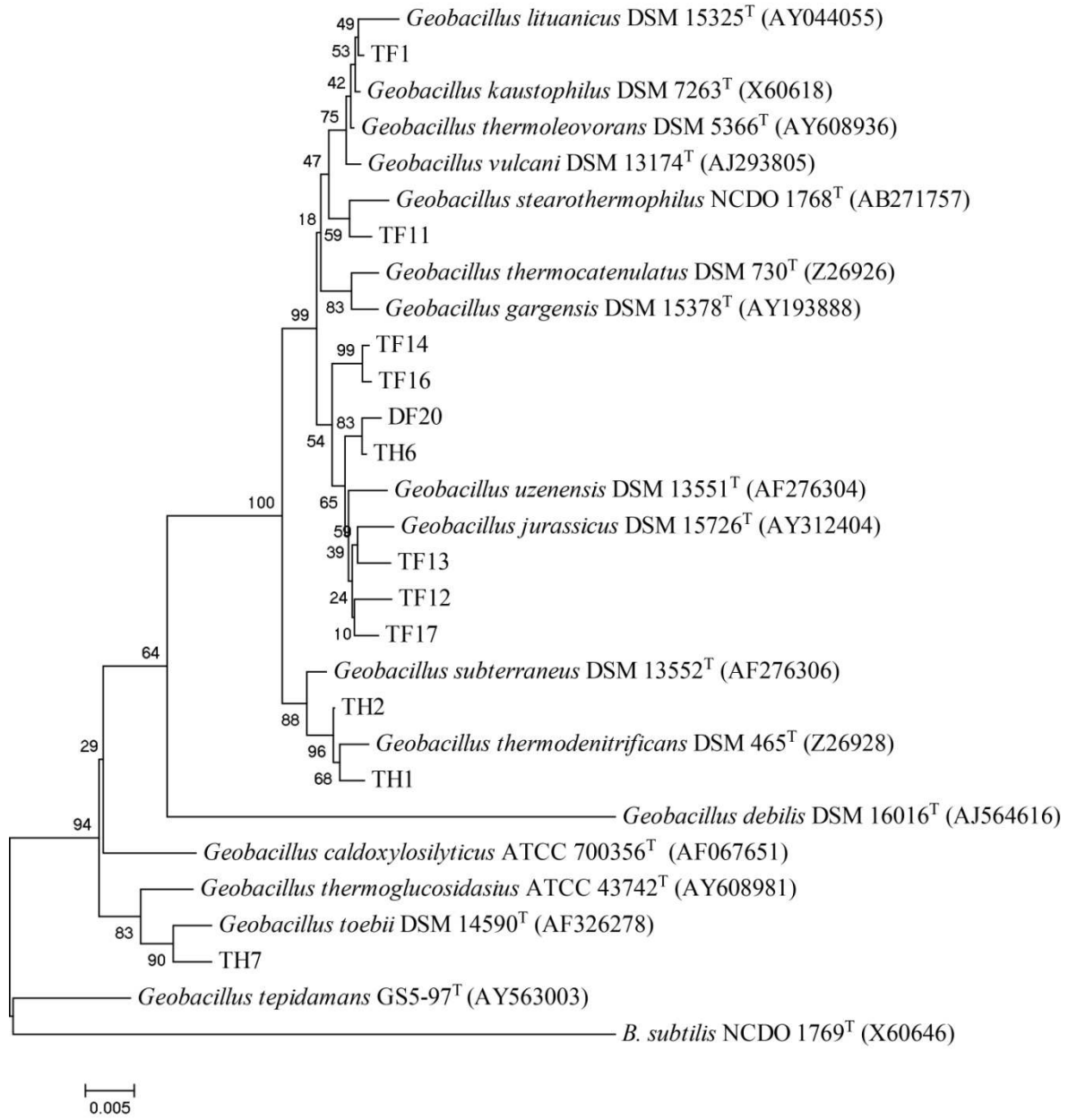
	PDF4	PDF10	PDF11	PDF17	PDF19	PDF22	PDF27	PDF28	PDF29
<i>Brevibacillus brevis</i>	99	99	99	93	99	99	99	99	96
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	99	98	99	93	98	98	99	98	95
<i>Brevibacillus formosus</i>	99	98	99	93	98	99	99	99	96
<i>Brevibacillus agri</i>	98	98	98	93	98	99	99	99	96
<i>Brevibacillus limnophilus</i>	98	98	98	95	98	98	98	98	96
<i>Brevibacillus choshinensis</i>	98	98	98	93	98	99	99	99	96
<i>Brevibacillus reuszeri</i>	98	98	98	93	98	98	99	98	96
<i>Brevibacillus panacihumi</i>	98	97	97	94	97	97	97	97	97
<i>Brevibacillus invocatus</i>	97	97	97	94	97	97	97	97	97
<i>Brevibacillus centrosporus</i>	97	97	97	94	97	98	98	97	97
<i>Brevibacillus fluminis</i>	97	96	96	95	96	97	97	97	96
<i>Brevibacillus ginsengisoli</i>	96	96	96	95	96	96	96	96	96
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	96	96	96	95	96	96	96	96	99
<i>Brevibacillus levickii</i>	96	96	96	95	96	96	96	96	98
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	95	95	95	92	95	95	95	95	94
<i>Brevibacillus thermoruber</i>	95	94	95	99	94	94	94	94	96



Şekil 9. *Brevibacillus* tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç

Tablo 8. *Geobacillus* cinsine ait izolatların, *Geobacillus* türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi

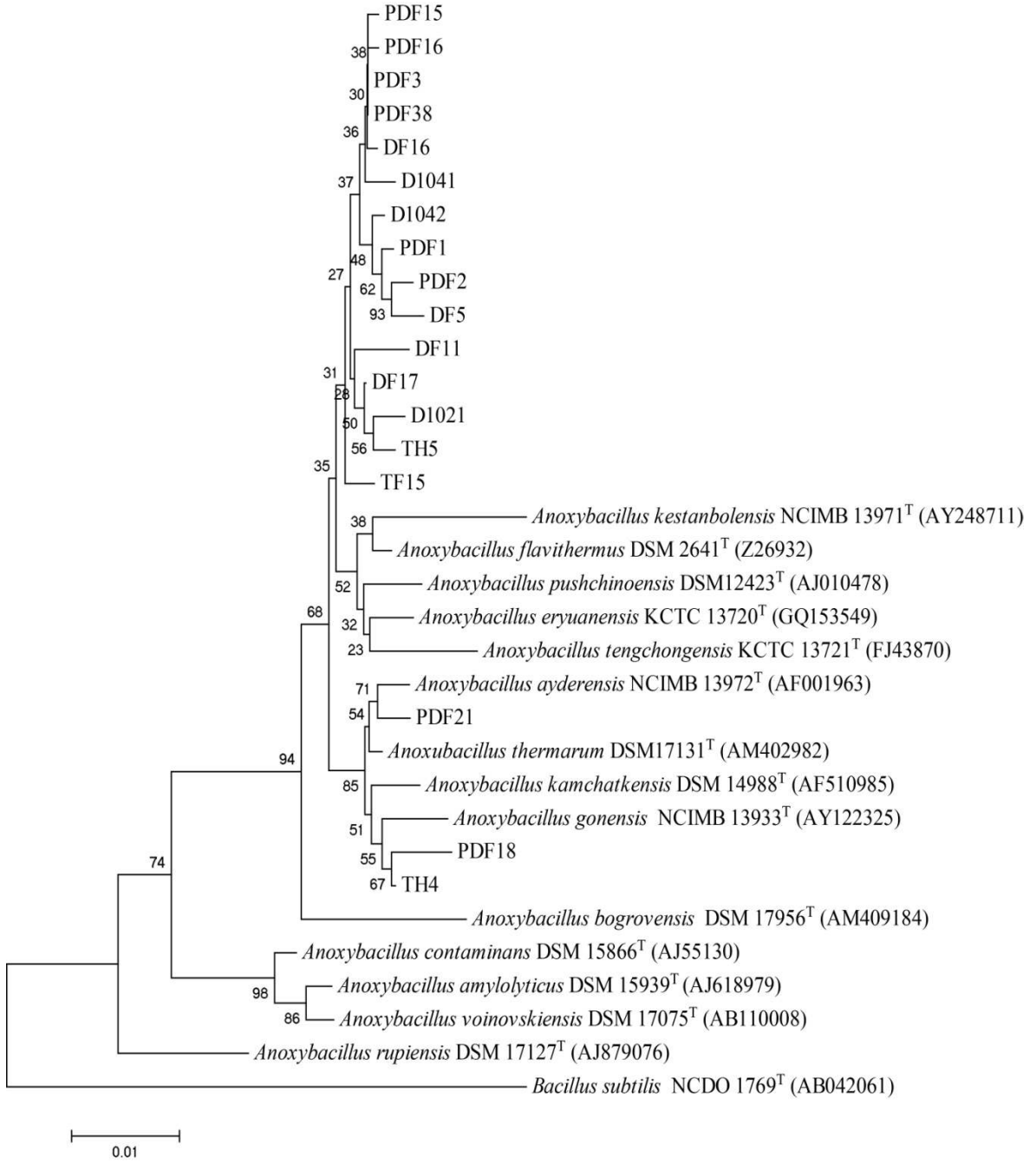
	DF20	TF1	TF11	TF12	TF13	TF14	TF16	TF17	TH1	TH2	TH6	TH7
<i>Geobacillus jurassicus</i>	99	98	98	99	99	99	99	99	98	98	99	96
<i>G. stearothermophilus</i>	99	99	99	99	98	98	99	99	98	98	99	96
<i>G. thermoleovorans</i>	99	100	99	99	99	99	99	99	98	98	99	96
<i>G. vulcani</i>	99	100	99	99	98	99	98	99	98	98	99	96
<i>G. uzenensis</i>	99	98	98	99	99	99	99	99	98	98	99	96
<i>G. thermocatenulatus</i>	99	99	99	98	98	99	99	99	98	98	99	96
<i>G. kaustophilus</i>	99	100	99	99	98	99	98	99	98	98	99	96
<i>G. gargensis</i>	98	99	99	98	98	99	99	98	98	98	99	96
<i>G. lituanicus</i>	98	100	99	98	98	98	98	98	97	98	98	96
<i>G. subterraneus</i>	98	99	98	98	98	98	98	98	99	99	98	97
<i>G. thermodenitrificans</i>	98	98	98	98	98	98	98	98	99	99	98	96
<i>G. caldoxylosilyticus</i>	96	96	96	96	96	96	96	96	97	97	96	99
<i>G. thermoglucosidasius</i>	96	96	96	96	96	96	96	96	97	97	96	98
<i>G. toebii</i>	96	96	96	96	96	96	96	96	97	97	96	99
<i>G. tepidamans</i>	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	97
<i>G. debilis</i>	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	94



Şekil 10. *Geobacillus* tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç

Tablo 9. *Anoxybacillus* cinsine ait izolatların, *Anoxybacillus* türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi

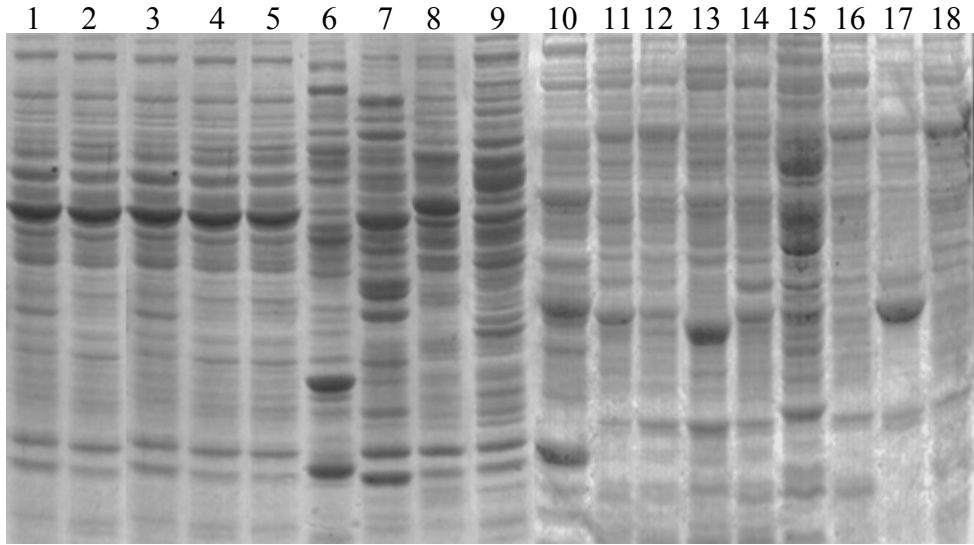
	PDF1	PDF2	PDF3	PDF15	PDF16	PDF18	PDF21	PDF38	TF15	TH4	TH5	D1021	D1041	D1042	DF5	DF11	DF16	DF17
<i>A. eryuanensis</i>	99	98	99	99	99	97	98	99	98	98	99	98	99	99	98	98	98	99
<i>A. pushchinoensis</i>	99	99	99	99	99	97	98	99	98	98	99	99	99	99	98	98	98	99
<i>A. kamchatkensis</i>	99	98	99	99	99	99	99	99	99	99	98	98	99	98	98	98	98	99
<i>A. ayderensis</i>	98	98	99	99	99	99	99	99	99	99	98	98	99	99	98	98	98	99
<i>A. tengchongensis</i>	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
<i>A. gonensis</i>	98	98	98	98	98	98	99	98	98	99	98	98	98	98	98	98	98	98
<i>A. flavithermus</i>	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98
<i>A. kestanbolensis</i>	97	97	98	98	98	97	97	98	97	97	98	98	98	98	97	97	98	98
<i>A. contaminans</i>	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	96	97	97	97	97	97	97
<i>A. bogrovensis</i>	96	96	97	97	97	95	96	97	96	96	96	97	97	96	96	96	97	96
<i>A. voinovskiensis</i>	96	96	97	97	97	97	97	97	97	97	96	96	97	96	96	96	97	96
<i>A. amylolyticus</i>	95	95	96	95	96	96	96	96	96	96	95	95	96	95	95	95	95	95
<i>A. rupiensis</i>	95	95	95	95	95	95	95	95	96	96	95	95	95	95	95	95	95	95
<i>A. thermarum</i>	98	98	99	99	99	99	99	99	98	99	98	99	97	98	98	98	99	99



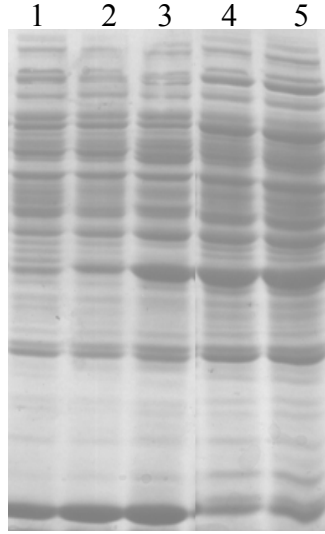
Şekil 11. *Anoxybacillus* tür ve izolatlarının 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç.

3.3. İzolatların Çözünabilir Protein Profillerinin Belirlenmesi

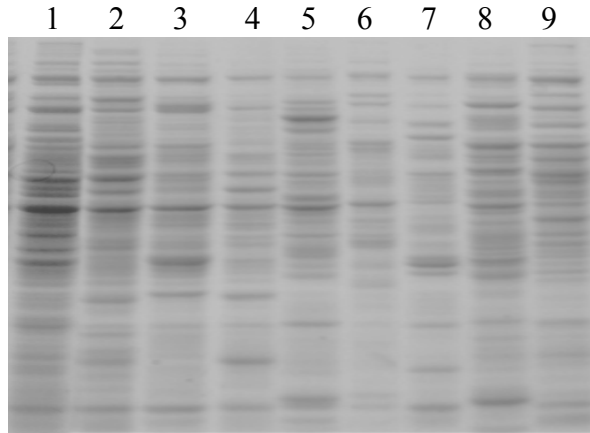
Anoxybacillus, *Brevibacillus*, *Geobacillus* ve *Thermus* cinslerine ait 44 izolatın çözünabilir proteinleri izole edildi ve % 12'lik SDS-PAGE jeline yüklenerek ayrıldılar. Her cinse ait izolatlar, kendi aralarında gruplandırılarak ayrı ayrı jellere yüklendiler. Şekil 12'de görülen protein profilleri incelendiğinde, *Anoxybacillus* cinsine ait 18 izolattan 5 tanesinin benzer protein profili gösterdiği, diğer 13 *Anoxybacillus* izolatının ise birbirlerinden farklı protein profili gösterdiği belirlendi. Şekil 13'deki *Thermus* cinsine ait izolatların protein profilleri incelendiğinde, *Thermus* cinsine ait 5 izolatın da benzer protein profillerine sahip oldukları gözlemlendi. Şekil 14 ve 15'da görülen protein profilleri incelendiğinde, *Brevibacillus* ve *Geobacillus* cinslerine ait izolatlarının her birinden farklı protein profillerine sahip oldukları gözlemlendi.



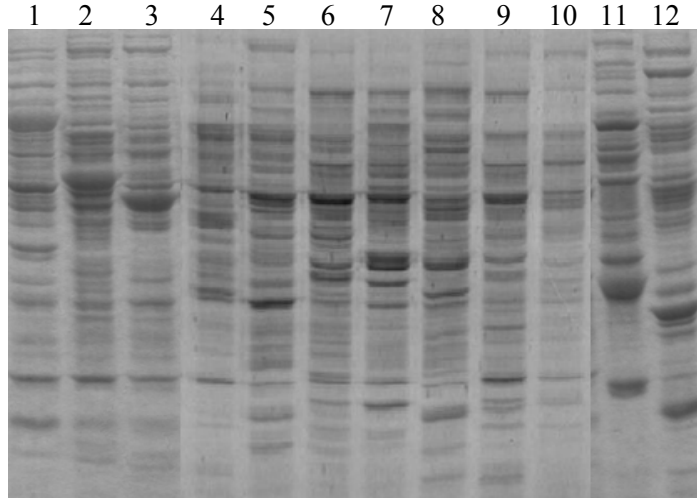
Şekil 12. *Anoxybacillus* cinsine ait olan 18 izolattan saflaştırılan çözünabilir hücre proteinlerinin % 12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. DF5, 2. DF11, 3. DF16, 4. DF17, 5. D1041, 6. D1042, 7. D1021, 8. PDF1, 9. PDF2, 10. PDF3, 11. PDF15, 12. PDF16, 13. PDF18, 14. PDF21, 15. PDF38, 16. TF15, 17. TH4, 18. TH5



Şekil 13. *Thermus* cinsine ait olan 12 izolattan saflaştırılan çözünebilir hücre proteinlerinin % 12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. TF2, 2. TF3, 3. TF5, 4. TF6, 5. TF7



Şekil 14. *Brevibacillus* cinsine ait olan 9 izolattan saflaştırılan çözünebilir hücre proteinlerinin % 12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. PDF4, 2. PDF10, 3. PDF11, 4. PDF17, 5. PDF19, 6. PDF22, 7. PDF27, 8. PDF28, 9. PDF29



Şekil 15. *Geobacillus* cinsine ait olan 12 izolattan saflaştırılan çözünebilir hücre proteinlerinin % 12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. DF20, 2. TF1, 3. TF11, 4. TF12, 5. TF13, 6. TF14, 7. TF16, 8. TF17, 9. TH1, 10. TH2, 11. TH6, 12. TH7

3.4. *Brevibacillus* Cinsine Ait İzolatların 16S rRNA Çok Değişken (HV) Bölgelerinin Analizi

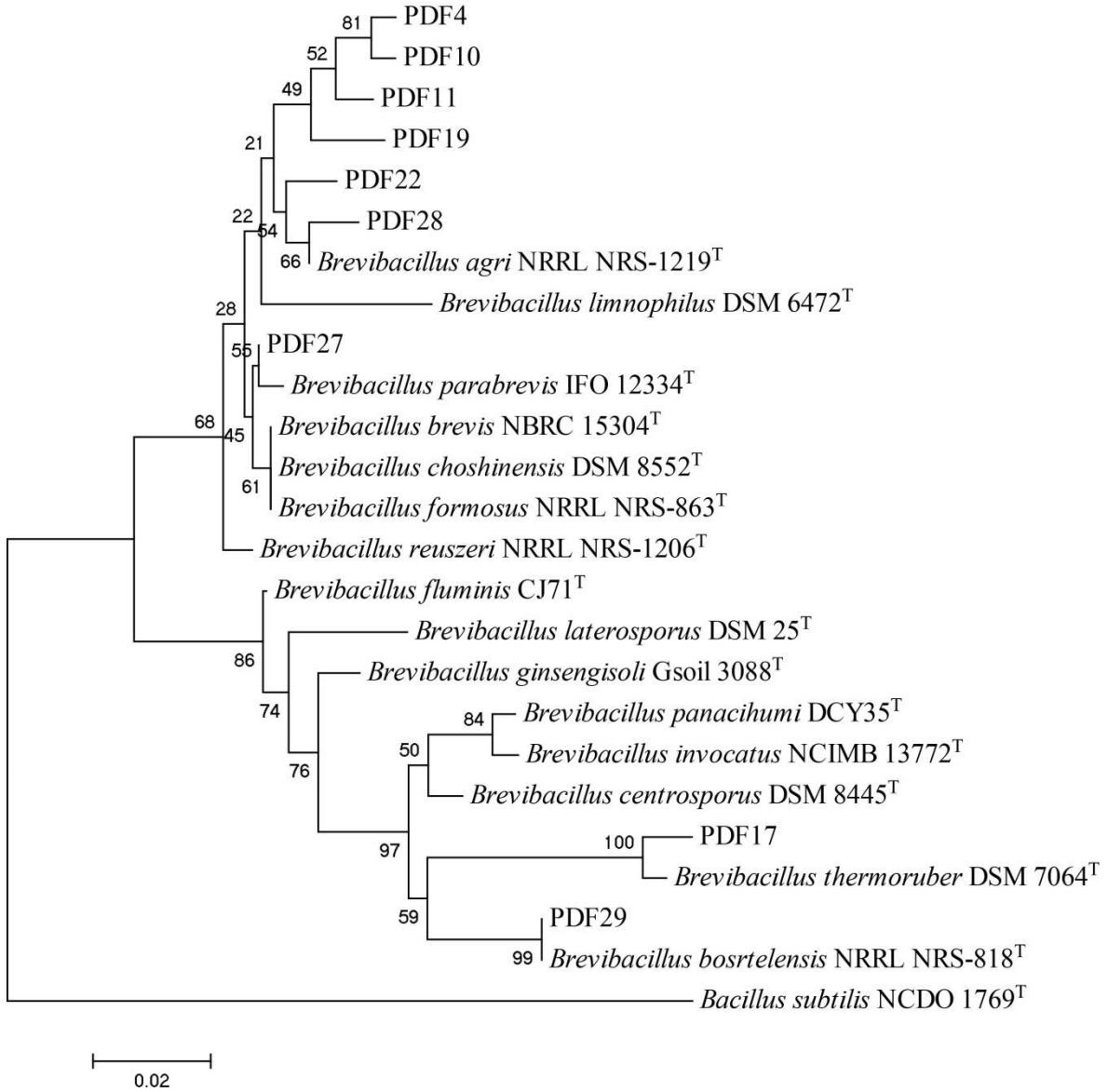
Brevibacillus cinsine ait dokuz izolatın HV bölgesi, 1400 bp uzunluğundaki 16S rRNA gen sıralarından elde edildi. *Bacillus subtilis* 16S rRNA gen sırası referans alınarak, 70 ila 344 nolu nükleotitlerin arasındaki 275 bp'lik bölge (HV bölgesi), 16S rRNA gen sıralarından elde edildi. *Brevibacillus* cinsine ait dokuz izolatın HV bölgesi, CLUSTAL W Multiple sequence Alignment programı kullanılarak, *Brevibacillus* türlerinin HV bölgeleri ile karşılaştırıldı ve elde edilen benzerlik değerleri Tablo 10'da gösterilmiştir. Elde edilen benzerlik değerleri incelendiğinde, PDF17 izolatının % 98 oranında *B. thermoruber* DSM 7064^T'e; PDF22 ve PDF27 izolatlarında % 98 oranında *B. agri*; PDF29 izolatında % 100 oranında *B. borstelensis*'e benzerlik gösterdiği; PDF4, PDF10 ve PDF19 izolatlarının ise *Brevibacillus* türlerine en fazla % 96 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. PDF11 izolatında en fazla % 97 oranında *B. parabrevis*'e benzerlik gösterdiği gözlemlendi.

Ayrıca, *Brevibacillus* cinsine ait dokuz izolatın, *Brevibacillus* türleriyle arasındaki ilişkileri ortaya koymak amacıyla HV bölgesine ait baz dizinleri MEGA 4 paket programı kullanılarak değerlendirildi ve neighbour-joining programıyla HV bölgeleri açısından

yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç çizildi (Şekil 16). Filogenetik ağaç incelendiğinde, dizin benzerliklerinde ifade edildiği gibi, PDF17 izolatının *B. thermoruber* DSM 7064^T ile PDF22 ve PDF27 izolatlarının *B. agri*, PDF27 izolatının *B. parabrevi* türüyle yakın ilişkili oldukları, PDF4, PDF10, PDF11 ve PDF19 izolatlarının ise birbirleriyle yakın ilişkili oldukları ve *Brevibacillus* türlerinden ayrı bir dal oluşturdukları görülmektedir.

Tablo 10. *Brevibacillus* cinsine ait 9 izolatın, *Brevibacillus* türlerinin 16S rRNA ve HV bölgeleri arasındaki benzerliklerinin yüzdesi

	PDF4		PDF10		PDF11		PDF17		PDF19		PDF22		PDF27		PDF28		PDF29	
	16S rRNA	HV	16S rRNA	HV	16S rRNA	HV	16S rRNA	HV	16S rRNA	HV	16S rRNA	HV	16S rRNA	HV	16S rRNA	HV	16S rRNA	HV
<i>B. brevis</i>	99	93	99	93	99	94	93	86	99	93	99	95	99	97	99	94	96	87
<i>B. parabrevi</i>	99	96	98	96	99	97	93	86	98	96	98	94	99	98	98	94	95	85
<i>B. formosus</i>	99	93	98	93	99	94	93	87	98	93	99	96	99	96	99	95	96	88
<i>B. agri</i>	98	94	98	94	98	94	93	85	98	93	99	98	99	95	99	98	96	90
<i>B. limnophilus</i>	98	93	98	93	98	93	95	88	98	93	98	93	98	93	98	93	96	86
<i>B. choshinensis</i>	98	93	98	93	98	93	93	85	98	93	99	96	99	96	99	96	96	89
<i>B. reuszeri</i>	98	94	98	95	98	95	93	87	98	94	98	96	99	97	98	96	96	88
<i>B. panacihumi</i>	98	89	97	89	97	89	94	92	97	89	97	87	97	91	97	87	97	93
<i>B. invocatus</i>	97	89	97	89	97	88	94	92	97	89	97	87	97	90	97	88	97	93
<i>B. centrosporus</i>	97	87	97	87	97	87	94	91	97	87	98	88	98	88	97	88	97	93
<i>B. fluminis</i>	97	90	96	90	96	90	95	90	96	91	97	94	97	92	97	94	96	93
<i>B. ginsengisoli</i>	96	91	96	91	96	90	95	90	96	91	96	88	96	92	96	88	96	91
<i>B. borstelensis</i>	96	85	96	85	96	85	95	92	96	86	96	89	96	87	96	89	99	100
<i>B. levickii</i>	96	89	96	89	96	89	95	95	96	89	96	87	96	88	96	89	98	97
<i>B. laterosporus</i>	95	90	95	90	95	90	92	88	95	91	95	88	95	92	95	87	94	90
<i>B. thermoruber</i>	95	88	94	88	95	87	99	98	94	88	94	86	94	88	94	86	96	92



Şekil 16. *Brevibacillus* tür ve izolatlarının HV bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç.

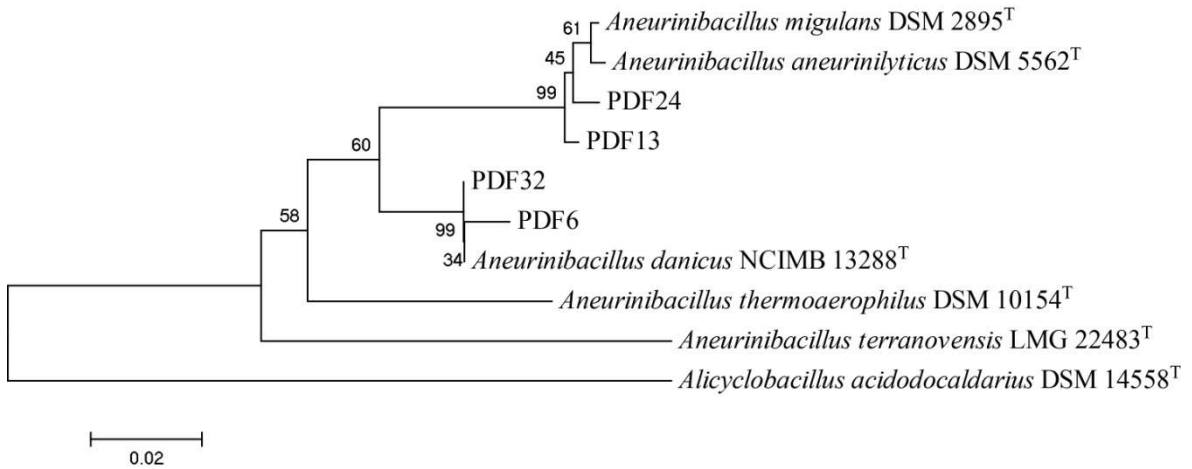
3.5. *Aneurinibacillus* Cinsine Ait İzolatların 16S rRNA Çok Değişken (HV) Bölgelerinin Analizi

Aneurinibacillus cinsine ait dört izolatın HV bölgesi, 1400 bp uzunluğundaki 16S rRNA gen sıralarından elde edildi. Dört izolattan elde edilen HV bölgeleri, CLUSTAL W Multiple sequence Alignment programı kullanılarak, *Aneurinibacillus* türlerinin HV bölgeleri ile karşılaştırıldı ve elde edilen benzerlik değerleri Tablo 11’de gösterildi.

Tablo 11. *Aneurinibacillus* cinsine ait 4 izolatın, *Aneurinibacillus* türlerinin 16S rRNA ve HV bölgeleri arasındaki benzerliklerinin yüzdesi

	PDF6		PDF13		PDF24		PDF32	
	16S rRNA	HV	16S rRNA	HV	16S rRNA	HV	16S rRNA	HV
<i>A. danicus</i>	99	99	97	94	98	93	99	100
<i>A. aneurinilyticus</i>	97	93	99	98	99	98	98	94
<i>A. migulanus</i>	97	93	99	99	99	99	97	93
<i>A. thermoaerophilus</i>	96	91	95	89	95	89	96	92
<i>A. terranovensisi</i>	95	88	95	90	96	91	96	88

Elde edilen benzerlik değerleri incelendiğinde, PDF6 ve PDF32 izolatlarının *A. danicus*'a % 99 ve % 100 oranında benzerlik gösterdikleri; PDF13 ve PDF24 izolatlarının da *A. aneurinilyticus*'a % 99 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, *Aneurinibacillus* cinsine ait dört izolatın HV bölgesine ait baz dizinleri açısından, *Aneurinibacillus* türleriyle yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç çizildi (Şekil 17).

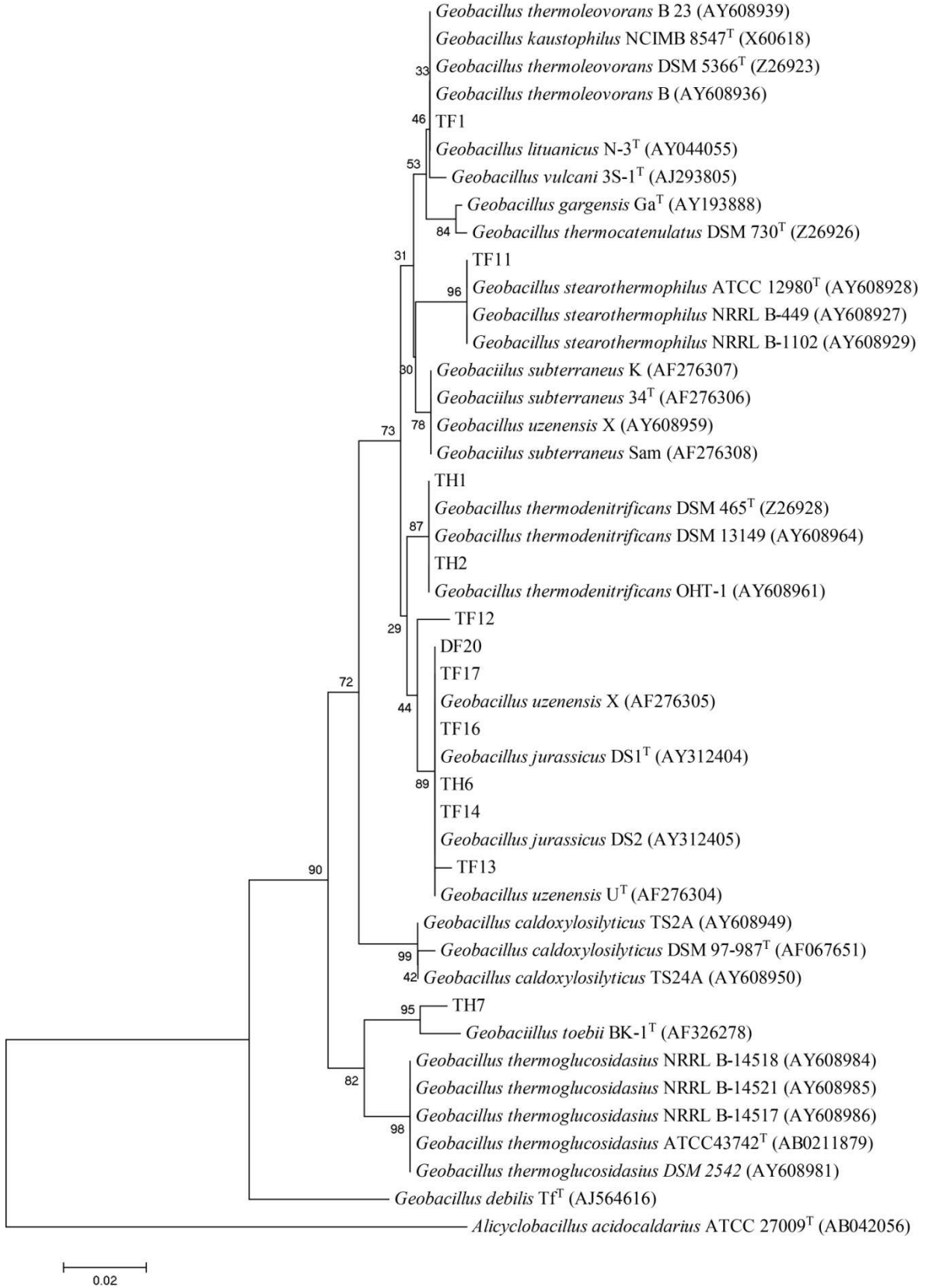


Şekil 17. *Aneurinibacillus* tür ve izolatlarının HV bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç.

3.6. *Geobacillus* Cinsine Ait İzolatların Bazı Genotipik Özellikleri

3.6.1. 16S rRNA Çok Değişken (HV) Bölgelerinin Analizi

Geobacillus cinsine ait 12 izolatın HV bölgesi, 1400 bp uzunluğundaki 16S rRNA gen sıralarından elde edildi. CLUSTAL W Multiple sequence Alignment programı kullanılarak, oniki izolattın HV bölgeleri, *Geobacillus* türlerinin HV bölgeleri ile karşılaştırıldı ve elde edilen benzerlik değerleri Tablo 12’de gösterildi. Ayrıca, *Geobacillus* cinsine ait 12 izolatın HV bölgesine ait baz dizinleri açısından, *Geobacillus* türleriyle yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç çizildi (Şekil 18). Benzerlik tablosu ve filogenetik ağaç incelendiğinde, TF1 izolatının *G. kaustophilus*, *G. thermoleoverans*, *G. lituanicus*, *G. vulcani* ile yakın ilişki olduğu, TF11 izolatının *G. stearothermophilus* ile, TH1 ve TH2 izolatların *G. thermodenitrificans* ile, TH7 izolatında *G. toebii* ile yakın ilişkili olduğu görüldü. TH6, TF13, TF14, TF16, TF17 ve DF20 izolatlarının birbirleriyle yakın ilişkili oldukları ve bu izotların *G. jurassicus* ve *G. uzenensis* ile bir grup oluşturduğu belirlendi. TF12 izolatının ise diğer izolatlardan ve *Geobacilus* türlerinden ayrı bir dal oluşturduğu görülmektedir.

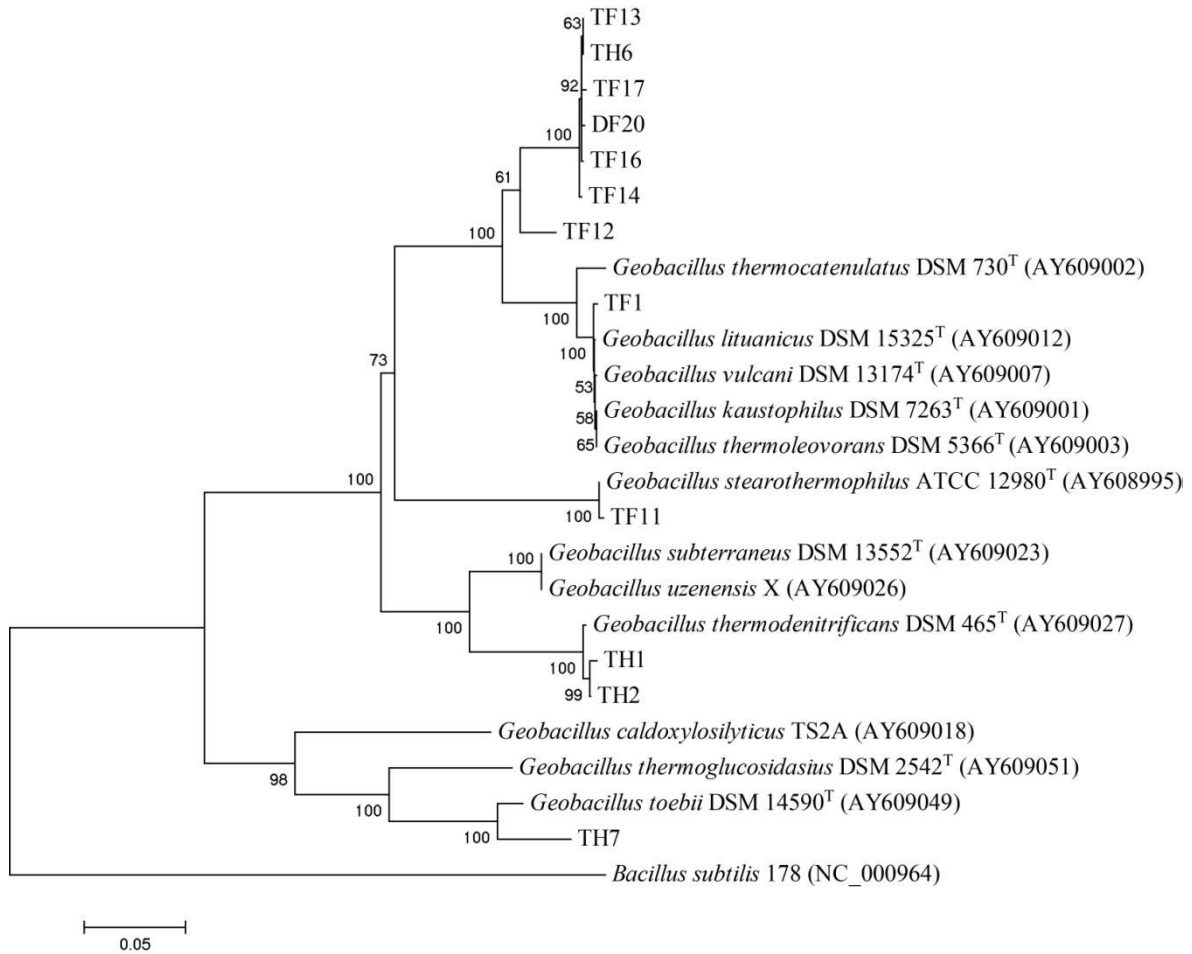


Şekil 18. *Geobacillus* tür ve izolatlarının HV bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç.

3.6.2. *recN* Geni Analizleri

Geobacillus cinsine ait olan 12 izolatın genomik DNA'sı F1-2 ve R1-1 primerleri ile PCR'a tabi tutularak, *recN* genleri elde edildi. Elde edilen *recN* sıraları, CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment programı kullanılarak *Geobacillus* türlerinin *recN* sıralarıyla ve birbirleriyle karşılaştırıldı. Elde edilen veriler Tablo 12'de gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, TH1 ve TH2 izolatlarının % 99 *G. thermodenitrificans*'a, TF11 izolatının % 99 *G. stearothermophilus*'a, TF1 izolatının ise *G. kaustophilus*, *G. thermoleoverans*, *G. lituanicus* ve *G. vulcani* bakterilerine % 99-100 oranında benzerlik gösterdiği görülmektedir. TH7 izolatının % 95 oranında *G. toebii*'ye benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. TF13, TF14, TF16, TF17, DF20 ve TH6 izolatlarının birbirlerine % 99 benzerlik gösterirken, en fazla *G. kaustophilus*, *G. thermoleoverans*, *G. thermocatenulatus*, *G. lituanicus* ve *G. vulcani* türlerine % 91 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. TF12 izolatının, diğer izolatlara ve *Geobacillus* türlerine en fazla % 95 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Ayrıca, *Geobacillus* cinsine ait 12 izolatın *recN* geni baz dizinleri açısından, *Geobacillus* türleriyle yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç çizildi (Şekil 19). Filogenetik ağaç incelendiğinde, TF1 izolatının *G. kaustophilus*, *G. thermoleoverans*, *G. thermocatenulatus*, *G. lituanicus* ve *G. vulcani* ile bir grup oluşturduğu, TF11 izolatının *G. stearothermophilus* ile bir dal oluşturduğu, TH1 ve TH2 izolatlarının da *G. thermodenitrificans* ile kümeleştiği görülmektedir. TF13, TF14, TF16, TF17, DF20 ve TH6 izolatlarının bir grup oluşturup, diğer izolatlardan ve *Geobacillus* türlerinden ayrı bir dal oluşturduğu görülmektedir. TF12 izolatının da, *Geobacillus* türlerinden ve diğer izolatlardan ayrı bir dal oluşturduğu görülmektedir.



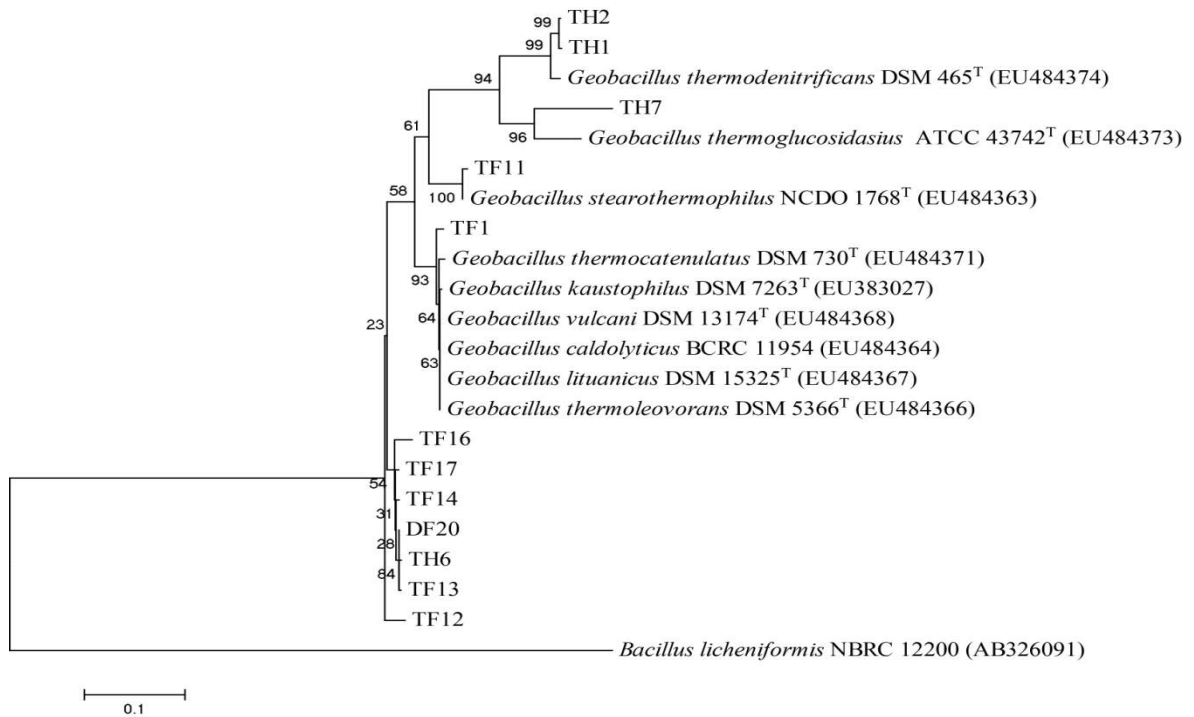
Şekil 19. *Geobacillus* tür ve izolatlarının *recN* genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç.

3.6.3. *rpoB* Geni Analizleri

Geobacillus cinsine ait 12 izolatın genomik DNA'sı Sambrook ve arkadaşlarının (1989) prosedürüne göre izole edildikten sonra rpoB1698F ve rpoB2041R primerleri kullanılarak PCR ile *rpoB* genleri çoğaltıldı. Elde edilen yaklaşık 400 bp'lik rpoB gen dizinleri, CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment programı kullanılarak *Geobacillus* türlerinin *rpoB* sıralarıyla ve birbirleriyle karşılaştırıldı (Tablo 12). Benzerlik tablosu incelendiğinde, TH1 ve TH2 izolatının *G. thermodenitrificans*'a % 98 oranında, TF11 izolatının *G. stearothermophilus*'a % 99 oranında, TF1 izolatının da *G. kaustophilus*, *G. thermoleoverans*, *G. thermocatenuatus*, *G. lituanicus*, *G. vulcani* ve *G. caldoolyticus* türlerine % 98-99 oranında yüksek benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. TF13, TF14, TF16, TF17, DF20 ve TH6 izolatlarının birbirlerine % 98-99 oranında yüksek benzerlik

gösterirken *Geobacillus* türlerine en fazla % 93 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Geobacillus cinsine ait 12 izolatın *rpoB* geni baz dizinleri açısından, *Geobacillus* türleriyle yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç incelendiğinde, *recN* ağaçlarını destekler nitelikte, TH1 ve TH2 izolatlarının *G. thermodenitrificans* ile bir grup oluşturduğu, TF11 izolatının *G. stearothermophilus* ile bir dal oluşturduğu, TF1 izolatının *G. kaustophilus*, *G. thermoleovorans*, *G. thermocatenulatus*, *G. lituanicus*, *G. vulcani* ve *G. caldolyticus* türleriyle bir kümelenme meydana getirdiği görüldü (Şekil 20). Ayrıca, *recN* ağaçlarını destekler nitelikte TF13, TF14, TF16, TF17, DF20 ve TH6 izolatlarının bir grup oluşturduğu, TF12 izolatının diğer izolatlardan ve *Geobacillus* izolatlarından ayrı bir dal oluşturduğu görülmektedir. TH7 izolatının *rpoB* ağacında, en yakın akrabasının *G. thermoglucosidasius* olduğu görülmektedir, ancak 16S rRNA, HV ve *rpoB* analizlerine göre TH7 izolatının *G. toebii* ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir. *G. toebii* türünün *rpoB* gen analizi yapılmadığı için, *rpoB* ağacında bu tür kullanılamamıştır ve bu nedenle TH7 izolatının en yakın akrabası olarak *G. thermoglucosidasius* olarak görülmektedir.



Şekil 20. *Geobacillus* tür ve izolatlarının, kısmi *rpoB* gen dizinleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç.

Tablo 12. *Geobacillus* cinsine ait 12 izolatın, *Geobacillus* türlerinin 16S rRNA, HV, *recN* ve *rpoB* genleri arasındaki benzerliklerinin yüzdesi

	DF20				TF1				TF11			
	16S rRNA	HV	<i>recN</i>	<i>rpoB</i>	16S rRNA	HV	<i>recN</i>	<i>rpoB</i>	16S rRNA	HV	<i>recN</i>	<i>rpoB</i>
<i>G. jurassicus</i>	99	98	-	-	98	96	-	-	98	96		
<i>G. stearothermophilus</i>	99	97	83	92	99	97	82	92	99	99	99	99
<i>G. thermoleovorans</i>	99	97	91	93	100	100	99	99	99	97	82	93
<i>G. vulcani</i>	99	97	91	93	100	98	99	99	99	97	82	93
<i>G. uzenensis</i>	99	98	85	-	98	97	82	-	98	97	83	
<i>G. thermocatenulatus</i>	99	96	91	93	99	97	97	98	99	96	83	93
<i>G. kaustophilus</i>	99	97	91	93	100	100	99	98	99	96	82	93
<i>G. gargensis</i>	98	96	-	-	99	98	-	-	99	96		
<i>G. lituanicus</i>	98	96	91	93	100	99	99	99	99	96	82	93
<i>G. subterraneus</i>	98	96	85	-	99	98	82	-	98	97	83	
<i>G. thermodenitrificans</i>	98	95	82	83	98	97	82	84	98	96	82	86
<i>G. caldoxylosilyticus</i>	96	94	74	93	96	94	74	99	96	94	73	93
<i>G. thermoglucosidasius</i>	96	93	73	82	96	92	73	81	96	94	74	82
<i>G. toebii</i>	96	92	72	-	96	94	72	-	96	93	72	
<i>G. tepidamans</i>	95	94			95	96			95	94		
<i>G. debilis</i>	93	89			93	89			93	91		

Tablo 12'in Devamı

	TF12				TF13				TF14			
	16S rRNA	HV	recN	rpoB	16S rRNA	HV	recN	rpoB	16S rRNA	HV	recN	rpoB
<i>G. jurassicus</i>	99	97			99	99			99	99		
<i>G. stearothermophilus</i>	99	96	84	92	98	96	84	92	98	97	84	92
<i>G. thermoleovorans</i>	99	97	94	92	99	96	91	93	99	97	91	93
<i>G. vulcani</i>	99	97	94	92	98	96	91	93	99	97	91	93
<i>G. uzenensis</i>	99	97	84		99	98	84		99	100	84	
<i>G. thermocatenulatus</i>	98	95	93	92	98	95	91	93	99	96	91	93
<i>G. kaustophilus</i>	99	97	94	92	98	96	91	93	99	97	91	93
<i>G. gargensis</i>	98	96			98	94			99	96		
<i>G. lituanicus</i>	98	97	94	92	98	96	91	93	98	97	91	93
<i>G. subterraneus</i>	98	96	84		98	96	84		98	97	84	
<i>G. thermodenitrificans</i>	98	97	83	82	98	96	82	83	98	97	82	83
<i>G. caldoxylosilyticus</i>	96	93	74	92	96	94	74	93	96	95	74	93
<i>G. thermoglucosidasius</i>	96	94	73	81	96	93	73	82	96	93	73	82
<i>G. toebii</i>	96	93	72		96	93	72		96	93	72	
<i>G. tepidamans</i>	95	94			95	94			95	95		
<i>G. debilis</i>	93	90			93	89			93	91		

Tablo 12'in Devamı

	TF16				TF17				TH1			
	16S rRNA	HV	recN	rpoB	16S rRNA	HV	recN	rpoB	16S rRNA	HV	recN	rpoB
<i>G. jurassicus</i>	99	99			99	99			98	96		
<i>G. stearothermophilus</i>	99	97	84	91	99	96	84	91	98	96	82	85
<i>G. thermoleovorans</i>	99	97	91	92	99	96	91	93	98	96	82	84
<i>G. vulcani</i>	98	97	91	92	99	96	91	93	98	96	81	84
<i>G. uzenensis</i>	99	100	85		99	99	84		98	97	91	
<i>G. thermocatenulatus</i>	99	96	91	91	99	96	91	93	98	96	82	84
<i>G. kaustophilus</i>	98	97	91	92	99	96	91	93	98	96	82	84
<i>G. gargensis</i>	99	96			98	95			98	95		
<i>G. lituanicus</i>	98	97	91	92	98	97	91	93	97	97	81	84
<i>G. subterraneus</i>	98	97	85		98	96	84		99	97	91	
<i>G. thermodenitrificans</i>	98	97	83	84	98	97	82	83	99	99	99	98
<i>G. caldoxylosilyticus</i>	96	95	74	92	96	95	74	93	97	96	73	84
<i>G. thermoglucosidasius</i>	96	93	73	82	96	94	73	82	97	93	74	86
<i>G. toebii</i>	96	93	72		96	93	72		97	93	74	
<i>G. tepidamans</i>	95	95			95	94			95	93		
<i>G. debilis</i>	93	91			93	92			93	90		

Tablo 12'in Devamı

	TH2				TH6				TH7			
	16S rRNA	HV	recN	rpoB	16S rRNA	HV	recN	rpoB	16S rRNA	HV	recN	rpoB
<i>G. jurassicus</i>	98	97			99	98			96	93		
<i>G. stearothermophilus</i>	98	97	82	86	99	97	84	92	96	94	71	81
<i>G. thermoleovorans</i>	98	97	82	84	99	97	91	93	96	94	71	80
<i>G. vulcani</i>	98	97	82	84	99	97	91	93	96	94	71	80
<i>G. uzenensis</i>	98	97	91		99	98	84		96	93	72	
<i>G. thermocatenulatus</i>	98	96	82	84	99	96	91	92	96	93	72	80
<i>G. kaustophilus</i>	98	97	82	84	99	97	91	93	96	94	71	80
<i>G. gargensis</i>	98	96			99	96			96	93		
<i>G. lituanicus</i>	98	97	82	84	98	96	91	93	96	94	71	80
<i>G. subterraneus</i>	99	97	91		98	96	84		97	94	72	
<i>G. thermodenitrificans</i>	99	99	99	98	98	95	82	83	96	93	73	85
<i>G. caldxylosilyticus</i>	97	97	74	84	96	94	74	93	99	94	81	80
<i>G. thermoglucosidasius</i>	97	94	74	86	96	93	73	82	98	96	87	88
<i>G. toebii</i>	97	93	74		96	92	72		99	98	95	
<i>G. tepidamans</i>	95	94			95	94			97	94		
<i>G. debilis</i>	93	91			93	89			94	92		

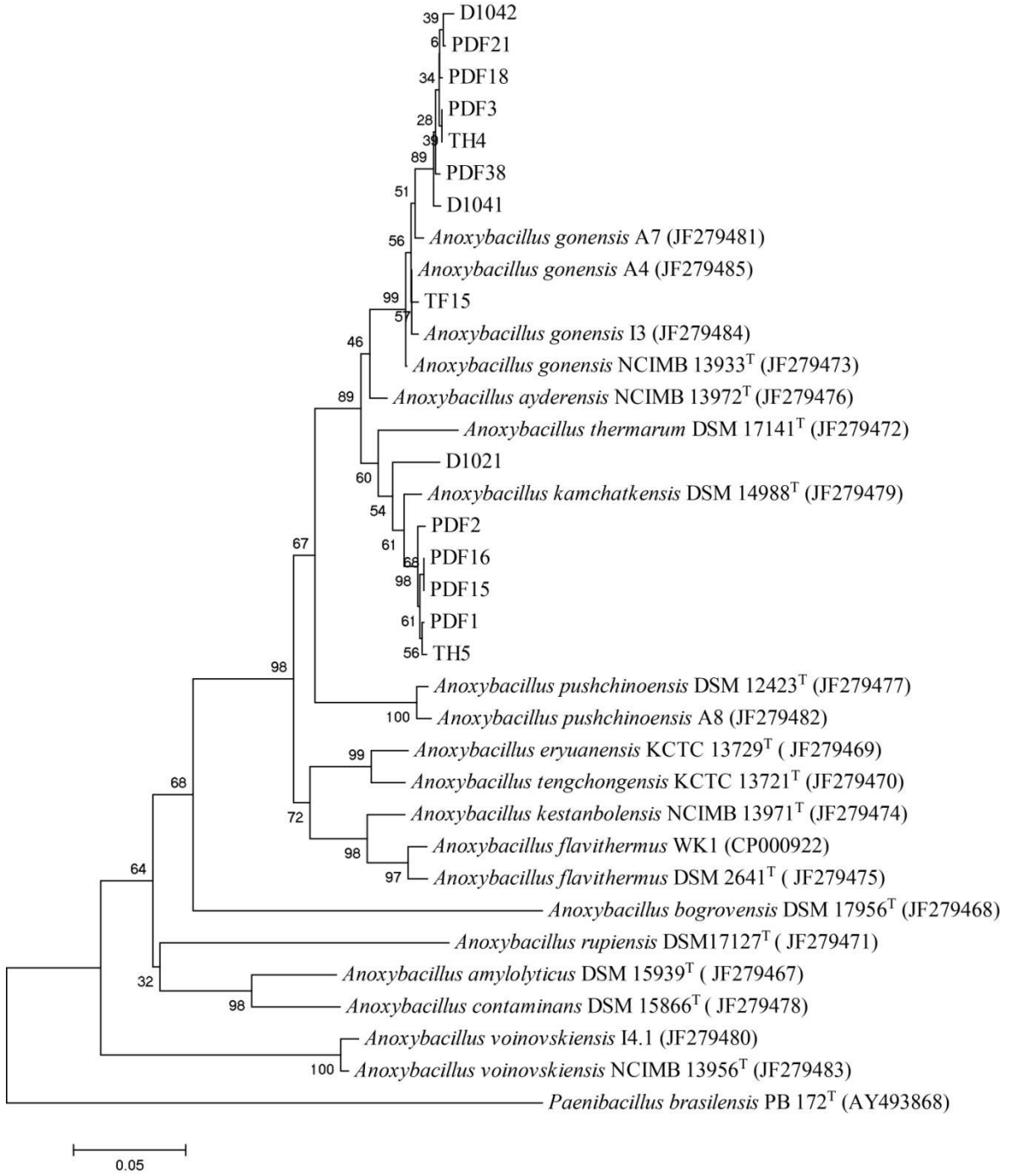
3.7. *Anoxybacillus* Cinsine Ait İzolatların Bazı Genotipik Özellikleri

3.7.1. *Anoxybacillus* Cinsine Ait İzolatların *rpoB* Gen Analizleri

Anoxybacillus cinsine ait olan 5 izolatın (DF5, DF11, DF16, DF17 ve D1041), SDS-PAGE analizi sonucunda çok benzer protein profili gösterdikleri, bu nedenle beş izolattan sadece bir tanesi (D1041) seçildi ve *rpoB* analizinde kullanıldı. SDS-PAGE analizine göre birbirlerinden farklı protein profili gösteren 14 izolatın *rpoB* gen dizinleri elde edildi ve CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment programı kullanılarak *Anoxybacillus* türlerinin *rpoB* gen dizinleriyle ve birbirleriyle karşılaştırıldı. Elde edilen benzerlik değerleri Tablo 13'de gösterilmiştir. *Anoxybacillus* cinsine ait 14 izolatın *rpoB* geni baz dizinleri açısından, *Anoxybacillus* türleriyle yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç çizildi (Şekil 21). Benzerlik tablosu ve filogenetik ağaç incelendiğinde, TF15, PDF3, PDF18, PDF21, PDF38, TH4, D1041 ve D1042 izolatlarının birbirlerine ve *A. gonensis* NCIBM 13933^T tip türü ve suşlarına % 98 ve üzerinde benzerlik gösterdiği ve filogenetik ağaçta da bu sekiz izolatın *A. gonensis* NCIBM 13933^T tip türü ve suşlarıyla bir grup

oluşturduğu görülmektedir. PDF1, PDF2, PDF15, PDF16 ve TH5 izolatlarında birbirlerine ve *A. kamchatkensis* DSM 14988^T'e % 98 ve üzeri benzerlik gösterdiği ve bu izolatlarında filogenetik ağaç üzerine *A. kamchatkensis* DSM 14988^T ile bir kümeleşme oluşturduğu belirlenmiştir. D1021 izolatının ise, *Anoxybacillus* türlerine ve diğer izolatlara en fazla % 96 oranında benzerlik gösterdiği ve filogenetik ağaç üzerinde de ayrı bir dal oluşturduğu görülmektedir.

Anoxybacillus türlerinin *rpoB* gen dizinleri karşılaştırıldığında, *Anoxybacillus* türlerinin birbirlerine en fazla % 97 oranında benzerlik gösterdiği, aynı türe ait suşlar arasında ise % 98 ve üzerinde benzerlik bulunduğu belirlenmiştir. D1021 izolatının *Anoxybacillus* türlerine en fazla % 96 oranında benzerlik göstermesi, bu izolatın yeni tür olması ihtimalini güçlendirmiştir. D1021 izolatının kesin tür tayinin yapılabilmesi için, DNA-DNA hibridizasyonlarının yapılmasına karar verilmiştir. 16S rRNA dizin analizi sonuçlarına göre D1021 izolatı % 97'in üzerinde *A. pushchinoensis* DSM 12423^T, *A. gonensis* NCIBM 13933^T, *A. eryuanensis* KCTC 13720^T, *A. ayderensis* NCIBM 13972^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. kestanbolensis* NCIBM 13971^T, *A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. tengchongensis* KCTC 13721^T, *A. thermarum* DSM 17141^T, *A. bogrovensis* DSM 17956^T'a benzerlik gösterdiği için, bu bakterilerle D1021 arasındaki DNA-DNA homolojilerinin belirlenmesine karar verildi.



Şekil 21. *Anoxybacillus* tür ve izolatlarının kısmi *rpoB* gen dizinleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç.

Tablo 13. *Anoxybacillus* cinsine ait 14 izolatın, *Anoxybacillus* türlerinin 16S rRNA ve *rpoB* genleri arasındaki benzerliklerinin yüzdesi

	PDF1		PDF2		PDF3		PDF15		PDF16		PDF18		PDF21	
	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>
<i>A. eryuanensis</i> KCTC 13720 ^T	99	87	98	87	99	89	99	87	99	87	97	88	98	88
<i>A. pushchinoensis</i> DSM 12423 ^T	99	86	99	86	99	87	99	86	99	86	97	87	98	88
<i>A. pushchinoensis</i> A8	99	87	99	87	99	87	99	87	99	87	97	87	98	87
<i>A. kamchatkensis</i> DSM 14988 ^T	99	98	98	98	99	93	99	98	99	98	99	93	99	94
<i>A. ayderensis</i> NCIBM 13972 ^T	98	95	98	95	99	96	99	95	99	95	99	95	99	96
<i>A. tengchongensis</i> KCTC 13721 ^T	98	87	98	87	98	89	98	87	98	87	97	89	98	88
<i>A. gonensis</i> NCIBM 13933 ^T	98	92	98	92	98	98	98	92	98	92	98	98	99	98
<i>A. gonensis</i> A4	98	91	98	91	98	98	98	91	98	91	98	98	99	98
<i>A. gonensis</i> A7	98	91	98	91	98	98	98	91	98	91	98	98	99	98
<i>A. gonensis</i> I3	98	91	98	91	98	98	98	91	98	91	98	98	99	98
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T	98	85	98	85	98	87	98	85	98	85	97	87	98	87
<i>A. flavithermus</i> WK	98	86	98	86	98	88	98	86	98	86	97	88	98	88
<i>A. kestanbolensis</i> NCIBM 13971 ^T	97	86	97	86	98	88	98	86	98	86	97	87	97	88
<i>A. contaminans</i> DSM 15866 ^T	97	82	97	83	97	78	97	82	97	82	97	78	97	78
<i>A. bogrovensis</i> DSM 17956 ^T	96	76	96	76	97	77	97	76	97	76	95	77	96	77
<i>A. voinovskiensis</i> NCIMB 13956 ^T	96	78	96	79	97	75	97	78	97	78	97	75	97	75
<i>A. voinovskiensis</i> I4.1	96	78	96	79	97	75	97	78	97	78	97	75	97	75
<i>A. amylolyticus</i> DSM 15939 ^T	95	82	95	83	96	80	95	82	96	82	96	80	96	80
<i>A. rupiensis</i> DSM 17127 ^T	95	77	95	77	95	77	95	77	95	77	95	77	95	76
<i>A. thermarum</i> DSM 17141 ^T	98	94	98	94	99	92	99	94	99	94	99	92	99	92

Tablo 13'ün Devamı

	PDF38		TF15		TH4		TH5		D1021		D1041		D1042	
	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>	16S rRNA	<i>rpoB</i>
<i>A. eryuanensis</i> KCTC 13720 ^T	99	88	98	87	98	89	99	87	98	88	99	88	99	88
<i>A. pushchinoensis</i> DSM 12423 ^T	99	87	98	89	98	87	99	86	99	92	99	87	99	87
<i>A. pushchinoensis</i> A8	99	87	98	88	98	87	99	87	99	93	99	87	99	87
<i>A. kamchatkensis</i> DSM 14988 ^T	99	93	99	94	99	93	98	98	98	96	99	93	98	93
<i>A. ayderensis</i> NCIBM 13972 ^T	99	96	99	97	99	96	98	95	98	96	99	96	99	95
<i>A. tengchongensis</i> KCTC 13721 ^T	98	88	98	87	98	89	98	87	98	88	98	88	98	88
<i>A. gonensis</i> NCIBM 13933 ^T	98	98	98	99	99	98	98	92	98	94	98	98	98	98
<i>A. gonensis</i> A4	98	98	98	99	99	98	98	91	98	94	98	98	98	98
<i>A. gonensis</i> A7	98	98	98	99	99	98	98	91	98	93	98	98	98	97
<i>A. gonensis</i> I3	98	98	98	99	99	98	98	91	98	93	98	98	98	98
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ^T	98	87	98	88	98	87	98	85	98	89	98	87	98	86
<i>A. flavithermus</i> WK	98	88	98	87	98	88	98	86	98	88	98	88	98	87
<i>A. kestanbolensis</i> NCIBM 13971 ^T	98	88	97	89	97	88	98	86	98	89	98	88	98	87
<i>A. contaminans</i> DSM 15866 ^T	97	78	97	79	97	78	97	82	98	83	97	78	97	78
<i>A. bogrovensis</i> DSM 17956 ^T	97	77	96	77	96	77	96	76	97	77	97	76	96	77
<i>A. voinovskiensis</i> NCIMB 13956 ^T	97	75	97	76	97	75	96	78	96	79	97	75	96	75
<i>A. voinovskiensis</i> I4.1	97	75	97	76	97	75	96	78	96	79	97	75	96	75
<i>A. amylolyticus</i> DSM 15939 ^T	96	79	96	79	96	80	95	82	95	81	96	79	95	80
<i>A. rupiensis</i> DSM 17127 ^T	95	76	96	76	96	77	95	77	95	79	95	76	95	77
<i>A. thermarum</i> DSM 17141 ^T	99	92	98	93	99	92	98	94	99	93	97	92	98	92

3.7.2. % G+C Kompozisyonunun Belirlenmesi

A. pushchinoensis DSM 12423^T, *A. gonensis* NCIBM 13933^T, *A. ayderensis* NCIBM 13972^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. kestanbolensis* NCIBM 13971^T, *A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. bogrovensis* DSM 17956^T, *A. thermarum* DSM 17141^T ve D1021 izolatının genomik DNA'ları Marmur prosedürüne göre izole edildi ve Mandel ve Marmur (1968) tarafından geliştirilen termal denatürasyon yöntemine göre DNA baz kompozisyonları belirlendi. D1021 izolatının % G+C içeriğinin % 42,9 olduğu; *A. pushchinoensis* DSM 12423^T, *A. gonensis* NCIBM 13933^T, *A. ayderensis* NCIBM 13972^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. kestanbolensis* NCIBM 13971^T, *A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. bogrovensis* DSM 17956^T ve *A. thermarum* DSM 17141^T bakterilerinin % G+C içerikleri sırasıyla % 42,2, 42,8, 43,6, 42,3, 45,8, 41,6, 44,1 ve 48,8 olduğu belirlendi.

3.7.3. DNA-DNA Hibridizasyonu

Anoxybacillus türlerinin *rpoB* gen dizinleri karşılaştırıldığında, yeni tür olma ihtimali olan D1021 izolatının kesin tür tayinin yapılabilmesi için, DNA-DNA hibridizasyonlarının yapılması kararlaştırılmıştı. Bu amaç doğrultusunda, Marmur prosedürüne göre izole edilen D1021 ve *Anoxybacillus* türlerinin genomik DNA'ları kullanılarak, De Ley ve arkadaşlarının (1970) geliştirdiği DNA-DNA hibridizasyon yöntemine göre DNA-DNA benzerlik seviyesi belirlendi. D1021 izolatının *A. pushchinoensis* DSM 12423^T'e % 38,7, *A. gonensis* NCIBM 13933^T'e % 55,6, *A. ayderensis* NCIBM 13972^T'e % 59, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T'e % 63, *A. kestanbolensis* NCIBM 13971^T'e % 32,8, *A. flavithermus* DSM 2641^T'e % 38,4, *A. bogrovensis* DSM 17956^T'e % 30 ve *A. thermarum* DSM 17141^T'a % 40 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Bakteri sistematik otoriteleri tarafından, aynı türe ait bakterilerin DNA-DNA homolojilerinin % 70'den daha fazla olduğu, farklı türlerin ise % 70'den daha az benzerlik gösterdiği kabul edilmektedir (Wayne vd., 1987). Bu nedenle, D1021 izolatının *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğuna karar verildi ve *Anoxybacillus kaynarcensis* D1021^T olarak adlandırıldı.

Anoxybacillus cinsinin yeni türü olan D1021 izolatının bazı fenotipik ve kemotaksonomik özelliklerinin belirlenmesine karar verildi.

3.7.4. Bazı Fenotipik Karakterlerin Belirlenmesi

VITEK 32 System'i, API20E kitleri ve geleneksel fenotipik testlerin uygulanmasıyla, *A. kaynarcensis* D1021^T türünün fenotipik özellikleri ortaya çıkarıldı. Fakültatif aerob, hareketli, terminal spor oluşturan, 0,75 x 4 µm büyüklüğünde, Gram pozitif termofilik bakteri olduğu belirlendi. Büyüme sıcaklığının 35 ve 70°C aralığında ve optimum büyümesinin 60°C olduğu; pH aralığının 6.0 – 10.0 olduğu ve optimum pH değerinin 7.0 olduğu belirlendi. Maksimum % 4 NaCl'de büyüme gösterdiği, jelatini hidroliz edebildiği ve sitrat kullanmadığı belirlendi. Karbonhidrat kaynağı olarak, glukoz, maltoz, melibioz, riboz, sukroz, trehaloz, ksiloz, palatinoz, salicin, arabinoz'u kullanabilirken; galaktoz, amigdalin, sorbitol, inulin, N-asetilglukozamin, amilopektin, arabitol, tagatoz, mannitol, potasyum thiosianate, raffinöz, inositol, nişasta ve ramnoz ise kullanamadığı belirlenmiştir.

3.7.5. Yağ Asidi İçeriği

A. kaynarcensis D1021^T, Triptik Soy Agar besiyerinde 24 saat büyütüldü ve yağ asidi metil esterleri Microbial Identifikasyon System'i (MIS) ile belirlendi. *A. kaynarcensis* D1021^T bakterisinin temel yağ asidi olarak % 57,46 oranında C_{15:0} iso içerdiği, % 1,9 oranında C_{14:0}, , % 4,97 oranında C_{15:0} anteiso, % 7,55 oranında C_{16:0} iso, % 7,82 oranında C_{16:0} 7,82, % 13,98 oranında C_{17:0} iso ve % 6,23 oranında da C_{17:0} anteiso 6,23 içerdiği belirlenmiştir.

3.8. *Thermus* Cinsine Ait İzolatların Bazı Genotipik Özellikleri

Thermus cinsine ait olan 5 izolatın (TF2, TF3, TF5, TF6 ve TF7), SDS-PAGE analizi sonucunda çok benzer protein profili gösterdikleri, bu nedenle beş izolattan sadece bir tanesi (TF5) seçildi ve bundan sonrası genotipik analizlerde TF5 kullanıldı.

Thermus cinsinin tür tayinine yardımcı olabilecek herhangi bir gen analizi veya fenotipik test bulunmadığı için, TF5 izolatının kesin tür tayinin yapılabilmesi için DNA-DNA hibridasyon çalışmasının yapılmasına karar verildi. 16S rRNA dizin analizi sonuçlarına göre, TF5 izolatı % 97'in üzerinde sadece *Thermus scotoductus* DSM 8553^T'a

benzerlik gösterdiği için, DNA-DNA hibridizasyon çalışmasının TF5 ve *T. scotoductus* DSM 8553^T arasında yapılmasına karar verildi.

3.8.1. DNA Baz Kompozisyonunun Belirlenmesi

Marmur prosedürüne göre izole edilen TF5 ve *T. scotoductus* DSM 8553^T genomik DNA'ları kullanılarak, Mandel ve Marmur (1968) tarafından geliştirilen termal denatürasyon yöntemine göre DNA baz kompozisyonları belirlendi. TF5 izolatının % G+C içeriğinin % 59 ve T_m değerinde 77°C olduğu; *T. scotoductus* DSM 8553^T'un % G+C içeriğinin % 59,8 ve T_m değerinin de 78°C belirlendi.

3.8.2. DNA-DNA Hibridizasyonu

Marmur prosedürüne göre izole edilen TF5 ve *T. scotoductus* DSM 8553^T genomik DNA'ları kullanılarak, De Ley ve arkadaşlarının (1970) geliştirdiği DNA-DNA hibridizasyon yöntemine göre DNA-DNA benzerlik seviyesi belirlendi. TF5 ve *T. scotoductus* DSM 8553^T un DNA-DNA benzerlik seviyesi % 90 olarak belirlendi. Bakteri sistematik otoriteleri tarafından, aynı türe ait bakterilerin DNA-DNA homolojilerinin % 70'den daha fazla olduğu kabul edilmektedir (Wayne vd., 1987). Bu nedenle, TF5 izolatının, *T. scotoductus* DSM 8553^T türüne ait yeni bir suş olduğu belirlenmiştir.

3.9. *Schlegelella* Cinsine Ait İzolatın Bazı Genotipik ve Kemotaksonomik Özellikleri

Schlegelella cinsi *Schlegelella aquatica* LMG 23380^T ve *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344^T olmak üzere sadece iki tür içermektedir. Bu iki türünde, yağ asidi içeriklerinin çok farklı olduğu ve bu nedenle cins içerisinde sınıflandırmada yağ asidi içeriklerinin kullanılabileceği düşünüldü. Bu amaç doğrultusunda, *Schlegelella* cinsine ait olan PDF7 izolatının yağ asidi içeriğinin belirlenmesine karar verildi.

3.9.1. Yağ Asidi İçeriği

PDF7 izolatının yağ asidi metil esterleri, Microbial Identifikasyon System'i (MIS) ile belirlendi ve literatürde var olan *Schlegelella aquatica* LMG 23380^T ve *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344^T'in yağ asitleriyle karşılaştırıldı (Tablo 14).

Tablo 14. PDF7 izolatının yağ asidi içeriklerinin *Schlegelella aquatica* LMG 23380^T ve *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344^T ile karşılaştırılması

	<i>S. aquatica</i> LMG 23380 ^T	<i>S. thermodepolymerans</i> DSM 15344 ^T	PDF 7
C 10: 0	1,2	1,3	3,93
C10: 0 3-OH	5,1	3,3	13,43
C12: 0	2,3	1,6	7
C12: 0 3-OH		2	
C16: 0	48,7	43,1	25,53
C17: 0 cyclo	16,5	32,6	
C18: 1w7c	4,3	4,4	
C18: 0	1	-	1,57
Summed feature 3* : C16: 1w7c ve/veya C15:0 iso 2-OH	19,5	-	
Sum in F 3: C16:1 w6c ve/veya C16:1 w 7c	-	-	33,5
Sum in F 8: C18:1 w7c ve/veya C18:1w6c		-	14,76

Yağ asidi karşılaştırması incelendiğinde, PDF7 izolatının *Schlegelella* cinsine ait iki türden de çok farklı olduğu belirlenmiştir. PDF7 izolatının kesin tür tayinin yapılabilmesi için, DNA-DNA hibridizasyonlarının yapılmasına karar verildi. 16S rRNA dizin analizi sonuçlarına göre, PDF7 izolatı % 97'in üzerinde *S. aquatica* LMG 23380^T ve *S. thermodepolymerans* DSM 15344^T'a benzerlik gösterdiği için, DNA-DNA hibridizasyon çalışmasının PDF7, *S. LMG 23380^T thermodepolymerans* DSM 15344^T arasında yapılmasına karar verildi.

3.9.2. DNA Baz Kompozisyonunun Belirlenmesi

Schlegelella aquatica LMG 23380^T, *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344^T ve PDF7 izolatının genomik DNA'ları Marmur prosedürüne göre izole edildi ve termal denatürasyon yöntemine göre DNA baz kompozisyonları belirlendi. PDF7 izolatının % G+C içeriğinin % 67,1 olduğu, *S. aquatica* LMG 23380^T, *S. thermodepolymerans* DSM 15344^T türlerinin % G+C içeriklerinin sırasıyla % 68,5 ve 66,8 olduğu belirlendi.

3.9.3. DNA-DNA Hibridizasyonu

Marmur prosedürüne göre izole edilen PDF7 ve *S. aquatica* LMG 23380^T, *S. thermodepolymerans* DSM 15344^T genomik DNA'ları kullanılarak, PDF7 ve bu iki tür arasındaki DNA-DNA benzerlik seviyeleri belirlendi. PDF7 ve *S. aquatica* LMG 23380^T'in DNA-DNA benzerlik seviyesi % 50 iken; PDF7 ve *S. thermodepolymerans* DSM 15344^T arasındaki DNA-DNA benzerlik seviyesinin % 87 olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bakteri sistematik otoriteleri tarafından, aynı türe ait bakterilerin DNA-DNA homolojilerinin % 70'den daha fazla olduğu kabul edilmektedir (Wayne vd., 1987). Bu nedenle, PDF7 izolatının *S. thermodepolymerans* DSM 15344^T türüne ait yeni bir suş olduğuna karar verilmiştir.

3.10. *Chelatococcus* Cinsine Ait İzolatın Bazı Genotipik ve Kemotaksonomik Özellikleri

Chelatococcus cinsi *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T ve *Chelatococcus asaccharovorans* DSM 6462^T olmak üzere sadece iki tür içermektedir. Bu iki türde mezofilik karakterde olup en fazla 50 °C'de üreyebilmektedirler. 16S rRNA gen dizin analizi sonuçlarına göre, bu cinse ait olduğu belirlenen PDF20 izolatının ise termofilik bir bakteri olduğu ve optimum büyüme sıcaklığının 55°C olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Chelatococcus* cinsine ait iki türün farklı yağ asidi içeriklerine sahip oldukları, bu nedenle yağ asidi içeriklerinin bu cinsin sınıflandırılmasında kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu amaç doğrultusunda, *Chelatococcus* cinsine ait olan PDF20 izolatının yağ asidi içeriğinin belirlenmesine karar verildi.

3.10.1. Yağ Asidi İçeriği

PDF20 izolatının yağ asidi metil esterleri, Microbial Identifikasyon System'i (MIS) ile belirlendi ve literatürde var olan *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T ve *Chelatococcus asaccharovorans* DSM 6462^T'in yağ asitleriyle karşılaştırıldı (Tablo 15).

Tablo 15. PDF20 izolatının yağ asidi içeriklerinin *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T ve *Chelatococcus asaccharovorans* ile karşılaştırılması

	<i>C. daeguensis</i> DSM 22069 ^T	<i>C. asaccharovorans</i> DSM 6462 ^T	PDF 20
C16:0	2,2	8,5	4,32
C17:0	0,9	0,4	-
C18:0	1,7	0,9	6,01
C18:1w7c	64,4	47,4	-
C20:1w7c	0,4	1,4	-
C18:1 2-OH	3,7	0,9	7,05
C18:0 3-OH	3,4	0,8	4,89
C17:0 cyclo	0,3	3,2	-
C19:0 cyclo w8c	16,7	29,6	8,86
Unknown	0,8	0,2	-
Sum in F2 : iso C16:1 ve/veya C14:0 3-OH	3,4	4	-
Sum in F3: C16: 1 w 7c ve/veya iso-C15:0 2-OH	0,7	1,1	-
Sum in F2 : C14:0 3- OH ve/ya C16:1 iso 1	-	-	7,38
Sum in F 8: C18: 1 w7c ve/veya C18:1w6c	-	-	61,5

Yağ asidi içeriklerinin yapılan karşılaştırılmasında, PDF20 izolatının *Chelatococcus* cinsine ait iki türden de çok farklı olduğu belirlenmiştir. Büyüme sıcaklıklarındaki farklılıklar ve yağ asidi içeriklerindeki farklılıklar göz önüne alınarak, PDF20 izolatının yeni tür olabileceği düşünülmüştür, PDF7 izolatının kesin tür tayinin yapılabilmesi için DNA-DNA hibridizasyonlarının yapılmasına karar verildi.

16S rRNA dizin analizi sonuçlarına göre, PDF20 izolatı % 97'in üzerinde sadece *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T'a benzerlik gösterdiği için, DNA-DNA

hibridizasyon çalışması PDF20 ve *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T'a arasında yapılmasına karar verildi.

3.10.2. DNA Baz Kompozisyonunun Belirlenmesi

Chelatococcus daeguensis DSM 22069^T ve PDF20 izolatının genomik DNA'ları Marmur prosedürüne göre izole edildi ve termal denatürasyon yöntemine göre DNA baz kompozisyonları belirlendi. PDF20 izolatının % G+C içeriğinin % 65,4 olduğu, *C. daeguensis* DSM 22069^T'in % G+C içeriğinin % 65,5 olduğu belirlendi.

3.10.3. DNA-DNA Hibridizasyonu

Marmur prosedürüne göre izole edilen PDF20 ve *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T genomik DNA'ları kullanılarak, bu iki bakteri arasındaki DNA-DNA benzerlik seviyeleri belirlendi. PDF20 ve *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T arasındaki DNA-DNA benzerlik seviyesinin % 80 olduğu ortaya çıkarıldı. Bakteri sistematik otoriteleri tarafından, aynı türe ait bakterilerin DNA-DNA homolojilerinin % 70'den daha fazla olduğu kabul edilmektedir (Wayne vd., 1987). Bu nedenle, PDF20 izolatının *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T türüne ait yeni bir suş olduğuna karar verildi.

3.11. *Pseudoxanthomonas* Cinsine Ait İzolatın Bazı Genotipik ve Kemotaksonomik Özellikleri

Pseudoxanthomonas cinsinin üyeleri, *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T hariç mezofiliktir. Bu cinsin üyeleri arasında yağ asidi içeriklerinin farklılık gösterdiği, bu nedenle bu cinsin sınıflandırılmasında kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu amaç doğrultusunda, *Pseudoxanthomonas* cinsine ait olan PDF31 izolatının yağ asidi içeriği belirlenmesine karar verildi.

3.11.1. Yağ Asidi İçeriği

PDF31 izolatının yağ asidi metil esterleri, Microbial Identifikasyon System'i (MIS) ile belirlendi ve literatürde var olan *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T ve *P. Broegbernensis* DSM 12573^T'in yağ asitleriyle karşılaştırıldı (Tablo 16).

Tablo 16. PDF31 izolatının yağ asidi içeriklerinin *Pseudoxanthomonas taiwanensis* ve *P. broegbernensis* ile karşılaştırılması

	<i>P. broegbernensis</i> DSM 12573 ^T	<i>P. tawainensis</i> CB225	<i>P. tawainensis</i> CB226	PDF31
C10:0 iso				0,83
C10:0				0,23
C11:0 iso	1,40			17,72
C11:0 antensio				1,20
C11:0 iso 2-OH	0,90			
C11:0 iso 3-OH	1,00			18,42
C12:iso				0,90
C13:0 iso				1,19
C13:0 iso 3-OH				0,39
C13:0 iso 2-OH				0,52
C12:0 iso 3-OH				1,60
C13:0 antensio				1,02
C14:0 iso				2,85
C15:1 isoF				1,78
Sum in F.1				0,41
Sum in F.3				0,60
Sum in F.9				4,09
C14:0	12,00	6,50	6,00	
C15:0 iso	32,40	29,50	29,00	28,16
C15:0 anteiso	31,80	5,50	4,80	6,77
C15:0		0,60	0,70	
C16:0 iso	6,90	38,90	41,50	7,79
C160 cis9	1,00			
C16:0	1,30	2,50	3,90	0,41
C17 iso cis9	5,50	2,70	2,20	
C17:0 iso		5,10	4,10	2,44
C17:0 delta	1,10			
C17:0	1,50	1,20	1,10	
C16:0 2-OH	0,90	1,00	0,90	
C18:1 trans9		1,40	1,20	
Unknown 1*		1,30	1,30	
Unknown 2		1,80	1,30	

Yağ asidi analizleri karşılaştırıldığında, *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T türüne ait iki suşun çok büyük oranda benzer yağ asidi içeriği gösterdiği, fakat bu iki suşun *P. broegbernensis*'den farklı yağ asidi içeriği sergilediği görülmektedir. PDF31 izolatının *Pseudoxanthomonas* cinsine ait iki türden de çok farklı olduğu göz önüne alınarak, PDF20 izolatının yeni tür olabileceği düşünüldü, PDF31 izolatının kesin tür tayinin yapılabilmesi için DNA-DNA hibridizasyonlarının yapılmasına karar verildi.

16S rRNA dizin analizi sonuçlarına göre, PDF31 izolatı % 97'in üzerinde sadece *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T'a benzerlik gösterdiği için, DNA-DNA hibridizasyon çalışması PDF31 ve *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T arasında yapılmasına karar verildi.

3.11.2. DNA Baz Kompozisyonunun Belirlenmesi

Pseudoxanthomonas taiwanensis KCTC 22832^T ve PDF31 izolatının genomik DNA'ları Marmur prosedürüne göre izole edildi ve termal denatürasyon yöntemine göre DNA baz kompozisyonları belirlendi. PDF31 izolatının % G+C içeriğinin % 68,9 olduğu, *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T'in % G+C içeriğinin % 69,2 olduğu belirlendi.

3.11.3. DNA-DNA Hibridizasyonu

Marmur prosedürüne göre izole edilen PDF31 ve *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T genomik DNA'ları kullanılarak, bu iki bakteri arasındaki DNA-DNA benzerlik seviyeleri belirlendi. PDF31 ve *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T arasındaki DNA-DNA benzerlik seviyesinin % 91 olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bakteri sistematik otoriteleri tarafından, aynı türe ait bakterilerin DNA-DNA homolojilerinin % 70'den daha fazla olduğu kabul edilmektedir (Wayne vd., 1987). Bu nedenle, PDF31 izolatının *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T türüne ait yeni bir suş olduğuna karar verilmiştir.

3.12. *A. kaynarcensis* D1021^T'de Glukoz İzomeraz Aktivitesi

A. kaynarcensis D1021^T bakterisinde glukoz izomeraz aktivitesini tespit etmek amacı ile, *A. kaynarcensis* D1021^T bakterisinden hücre özütü elde edildi. Elde edilen hücre özütü GI aktivitesini belirlemek üzere, Belfauih ve Penninck'in (2000) geliştirmiş oldukları yöntemle göre incelendi. GI aktivitesi reaksiyon sonucunda oluşan fruktoz miktarının $\mu\text{mol/dakika}$ cinsinden spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlendi. Ölçümler sonucunda, *A. kaynarcensis* D1021^T'in 0,00788 $\mu\text{mol/dakika}$ GI aktivitesine sahip olduğu tespit edildi.

3.13. *A. kaynarcensis* D1021^T GI Kodlayan *xylA* Geninin Baz ve Protein Dizilimi

A. kaynarcensis D1021^T glukoz izomeraz genini tespit etmek amacıyla, bu bakterinin genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak Xyla_Ex_F1 ve Xyla_Ex_R1 primerleri ile PCR gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünü, pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı ve Macrogen şirketi aracılığı ile baz dizilim analizi yapıldı. Dizin sonuçları GenBank'taki verilerle karşılaştırıldı ve bu dizinin 1,326 nt'lik glukoz izomeraz geni olduğu tespit edildi. Elde edilen glukoz izomeraz geninin nükleotit ve aminoasit sırası aşağıda verildi.

```
ATGGCGTATTTTGAACCGTTGACAAGGTGGTTTATGAAGGGCCAACATCGAAGAACCCGCTTGCT
TTTAAGTTCTATAATCCTCAAGAAAGAATAGGGGATAAAACAATGGAGGAGCATTTGCGCTTTTCA
GTGGCATACTGGCATAACGTTTGTAGGAGATGGATCGGATCCTTTTGGTGTTGGAACAGCTATTCGT
CCTTGGAATCGATATAGTGGCATGGATTTAGCAAAAGCACGTGTTGAAGCAGCGTTGAATTATTT
GAAAAGTTGGACATTCCATTTTCTGCTTTCATGATGTTGATATTGCGCCAGAGGGAGATAATCTT
GTAGAGACATATAGAACTTAGATGAAATTGTTGATATGATTGAGCAATATATGAAGACGAGTAAA
ACAAAGTTGCTTTGGAATACGGCTAACTTATTTACGCATCCACGTTTTGTGCATGGTGCAGCCACT
TCTTGCAATGCTGATGTGTTTGCATATGCGGCGGCGAAAAGTGAAAAAGGGACTAGAAATCGCTAAG
CGGCTCGGCGCAGAAAACCTATGATTTTGGGGCGGGCGAGAAGGGTATGAAACGTTATTGAACACC
GACATGAAGCTAGAGCTTGACAATTTAGCCCGTTTCTTGATATGGCTGTTGACTACGCAAAAGAA
ATTGGTTTTGATGGACAATTCTTAATTGAGCCAAAACCGAAAGAACCAACGAAACATCAGTATGAT
TTTGATGTCGCTACAGCGTTAGCATTTTACAAACGTATGGGCTAAAAGATTATTTTAAATTTAAT
ATTGAAGCTAACCATGCGACATTGGCCGGGCATACATTGCAACATGAATTGCGAGTTGCACGCATT
CATAACATGTTAGGTTCTGTTGATGCAATCAAGGAGACACGTTGCTTGGTTGGGATACAGATGAA
TTTCCAACGGATCTATATACAACAACACTTGCGATGTATGAAATTTTACAAAATGACGGACTTGCC
CGTGGTGGATTAAATTTTCGATGCTAAGGTAAGACGTGGCTCGTTTGAACCGGAGGACTTATTTTAC
GCTCATATTGCCGTATGGACAGCTTTGCAATTGGACTAAAAGTTGCACACCGCCTAATTGAAGAT
CGTGTATTTGAATCCGTCATTGAGGAACGATACAAGAGTTATACTGAAGGAATTGGTCGCGACATT
GTTGAGGGTAGAGCCGATTTTCATACGCTAGAGACATATGCATTGCAACTTGGGGATATCCACAAT
CATTGAGGACGTCAAGAGCGTTTGAAAACGTTGCTTAATCAATATTTACTCGAAGTTTGTGTAGCT
CGTTAA
```

MAYFENVDKVVYEGPTSKNPLAFKFYNPQERIGDKTMEEHLRF SVAYWHTFVGDGSDPFG
 VGTAIRPWNRYSGMDLAKARVEAAFELFEKLDIPFFCFHDVDIAPEGDNLVETYNLDEI
 VDMIEQYMKTSKTKLLWNTANLFTHPRFVHGAATSCNADVFAAYAAKVKKGLEIAKRLGA
 ENYVFWGGREGYETLLNTDMKLELDNLARFLHMAVDYAKEIGFDGQFLIEPKPKPTKHQ
 YDFDVATALAFLQTYGLKDYFKFNIEANHATLAGHTFEHELVRARIHNMLGSVDANQGDT
 LLGWDTDEFPTDLYTTTLAMYEILQNDGLGRGGLNFDKVRRGSFEPEDLFYAHIAGMDS
 FAIGLKVAHRLIEDRVFESVIEERYKSYTEGIGRDIVEGRADFHTLETYALQLGDIHNHS
 GRQERLKTLLNQYLLEVCVAR

3.14. *A. kaynarcensis* D1021^T Glukoz İzomerazının Saflaştırılması

3.14.1. Hücre Özütü Elde Edilmesi ve Isı Şoku Uygulamaları

Elde edilen hücre özütünde ve bu özütün ısı şoku uygulamasından elde edilen özütte protein konsantrasyonu tayini ve spesifik aktivite tayini GI aktivitesi ile yapıldı ve SDS-PAGE’de yürütüldü. Elde edilen veriler Tablo 17’de, elde edilen jel görüntüsü Şekil 22’de gösterildi.

3.14.2. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi

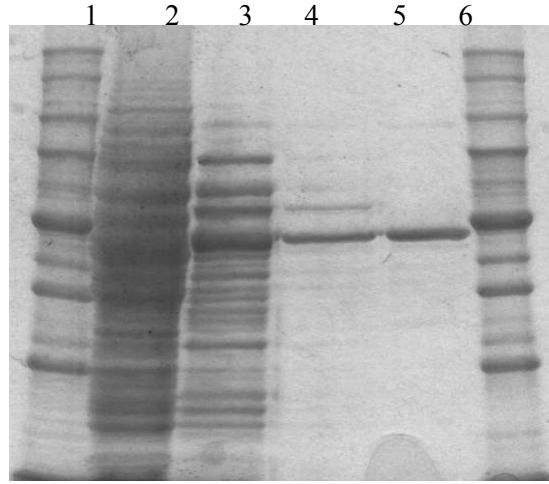
Isı şoku uygulamasının ardından elde edilen hücre özütü, iyon değişimi kolon kromatografisinden geçirildi ve fraksiyonlarda aktivite taraması yapıldı. Aktivitenin yüksek olarak gözlemlendiği fraksiyonlar birleştirildi. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra, kısmen saflaştırılmış özütte protein konsantrasyonu tayini ve spesifik aktivite tayini GI aktivitesinin ölçümü ile yapıldı ve SDS-PAGE’de yürütüldü. Elde edilen veriler Tablo 17’de, elde edilen jel görüntüsü Şekil 22’de gösterildi.

3.14.3. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

İyon değişimi kolon kromatografisi uygulamasından sonra elde edilen kısmen saflaştırılmış özüt, hidrofobik kolon kromatografisinden geçirildikten sonra fraksiyonlarda aktivite taraması yapıldı. Aktivite görülen fraksiyonlar birleştirildi. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra, saflaştırılmış enzimin konsantrasyon tayini ve spesifik aktivite tayini GI aktivitesi ile yapıldı ve SDS-PAGE’de yürütüldü. Elde edilen veriler Tablo 17’de, elde edilen jel görüntüsü Şekil 22’de gösterildi.

Tablo 17. *A. kaynarcensis* D1021 glukoz izomerazına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T. protein (mg)	T. aktivite(U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	10	8,99	89,9	167,214	1,86	100	1
Isı bozunum	8,5	3,676	31,246	117,48496	3,76	70,260241	2,02
İyon değişimi	29	0,32	9,28	97,9968	10,56	58,605619	5,67
Hidrofofik etkileşim	25	0,24	6	74,7	12,45	44,673293	6,69



Şekil 22. Saflaştırılmış rekombinant *A. kaynarcensis* D1021 glukoz izomerazının SDS-PAGE analizi
 1) Markır 2) Genin ekspres edildiği *E. Coli* BL21 (DE3)'in hücre özütü 3) 70°C'de 15 dk sıcak şoku uygulanmış hücre özütü 4) İyon değişim kolon kromatografisi sonrası birleştirilen fraksiyonlardan oluşan enzim özütü 5) Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi sonrası birleştirilen fraksiyonlardan oluşan enzim özütü 6) Markır

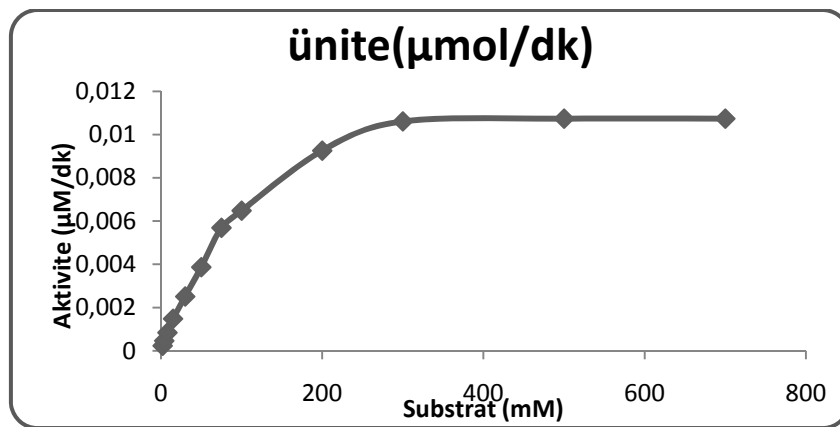
3.15. *A. kaynarcensis* D1021^T Glukoz İzomerazın Karakterizasyonu

3.15.1. Deneylerde Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi

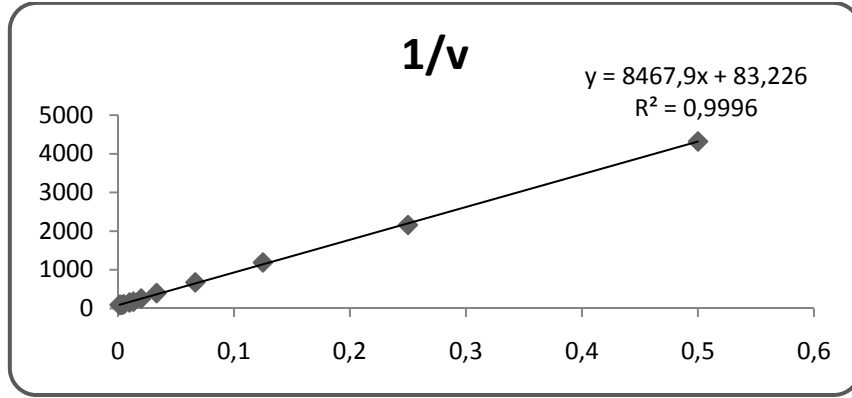
Substrat miktarı sabit tutularak, kademeli olarak enzim miktarı arttırıldı ve enzim artışına karşılık gelen aktiviteler hesaplandı. Enzim miktarı-GI aktivite grafiğinde enzim miktarının ve aktivitenin doğrusal artış gösterdiği yani enzimin yarı doygun olduğu bir noktadaki enzim miktarı deneylerde kullanılmak üzere seçildi. Buna göre de aktivite çalışmalarında 15 µl enzim kullanılmasına karar verildi.

3.15.2. Enzim Kinetiği

A. kaynarcensis D1021'in glukoz izomerazı için enzim kinetiği deneyleri 0,4 µg enzim kullanılarak gerçekleştirildi. *A. kaynarcensis* D1021'in glukoz izomerazının substrat olarak glukoz varlığında substrat-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Hazırlanan Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen veriler doğrultusunda; *A. kaynarcensis* D1021'in glukoz izomerazının glukoz için K_m değeri 101,75 mM ve V_{max} değeri ise 14,03 µmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (Şekil 23, 24).



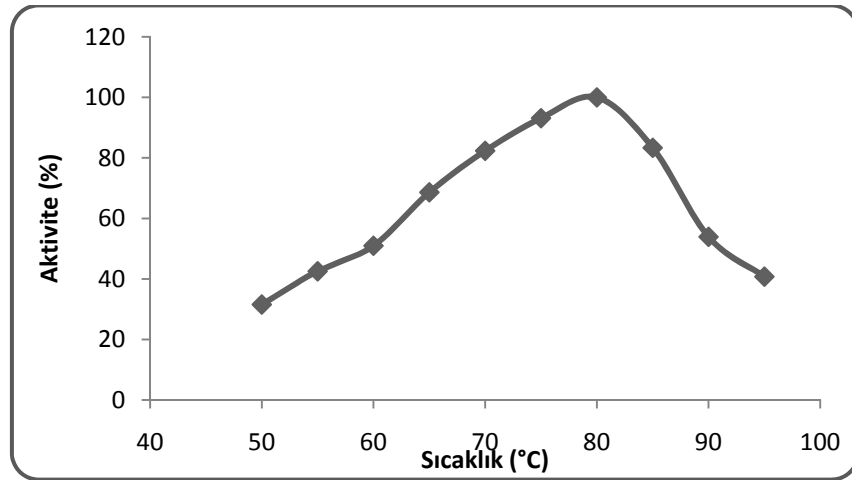
Şekil 23. *A. kaynarcensis* D1021'in glukoz izomerazının Michaelis-Menten eğrisi



Şekil 24. *A. kaynarcensis* D1021'in glukoz izomerazının Lineweaver-Burk eğrisi

3.15.3. Optimum Sıcaklık

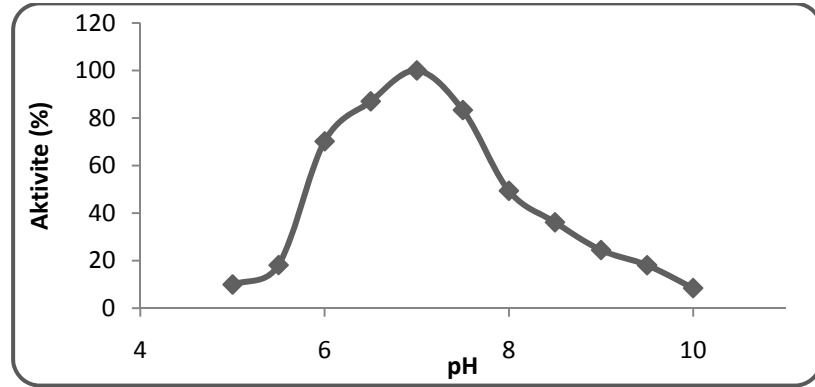
A. kaynarcensis D1021 glukoz izomerazının optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100°C'lerde aktivitesi ölçülerek enzimin çalışmasına sıcaklığın etkisi araştırıldı ve sıcaklık-aktivite grafiği oluşturuldu. Bu sıcaklıklarda ölçülen aktivitelere göre oluşturulan sıcaklık-aktivite grafiği Şekil 25'de gösterildi. Sonuç olarak enzimin optimum sıcaklığı 80°C olarak belirlendi, sonraki deneylerde reaksiyonlar bu sıcaklıkta gerçekleştirildi.



Şekil 25. *A. kaynarcensis* D1021'in glukoz izomerazının optimum sıcaklık grafiği

3.15.4. Optimum pH

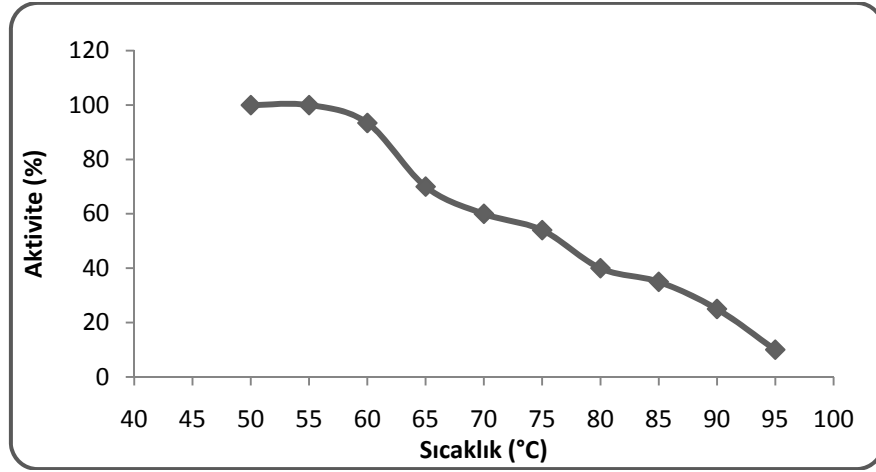
pH'nın GI aktivitesi üzerine etkisi pH 5 - 10,5 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile incelendi. Elde edilen aktivite ölçümlerine göre pH-aktivite grafiği oluşturuldu. Şekil 26'da görüldüğü gibi GI aktivitesi en yüksek 7 pH'ya sahip tamponda gözlemlendi.



Şekil 26. *A. kaynarcensis* D102'in glukoz izomerazının optimum pH grafiği

3.15.5. Isıl Kararlılığı

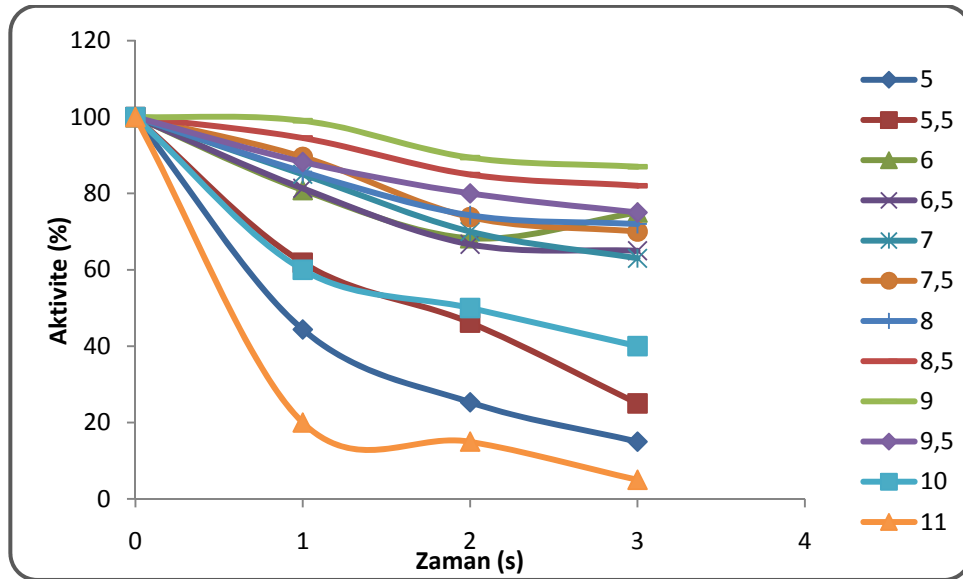
A. kaynarcensis D1021'in glukoz izomerazının ısı kararlılığını belirlemek için saflaştırılan enzim özütü 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C'lerde 30 dakika boyunca inkübe edildi. Bunun ardından optimum reaksiyon şartlarında reaksiyon gerçekleştirildi ve aktivite ölçümleri alındı. Alınan bu ölçümler değerlendirilerek bu sıcaklıklarda enzimin kararlılığı belirlendi. Yapılan deney sonucunda, Şekil 27'de görüldüğü gibi enzimin 60°C'den sonra yarım saatlik bekleme süresinin ardından aktivitenin azaldığı belirlenmiştir. Isı muamelesine maruz kalmamış enzimin aktivite ölçüm sonucu % 100 olarak kabul edildi.



Şekil 27. *A. kaynarcensis* D1021'in glukoz izomerazının ısı kararlılığı

3.15.6. pH Kararlılığı

pH kararlılığını belirlemek için saf enzim özütü pH'sı 5 ile 10,5 arasında değişen tamponlar içerisinde 80°C'de 1, 2, 3 saat boyunca inkübe edildi. Çeşitli zaman aralıklarında inkübe edilen enzimlerden alınarak optimum çalışma şartlarında aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin kalan aktivitesi hesaplandı (Şekil 28). İlk anda alınan aktivite ölçümü % 100 olarak kabul edildi. Enzimin en yüksek kararlılığı pH 9'da gösterdiği belirlendi.



Şekil 28. *A. kaynarcensis* D1021'in glukoz izomerazının pH kararlılığı

4. TARTIŞMA

Termofilik mikroorganizmalar, öbakteriler grubu içerisinde yer alan, jeotermal alanlarda, gübre kompostlarında, tropik topraklarda, sıcak su sağlayan ısıtıcılarda ve çöllerde yaşamsal faaliyetlerini sürdüren canlılardır (Summit vd., 2000). Bu mikroorganizmaların endüstriyel önemi bulunduğundan dünyada bu alanda çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ülkemizde ise taksonomik, filogenetik ve endüstriyel enzimlerin izolasyonu ve uygulama alanlarının tespitine yönelik çok fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır (Adıgüzel, 2006). Bu çalışmada Türkiye'deki bazı kaplıcaların termofilik bakteri florasının tespiti ve endüstriyel önemi olan bazı enzimlerin bu ve daha sonra ki çalışmalarda izolasyonu ve uygulama alanlarının tespiti için gerekli olan kültür koleksiyonunun oluşturulması amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışmada, Karakoç Kaplıcası, Kaynarca Kaplıcası, Nebiler Kaplıcası, Alangüllü Kaplıcası, Çamköy Çamur Ilıcısı ve Aydın Germencik Ömerbeyli Jeotermal sahasının içerdikleri termofilik bakteriler, uygun besiyerler kullanılarak farklı sıcaklıklarda çoğaltıldılar. Koloni morfolojilerine göre birbirlerinden farklı olabilecek 51 termofilik izolat seçildi ve saf kültürü yapıldı. Elde edilen termofilik izolatların morfolojik özellikleri belirlendi. Ancak, sadece morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere dayanılarak yapılan sınıflandırmanın karışıklıklara neden olduğu ve bu yüzden de kesin ve tam sınıflandırmanın yapılabilmesi için genetik verilerin kullanılması gerektiği bilinmektedir. Son yıllarda, artık klasik fenotipik veriler sadece genetik bilgileri destekleyici ek bilgi olarak kullanılmaktadır (Rosello-Mora vd., 2001; Staley, 2006).

Bilinmeyen bir bakterinin 16S rRNA genlerinin baz dizilerinin belirlenmesi, bu bakterinin sınıflandırılması için gerekli olan genotipik bilginin ilk ve temel adımıdır (Lilburn ve Garrity, 2004). Bilindiği gibi, rRNA'lar özellikle 16S rRNA yapısında önemli ölçüde genetik bilgiyi içeren, yapısal ve fonksiyonel olarak korunmuş ve evrensel bir dağılım gösteren makromoleküller oldukları için, bakterilerin filogenetik analizlerinde önemli derecede kullanılmaktadır (Woese, 1987). Ayrıca Stackebrandt ve Goebel (1994), aynı cinse ait olan türlerin 16S rRNA genlerinin baz dizileri arasındaki benzerliğin % 97'den daha az olduğunu ve aynı türe ait olan suşların ise 16S rRNA genleri açısından birbirlerine % 97'den daha fazla benzer olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca aralarında 16S

rRNA gen dizisi açısından % 95'den daha fazla benzerlik bulunan bakterilerin aynı cinsle ait türler olduğu vurgulanmaktadır (Ludwig vd., 1998).

Sistematikte genotipik bilginin ilk ve temel adımını gerçekleştirmek amacıyla, ilk olarak klasik fenotipik özellikleri açısından birbirinden farklı olabilecek 51 termofilik izolatın 16S rRNA genleri PCR yardımıyla arttırıldı ve elde edilen PCR ürünleri uygun bir vektöre klonlandıktan sonra baz dizilerinin ortaya çıkarılması için baz dizinin analizi yapıldı. Dizin analizi sonucunda elde edilen gen sıralarının GenBank'ta var olan bakteriyal 16S rRNA genleriyle karşılaştırılması sonucunda, 12 izolatın *Geobacillus*, 18 izolatın *Anoxybacillus*, 9 izolatın *Brevibacillus*, 5 izolatın *Thermus*, 4 izolatın *Aneurinibacillus* ve 1'er izolatın da *Pseudoxanthomonas*, *Schlegelella* ve *Chelatococcus* cinslerine ait oldukları belirlendi. Daha sonra EzTaxon programı kullanılarak, bu izolatların 16S rRNA gen dizileri ile ait oldukları cinslere ait türlerin 16S rRNA gen dizileri arasındaki benzerlik oranları belirlendi. Tablo 4, 5, 6, 7, 8 ve 9'da gösterilen veriler incelendiğinde, izolatların ait oldukları cinslerin pek çok türüne % 97 ve üzerinde benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Ancak son zamanlarda 16S rRNA gen dizisi açısından aralarında % 97'den daha fazla benzerlik bulunan bakterilerin, kesin olarak aynı tür bakteriler olmayabileceği belirtilmektedir (Cho ve Tiedje, 2001). Bu yüzden, aralarında 16S rRNA gen dizisi açısından % 97'den daha fazla olan benzerliğin, bu bakterilerin aynı tür olduğunu göstermeyebileceği ve 16S rRNA'ya göre yeni bakteri türlerinin belirlenmesinin güvenilir olmayacağı belirtilmiştir (Stackebrandt vd., 2002). Birbirleriyle yakın ilişkili bakteri türlerinin sınıflandırılmasında, 16S rRNA genleri arasındaki benzerliğin karşılaştırılması tek başına yeterli olmadığı için, verilerin diğer bazı genotipik yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Dulger ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları bir çalışmada da, *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641^T, *Anoxybacillus gonensis* NCIBM 13933^T ve *Anoxybacillus pushchionensis* DSM 12423 ile çeşitli kaplıcalardan izole ettikleri ABO4^T ve K4^T suşlarını karşılaştırdılar. 16S rRNA gen dizisi karşılaştırmaları sonucunda, ABO4^T ve K4^T suşlarının birbirlerine ve diğer *Anoxybacillus* türlerine % 97'den daha fazla oranda benzerlik gösterdikleri ortaya çıkarıldı. Ancak son zamanlarda bakterilerin kesin tür tayinlerinin yapılmasında temel teşkil eden DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda, ABO4^T ve K4^T suşlarının birbirlerine ve diğer *Anoxybacillus* türlerine % 70'den daha az benzer oldukları gösterildi. ABO4^T ve K4^T suşlarının, *Anoxybacillus* cinsine ait iki yeni tür oldukları belirtilerek sırasıyla *Anoxybacillus ayderensis* NCIBM 13972^T ve *Anoxybacillus*

kestanbolensis NCIBM 13971^T olarak adlandırıldı. Bu sonuçlar ve benzeri pek çok diğer çalışma dikkate alındığında, 16S rRNA gen dizin analizinin tür ayrımında çok etkin bir kriter olmadığı görülmektedir.

16S rRNA gen dizisinin her zaman doğru sonucu vermemesinin nedenlerinden biri, bazı bakterilerin birbirlerine benzer olmayan çok sayıda rRNA operonlarına sahip olmasıdır (Boyer vd., 2001). Bu nedenle, bütün bakteri sistematik otoriteleri tarafından kabul edilen görüş, birbirlerine aşırı derecede benzeyen türlerin ayrılmasında 16S rRNA gen dizin analizinin kullanılamaz olduğu, 16S rRNA gen dizin analizinin sadece cinslerin ve birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilen türlerin ayrımında kullanılmasının uygun olduğudur.

Bütün bu görüşler dikkate alınarak, 16S rRNA gen dizin analizlerine göre izolatların sadece cins bazında sınıflandırılmalarının yapıldığı, tür bazında sınıflandırılmalarının yapılabilmesi için ilave genotipik analizlerin yapılmasının gerekli olduğuna karar verildi.

Genotipik analizler detaylandırılmadan önce, ilk olarak izolatların kendi aralarındaki benzerlikleri bir ölçüde de olsa belirlemek için çözünebilir hücre protein profillerinin ortaya çıkarılmasına karar verildi. Çözünebilir protein profili gibi kemotaksonomik markırların analizi ile ortaya çıkarılan hücrenin kimyasal içeriği, bakteri sistematığında kullanılan önemli bir özelliktir. Bu nedenle, izolatların çözünebilir hücre proteinleri izole edildi ve aynı cinse ait olan izolatlar kendi aralarında karşılaştırılacak şekilde SDS-PAGE'e yüklendi. İzolatların protein profilleri, cins içerisinde kendi aralarında karşılaştırıldı ve Şekil 12, 13, 14 ve 15'de görüldüğü gibi *Brevibacillus* ve *Geobacillus* cinslerine ait izolatlar birbirlerinden farklı protein profilleri sergilerken *Thermus* cinsine ait 5 izolatında benzer protein profili gösterdikleri görülmektedir. Ayrıca, *Anoxybacillus* cinsine ait 18 izolattan beş tanesinin (DF5, DF11, DF16, DF17 ve D1041) benzer protein profili gösterirken, kalan 13 *Anoxybacillus* izolatının farklı profiller gösterdiği belirlenmiştir.

Cato ve arkadaşları (1982) tarafından, 70 adet *Clostridium* türünün suşları arasında çözünebilir proteinlerinin elektroforetik olarak karşılaştırılmasını esas alan bir araştırma yapılmış ve araştırmanın sonucunda aralarında % 80 DNA-DNA homolojisi gösteren suşların, aynı protein bantlarına sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca, aralarında % 70 DNA-DNA homolojisi olan suşların protein bantlarında ise çok küçük farklılıkların olduğu ortaya çıkarılırken, farklı türlerin ise birbirlerinden farklı protein bantlarına sahip oldukları görülmüştür. Daha önceden de belirtildiği gibi aynı türe ait olan suşlar DNA-DNA

homolojisi açısından birbirlerine en az % 70 oranında benzemektedirler. Cato ve arkadaşlarının çalışmaları dikkate alındığında, birbirlerinden farklı protein bantlarına sahip olan bakterilerin farklı türler olması beklenirdi. Ancak, Ferguson ve Lambe (1984) yapmış oldukları bir çalışmada sıcaklık ve büyüme ortamı değiştirildiğinde türe spesifik bantlar dışındaki diğer protein bantlarının değiştiğini göstermiştir. Ayrıca Perez ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada, aynı türe ait bazı laktik asit bakterilerinin farklı protein profilleri gösterdiğini, bunun yanı sıra aynı protein profili gösteren bakterilerin ise aynı türe ait olduklarını göstermişlerdir. Bu çalışmalar baz alındığında, aynı bant profili gösteren bakterilerin aynı türler olduklarını, fakat farklı bant profili gösteren bakterilerin ise aynı türler olabileceği gibi farklı türler de olabileceği düşünülmüştür. Bu düşünce doğrultusunda, *Thermus* cinsine ait 5 izolatın birbirleriyle aynı oldukları düşünüldü ve bu beş izolattan TF5 temsilci olarak seçildi ve genotipik çalışmalara sadece TF5 ile devam edildi. Aynı şekilde *Anoxybacillus* cinsi içerisinde benzer protein profili gösteren beş izolatın da aynı türe ait bakteriler oldukları düşünüldü ve D1041 bakteri temsilci olarak seçildi ve genotipik çalışmalara D1041 ile devam edildi.

16S rRNA geninin (1,5 kb) tüm dizin analizinin, yakın ilişkili türlerin ayrımında yeterli olmadığı daha önce belirtilmişti. Ancak 16S rRNA geninin tüm sırası türler arasında çok büyük korunmuşluk göstermesine karşın, 16S rRNA genin 5' uç kısmında yer alan bir bölgenin türler arasında yüksek değişkenlik gösterdiği belirlenmiş ve bu bölge çok değişken bölge (HV) diye adlandırılmıştır. Goto ve ark. 2000, 2002 ve 2004 yıllarında yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, HV bölgesinin *Brevibacillus* ve *Aneurinibacillus* cinslerine ait aynı türlerin suşları içerisinde yüksek oranda benzerlik gösterdiği, bu cinslere ait türlerin gruplandırılması ve tanımlanmasını sağlayacak derecede de türler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışma doğrultusunda, *Brevibacillus* ve *Aneurinibacillus* cinsine ait izolatların HV bölgelerinin 16S rRNA gen dizilimleri elde edilmiş ve *Brevibacillus* ve *Aneurinibacillus* türlerinin HV bölgeleriyle karşılaştırılmıştır.

Bu karşılaştırma sonucunda, *Aneurinibacillus* cinsine ait 4 izolattan PDF6 ve PDF32'in birbirlerine % 99 oranında benzerlik gösterdikleri ve bu iki izolatın *Aneurinibacillus danicus* türüne % 99 oranında benzedikleri belirlenmiştir. PDF13 ve PDF24 izolatlarının da birbirlerine % 99 benzerlik gösterdikleri ve *Aneurinibacillus aneurinilyticus*'a % 99 ve üzeri benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca, bu dört izolatın HV bölgesine ait baz dizinleri açısından, *Aneurinibacillus* türleriyle yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç incelendiğinde, PDF13 ve PDF24'ün

Aneurinibacillus aneurinilyticus türüyle bir dal oluşturduğu, PDF6 ve PDF32 izolatlarında *Aneurinibacillus danicus* türüyle bir grup oluşturduğu görülmektedir. Goto ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları iki ayrı çalışmada, HV bölgesinin *Alicyclobacillus* cinsi içerisinde tür seviyesinde ayırım gücüne sahip olduğu belirlenmiştir. HV bölgesinin tip suşlar arasında % 82,3-94,5 oranında benzerlik gösterdiği, aynı türe ait suşların ise, üyesi olduğu türlerin tip suşlarına % 99,1'den fazla benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Goto ve ark. 2002 a,b). Bu çalışmalar doğrultusunda, PDF6 ve PDF32 izolatının *Aneurinibacillus danicus* türüne ait yeni suşlar, PDF13 ve PDF24 izolatlarının da *Aneurinibacillus aneurinilyticus*'a ait yeni suşlar olduklarına karar verildi.

Brevibacillus cinsine ait dokuz izolatın; *Brevibacillus* türleriyle arasındaki ilişkileri ortaya koymak amacıyla HV bölgesine ait baz dizinleri karşılaştırıldığında, PDF29 izolatının *Brevibacillus borstelensis*'e % 100 oranında benzerlik gösterdiği, PDF28 ve PDF22 izolatının *B. agri*'ye % 98, PDF22 izolatının *B. parabrevis*'e ve PDF17 izolatında *B. thermoruber* DSM 7064^T türüne % 98 oranında benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarının birbirlerine % 98 ve üzeri benzerlik gösterirken, *Brevibacillus* türlerinden en fazla % 96 oranında *B. parabrevis*'e benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. PDF19 izolatının da, PDF4, PDF10 ve PDF11 grubuna % 96-97 arası benzerlik gösterdiği, *Brevibacillus* türlerinden en fazla % 96 oranında *B. parabrevis*'e benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Bu dokuz izolatın HV bölgesine ait baz dizinleri baz alınarak *Brevibacillus* türleriyle yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç incelendiğinde, PDF17 izolatının *B. thermoruber* DSM 7064^T, PDF27 izolatının *B. parabrevis*, PDF22 ve PDF28 izolatlarının *B. agri*, PDF29 izolatının ise *B. borstelensis* türüyle grup oluşturdukları görülmektedir. PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarının birbirleriyle yakın ilişkili iken, *Brevibacillus* türlerinden ayrı bir dal oluşturdukları belirlenmiştir. PDF19 izolatının en yakın akrabalık derecesinin PDF4, PDF10 ve PDF11 arasında olduğu belirlenmiştir.

2004 yılında yine Goto ve arkadaşlarının, *Brevibacillus* türleri üzerine yapmış oldukları bir çalışmada HV bölgesinin, *Brevibacillus* türlerinin gruplandırılması ve tanımlanması için elverişli bir markır olduğu belirlemiştir. Yapmış oldukları bu çalışmada, 16S rRNA HV bölgesinin sıra analizi benzerliklerini dendogram olarak gösteren neighbour-joining ağacında, *Brevibacillus* türlerinin farklı dallarda toplandıklarını ve *B. agri*, *B. parabrevis*, *B. borstelensis* türlerine ait suşların, ait oldukları türün tip suşlarıyla bir dalda kümeleştiği ve küme içerisinde % 100 benzerlik gösterildiği belirlenmiştir. Yapılan bu

çalışma doğrultusunda, *Brevibacillus* cinsine ait dokuz izolatın HV bölgesine göre yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaçta kümelenmenin olduğu ve % 98 ve üzeri benzerliklerin bulunduğu bu dallar baz alındığında, PDF17 izolatının *B. thermoruber* DSM 7064^T, PDF27 izolatının *B. parabrevis*, PDF22 ve PDF28 izolatlarının *B. agri*, PDF29 izolatının ise *B. borstelensis* türüne ait yeni suşlar olduklarına karar verildi. HV bölgesi dizin benzerlikleri % 98 ve üzeri olan PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarının filogenetik ağaçta yakın ilişkili olmaları baz alındığında bu üç izolatın benzer olduklarına karar verilmiştir. Bu üç izolatın filogenetik ağaç üzerinde *Brevibacillus* türlerinden ayrı bir dal oluşturmaları ve HV dizin analizine göre *Brevibacillus* türlerine en fazla % 96 oranında benzerlik göstermeleri, PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarının *Brevibacillus* cinsine ait yeni tür olma potansiyeli çok yüksek olan yeni bir türün suşları oldukları düşünülmektedir. Ancak sistematik otoriteleri tarafından kesin tür tayinin yapılabilmesi için, DNA-DNA hibridizasyonun yapılarak bu güçlü yeni tür olma potansiyelinin netleştirilmesi gerekmektedir. Ancak DNA-DNA hibridizasyonu için gereken *Brevibacillus* türleri laboratuvarımızda mevcut olmadığından, bu bakterilerin temini ve DNA-DNA hibridizasyonun yapılması zaman alıcı bir süreç gerektirmektedir. Bu nedenle, DNA-DNA hibridizasyonları tez aşaması süresinde tamamlanamamıştır.

PDF19 izolatının HV bölgesi dizin analizleri incelendiğinde, bu izolatın PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarına % 96-97 oranında benzerlik gösterirken ve *Brevibacillus* türlerine en fazla % 96 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. HV bölgesine dayalı filogenetik ağaç üzerinde de PDF19 izolatının, en yakın akrabalık ilişkisinin PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarıyla olduğu, *Brevibacillus* türlerinden ayrı bir dalda toplandığı görülmektedir. HV dizin analizi benzerlik oranları ve HV'ye göre oluşturulan filogenetik ağaçtaki yeri göz önüne alındığında, PDF19 izolatının PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarından ve *Brevibacillus* türlerinden farklılık arz ettiği, ancak en yakın akrabalarının bu üç izolat olması nedeni ile, ilk olarak PDF19 izolatının, PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarıyla akrabalık ilişkisinin kesin olarak tanımlanabilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, PDF19 izolatının ilk olarak, bu üç izolatla DNA-DNA hibridizasyonun yapılması gerekmektedir. Tez sürecine yetiştirilemeyen bu çalışma tez sonrası tamamlanacaktır.

Sistematikte, 16S rRNA dizin analizinin sınırlayıcı etkileri, altın standart olarak kabul edilen DNA-DNA hibridizasyonun çok zahmetli ve zaman alıcı olmasının yanında ve bu deneyi yapabilecek yeterli donanım ve tecrübeye sahip dünyada sadece belli başlı laboratuvarların olması gibi güçlükler nedeniyle, 16S rRNA dizin analizine ve DNA-DNA

hibridizasyon yöntemine alternatif olacak veya en azından yapılması gereken DNA-DNA hibridizasyon sayısını azaltabilecek yeni teknikler araştırılmıştır. 2002 yılında, bakteri sistematik otoriteleri, protein kodlayan en az beş genin dizin analizinin, bir bakteri türünü yakın akrabalarından ayırmak için yeterli seviyede filogenetik verileri sağladığını ileri sürmüşlerdir. Bu yöntem kullanılarak bir tür tanımlandığı zaman, kullanılan genlerden tek bir tanesinin dizin verileri, bu türe, suşların ilave edilmesi için yeterli olacağını belirtmişlerdir. Tüm genom yerine, genomun tüm özelliklerini yansıtacak olan genlerin karşılaştırılması ile bakteri sınıflandırılmasının kolay ve güvenilir bir biçimde yapılabileceği düşünülmüş ve bu amaçla pek çok farklı gen incelenmiştir.

Zeigler (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, iki organizma arasındaki *recN* gen dizileri benzerliğinin, tüm genom benzerliğini yüksek oranda yansıttığı ileri sürülmüştür. Yine Zeigler'in 2005 yılında *Geobacillus* cinsinin sistematığında *recN* geninin kullanılabilirliği üzerine yaptığı çalışmada, bu modelin DNA-DNA hibridizasyon verileri ile örtüşen sonuçlar verdiği görülmüştür (Zeigler, 2005). Zeigler (2005) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına göre; iki bakteri türünün *recN* gen dizileri arasındaki benzerlik % 84'den az ise, % 95 güvenle, bu bakterilerin genomları arasındaki benzerliğin % 70'den daha az olduğu ve buna görede bu bakterilerin farklı türlere ait olduğu belirlenir. *recN* DNA dizileri arasındaki benzerlik % 96'dan fazla ise, % 95 güvenle, bu bakterilerin aynı türe ait oldukları belirlenir. *recN* dizileri arasındaki benzerlik % 84 ile % 96 arasında ise, genom arasındaki benzerliğin % 70'den az veya fazla olduğundan emin olamayız, bu nedenle bu bakterilerin benzerliği için kesin bir sonuca varılamaz. Bu veriler doğrultusunda, çalışmada elde edilen 12 *Geobacillus* izolatın *recN* dizin analizleri incelendiğinde, TH1 ve TH2 izolatlarının birbirlerine % 99 oranında benzerlik gösterdikleri ve bu izolatlarında *G. thermodenitrificans*'a da % 99 oranında benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. TF11 izolatının, en fazla *G. stearothermophilus*'a % 99 benzerlik gösterdiği, TH7 izolatının da en fazla *G. toebii*'ye % 95 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, *recN* benzerlik oranları değerlendirildiğinde % 95 güvenle, TH1 ve TH2 izolatlarının *G. thermodenitrificans*'ın yeni suşları, TF11 izolatının da *G. stearothermophilus*'un yeni suşu olabileceği düşünülmüştür. TH7 izolatının ise *recN* benzerlik değerinin şüpheli aralıkta olması nedeniyle *recN* dizin analizine göre bu izolat için yorum yapılamamaktadır.

recN dizin analizlerine göre, TF1 izolatının *G. kaustophilus*, *G. thermoleoverans*, *G. lituanicus* ve *G. vulcani* bakterilerine % 99 benzerlik ve *G. thermocatenulatus*'a da % 97

oranında benzerlik gösterdiği, diğer *Geobacillus* türlerine ise % 82'den daha az benzerlik gösterdiği görülmektedir. Zeigler 2005 yılında *Geobacillus* cinsinin sistematığında *recN* geninin kullanılabilirliği üzerine yaptığı çalışmada, *G. kaustophilus*, *G. thermoleoverans*, *G. thermocatenulatus*, *G. lituanicus* ve *G. vulcani* bakterilerinin çok yakın ilişkili olduklarını ve *recN* benzerliklerinin bu türlerin ayırımında yeterli olmadığını belirtmiştir. Zeigler bu beş türü Grup 3 adı altında bir grupta toplamış ve *recN* ağacında da Grup 3'ün ayrı bir dal oluşturduğunu ve Grup 3 üyelerinin ayırımında *recN* geninin yeterli olmadığını belirtmiştir. Bu veriler doğrultusunda, TF1 izolatının bu Grup 3 diye adlandırılan bakterilerden bir tanesine ait yeni bir suş olduğu, fakat Grup 3'deki hangi bakterinin suşu olduğu belirlenememiştir.

DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarının *recN* genlerinin birbirlerine % 99 benzerlik gösterdikleri ve bu nedenle de bu altı izolatın birbirleriyle aynı olduklarına karar verilmiştir. Bu altı izolatın ise, *Geobacillus* türlerine en fazla % 91 oranında Grup 3 üyelerine benzerlik gösterdikleri, % 85 oranında *G. uzenensis* ve *G. subterraneus*'a, % 83'den daha az oranda da diğer *Geobacillus* türlerine benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. *recN* dizileri arasındaki benzerlik % 84 ile % 96 arasında ise, genom arasındaki benzerliğin % 70'den az veya fazla olduğundan emin olamadığımızdan, bu bakterilerin *G. uzenensis*, *G. subterraneus* ve Grup 3 üyelerine olan benzerliği için kesin bir sonuca varılamaz.

TF12 izolatının *recN* geni benzerlikleri incelendiğinde, TF12 izolatının DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarına % 95 oranında benzerlik gösterdiği, % 94 oranında Grup 3 üyelerine benzerlik gösterdikleri, % 84 oranında *G. uzenensis* ve *G. subterraneus*'a, % 83'den daha az oranda da diğer *Geobacillus* türlerine benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu nedenle TF12 izolatının, DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarına ve *G. uzenensis*, *G. subterraneus* ve Grup 3 üyelerine olan benzerliği için kesin bir sonuca varılamaz.

recN geninin, *Geobacillus* cinsi içerisinde bazı türlerin ayırımında yeterli olmadığı ve sonuçlarının % 95 güvenle yorumlandığı için, elde edilen *recN* verilerini doğrulamak ve ayırım yapılamayan izolatların tür tayinlerinin yapılabilmesi için ilave genlerin incelenmesine karar verildi. Yapılan pek çok çalışma sonucunda kısmi *rpoB* dizin analizi; türler arasında büyük farklılık gösterirken, aynı türe ait suşlar arasında büyük oranda korunduğu ve bu sayede taksonomik çalışmalarda moleküler markır olarak kullanılabilirliği ortaya konulmuştur (Mollet vd., 1997; Drancourt ve Raoult, 2002; Ko vd., 2002; Kim vd., 2003; Korczak vd., 2004; Korczak vd., 2006;).

Geobacillus cinsine ait 12 izolatın tür tayinlerinin yapılmasına yol göstermesi amacıyla, bu izolatların *rpoB* genlerinin yaklaşık 400 bp'lik bölgesi çoğaltıldı ve analiz edildi. *Geobacillus* tip türlerinin kısmi *rpoB* gen dizinleri literatürden elde edildi ve çalışmada elde edilen izolatların *rpoB* gen dizinleriyle karşılaştırıldı. İlk olarak *Geobacillus* tip türlerinin kısmi *rpoB* gen dizinleri açısından benzerlik oranları incelendiğinde, Zeigler'in Grup 3 diye adlandırdığı ve birbirleriyle çok yakın ilişkili olduklarını belirttiği *G. kaustophilus*, *G. thermoleoverans*, *G. thermocatenulatus*, *G. lituanicus* ve *G. vulcani* türlerinin *rpoB* gen dizin analizi açısından da birbirlerine çok büyük oranda benzerlik gösterdiği (≥ 98) belirlendi. İncelenilen diğer *Geobacillus* tip türlerinin ise, *rpoB* gen dizinlerinin birbirlerine ve Grup 3 üyelerine en fazla % 93 oranında benzerlik gösterdikleri belirlendi. Bu veriler baz alınarak, çalışmada elde edilen izolatların *rpoB* gen dizin analizleri incelendiğinde, TH1 ve TH2 izolatlarının birbirlerine % 99 benzerlik gösterdikleri ve bu iki izolatın *G. thermodenitrificans*'a % 98 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *recN* ve *rpoB* gen analizlerine dayanarak, TH1 ve TH2 izolatlarının *G. thermodenitrificans*'a ait yeni suşlar olduklarına karar verildi. TF11 izolatının *rpoB* geni, % 99 oranında *G. stearothermophilus*'a benzerlik göstermektedir ve *recN* analizinin sonuçlarıyla paralel olarak bu izolatın *G. stearothermophilus*'un yeni bir suşu olduğuna karar verildi. *recN* gen analizine göre *G. toebii* ile benzerliği şüpheli olan TH7 izolatının *rpoB* gen benzerliğini incelendiğinde, incelenilen *Geobacillus* türlerine en fazla % 85 oranında benzerlik gösterdiği, ancak incelenilen *Geobacillus* türleri arasında *G. toebii* türü bulunmamaktadır. *rpoB* ve *recN* gen sonuçları göz önüne alındığında, TH7 izolatının *G. toebii* hariç diğer türlerle ait olmadığı netlik kazanmasına rağmen, *G. toebii* ile yakın ilişkili olduğu ancak *G. toebii* ile benzerlik derecesinin kesin olarak netleştirilemedi. TF1 izolatının *rpoB* geni, % 99 oranında Zeigler'in Grup 3 üyelerine benzerlik gösterdiği, diğer *Geobacillus* türlerine ise % 92'den daha az oranda benzerlik gösterdiği belirlendi. *recN* sonuçlarını destekler nitelikte, TF1 izolatının kesin olarak yeni tür olmadığı, Grup 3 üyelerinin bir suşu olduğu, ancak Grup 3 üyelerinden hangisinin suşu olduğu netlik kazanamamıştır.

DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarının *rpoB* genleri birbirlerine % 98 ve üzeri benzerlik gösterirken, incelenilen *Geobacillus* türlerine en fazla % 93 oranında Grup 3 üyelerine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *recN* geni sonuçlarına göre, bu izolatların *G. uzenensis*, *G. subterraneus* ve Grup 3 üyelerine olan benzerliği için kesin bir sonuca varılamamıştır. *rpoB* geni açısından Grup 3 bakterilerine düşük oranda benzerlik

göstermesi, bu altı izolatın Grup 3 üyelerinden farklı olduğunu göstermektedir. Ancak, *recN* analizinde benzerlikleri şüpheli olan *G. uzenensis* ve *G. subterraneus* türlerinin, tez kapsamında çalışılan kısmi *rpoB* gen bölgesinin dizin analizleri literatürde mevcut değildir. Bu nedenle, bu altı izolatın tür tayinlerinin kesin olarak yapılabilmesi için *G. uzenensis* ve *G. subterraneus* ile benzerliklerinin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Ancak, *Geobacillus* cinsinin sistematığında *recN* geninin kullanılabilirliği üzerine Zeigler (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, *G. uzenensis* bakterisinin tip türü (*G. uzenensis* U^T) yerine, bu bakterinin tip türü ile Nazina ve arkadaşları (2002) tarafından aynı makalede yayınlanan *G. uzenensis* X suşunu BGSC bankasından temin ederek çalışmıştır. Zeigler (2005) yaptığı bu çalışmada, satın aldığı *G. uzenensis* X bakterisinin 16S rRNA gen dizilimini belirlemiş (GenBank no: AY608959) ve Nazina ve arkadaşlarının literatüre verdikleri *G. uzenensis* X 16S rRNA gen dizini (GenBank no: AF276305) ile karşılaştırmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda, 16S rRNA gen dizilerinin % 98 oranında benzerlik gösterdiği ve ayrıca elde ettiği *recN* gen sonuçlarında da çalıştığı *G. uzenensis* X bakterisinin *G. subterraneus* ile çok yakın ilişkili olduklarını belirlemiştir. Bu veriler doğrultusunda, Zeigler *G. uzenensis* X BGSC 92A2 bakterisinin Nazina ve arkadaşları (Nazina vd., 2001) tarafından literatüre kazandırılan *G. uzenensis* X bakterisi olmadığını veya Nazina ve arkadaşları tarafından literatüre verilen 16S rRNA GenBank sırasının yanlış olduğunu belirtmiştir. Bu nedenle, *G. uzenensis* suşlarının taksonomik çalışmalarla onaylanması gerektiğini vurgulamıştır. Zeigler *recN* analizi çalışmasında, *G. uzenensis* bakteri olarak sadece bu şüpheli suşu kullandığı için, elde ettiği *G. uzenensis* X *recN* sırasının çok da güvenilir olmadığı ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, *recN* analizine göre DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarının *G. uzenensis*, *G. subterraneus* ve Grup 3 üyelerine olan şüpheli benzerlikleri içerisinde, *G. uzenensis*'e olan şüpheli benzerliği kesin olarak daha da şüpheli olmuştur. *rpoB* analizine göre bu izolatların Grup 3 üyelerine benzer olmadıkları belirlenmiş ancak *G. uzenensis*, *G. subterraneus* ile olan benzerlikleriyle ilgili yorum yapılamamıştır. Bu durumu netleştirmeye yardımcı olabilmesi amacı ile *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* ve *Alicyclobacillus* türlerinin gruplandırılması ve tanımlanması için elverişli bir markır olan HV bölgesinin *Geobacillus* cinsi için de kullanılmasına karar verilmiştir.

DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatları gibi TF12 izolatının da *recN* sonuçları, TF12 izolatının *G. uzenensis*, *G. subterraneus* ve Grup 3 üyelerine olan benzerliği kesin olarak belirlenmemiş ve ayrıca TF12 izolatının DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarına olan benzerliği de şüpheli olarak belirlenmişti. *rpoB* analizleri

sonucunda, TF12 izolatının Grup 3 üyelerine % 92 oranında ve DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarına % 94 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve bu sonuçlar doğrultusunda TF12 izolatının DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarından ve Grup 3 üyelerinden farklı olduğuna karar verildi. Ancak, *rpoB* geni açısından *G. uzenensis*, *G. subterraneus* ile karşılaştırılamadığı için ve bu izolatında tür tayininin yapılması için ilave analizlerin (HV) yapılmasına karar verildi.

Goto ve arkadaşlarının, 2000, 2002 ve 2004 yıllarında yapmış oldukları çalışmalarla, HV bölgesinin, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* ve *Alicyclobacillus* türlerinin gruplandırılması ve tanımlanması için elverişli bir markır olduğu belirlendi. Bu araştırmacıların 2000 yılında *Bacillus* cinsi ile yaptığı çalışmada, *Bacillus* cinsinden ayrılarak *Geobacillus* adında yeni bir cinse dâhil edilecek olan *B. thetmoleoverans*, *B. kaustophilus*, *B. stearothermophilus* ve *B. thermoglucosidasius* türlerini *Bacillus* cinsi içerisinde çalışmıştır. Bu dört türün diğer *Bacillus* cinsi üyelerinden çok ayrı bir dal oluşturduğunu belirlemiş ancak ayrı bir cins olarak ayrımını yapmamıştır. Yine bu çalışmada *B. thetmoleoverans* ve *B. kaustophilus*'un HV bölgelerinin birbirlerine % 100 benzerlik gösterdiği ve HV filogenetik ağacında aynı dalda toplandıkları, *B. stearothermophilus* ve *B. thermoglucosidasius* ise bu iki türünden ayrı dallar oluşturdukları belirlenmiştir. Goto ve arkadaşlarının (2000) bu çalışmasından yola çıkarak bu çalışmada, literatürdeki mevcut *Geobacillus* türlerinin ve bu türlere DNA-DNA hibridizasyon deneyi ile ait olduğu belirlenen suşların HV bölgeleri, literatürdeki mevcut 16S rRNA gen dizinlerinden elde edildi ve bu çalışmada elde edilen *Geobacillus* cinsine ait olan 12 izolatın HV bölgesiyle karşılaştırıldı ve filogenetik ağacı çizildi (Tablo 12; Şekil 18).

HV filogenetik ağacı incelendiğinde, *G. kaustophilus*, *G. thetmoleoverans*, *G. lituanicus* ve *G. vulcani* türlerinin birbirlerine çok yüksek oranda benzerlik gösterdiği ve ağaç üzerinde bir dalda gruplandıkları belirlenmiştir. *G. stearothermophilus*, *G. subterraneus*, *G. thermodenitrificans*, *G. caldxylosilyticus*, *G. thermoglucosidasius* türlerine ait tip suşların, bu türlere ait olan suşlara % 99 ve üzeri benzerlik gösterdikleri, HV filogenetik ağacında her tip suşın kendi suşlarıyla bir grup oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *G. jurassicus* DS1^T, *G. jurassicus* DS2 ve *G. uzenensis* U^T, *G. uzenensis* X (AF276305) bakterilerinin HV bölgelerinin % 99 ve üzeri benzerlik gösterdiği ve HV filogenetik ağacında bir dal üzerinde gruplandıkları görülmektedir. Zeigler (2005) *recN* analizi çalışmasında BGSC bakteri deposundan satın aldığı *G. uzenensis* X bakterisinin 16S rRNA gen dizinini elde edip, AY608959 numarası ile GenBank'a vermişti. Zeigler'in

elde ettiği *G. uzenensis* X 16S rRNA gen dizininden (AY608959) elde edilen HV bölgesinin, Nazina ve arkadaşlarının belirlediği *G. uzenensis* X 16S rRNA (AF276305) gen sırasından elde edilen HV bölgesine % 96 oranında benzerlik gösterirken, *G. subterraneus* DSM 7263^T ve *G. subterraneus* Sam ve *G. subterraneus* K suşlarının 16S rRNA gen dizinlerinden elde edilen HV bölgelerine ise % 99 ve üzeri benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. HV filogenetik ağacı üzerinde de *G. uzenensis* X (AY608959)'in, *G. subterraneus* grubu içerisinde yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca Zeigler tarafından kullanılan *G. uzenensis* X bakterisinin 16S rRNA (AY608959) geninin tüm dizininin, Nazina ve arkadaşları tarafından literatüre verilen *G. uzenensis* X (AF276305) 16S rRNA gen sırasına % 98 oranında benzerlik gösterirken, *G. subterraneus* türüne ise % 99.9 oranında benzerlik gösterdiği bu çalışmada belirlenmiştir. Bu veriler dikkate alındığında, Zeigler'in *recN* analizi için kullandığı *G. uzenensis* X bakterisinin; Nazina ve arkadaşları tarafından literatüre kazandırılan *G. uzenensis* X olmadığı ve bu bakterinin *G. subterraneus* olma ihtimalinin çok yüksek olduğu belirlenmiştir.

HV bölgesinin, *Geobacillus* cinsi içerisinde, Grup 3 üyeleri dışında, türler arasında ayırım yapabildiği, ayrıca bir türün suşları arasında yüksek oranda benzerlik gösterdiği bu sonuçlardan çıkarılmıştır (Şekil 18). Bu veriler doğrultusunda *Geobacillus* cinsine ait 12 izolatımızın HV bölgesi, 16S rRNA gen dizinlerinden elde edilmiş ve *Geobacillus* türleri ve suşlarıyla karşılaştırılmıştır. HV bölgelerinin karşılaştırılması sonucunda, TF11 izolatının *G. stearothermophilus*'a, TH1 ve TH2 izolatlarının *G. thermodenitrificans*'a, TF11 izolatının *G. stearothermophilus*'a % 99 ve üzeri benzerlik gösterdikleri ve bu sonuçları *recN* ve *rpoB* sonuçlarını destekler nitelikte olduğu, TH1 ve TH2 izolatlarının *G. thermodenitrificans*'ın, TF11 izolatının da *G. stearothermophilus*'un yeni suşları oldukları teyit edildi.

TF1 izolatının HV bölgesinin, *G. kaustophilus* ve *G. thermoleovorans*'a % 100 benzerlik gösterdiği ve Grup 3'ün diğer üyelerine % 98-99 oranında benzerlik gösterdiği ve HV filogenetik ağacında *G. kaustophilus* ve *G. thermoleovorans* suşlarıyla bir grup oluşturduğu görülmektedir. *recN* ve *rpoB* sonuçları doğrultusunda, TF1 izolatının Grup 3 üyelerine ait bir suş olduğu fakat Grup 3 üyelerinden hangisine ait olduğu belirlenemedi. HV analizleri, *recN* ve *rpoB* analizlerini destekleyip, bir adımda ileri götürecek nitelikte olup; TF1 izolatının Grup 3 üyelerinden *G. kaustophilus* veya *G. thermoleovorans*'ın birinin suşu olabileceği belirlendi.

TH7 izolatının HV bölgesinin *G. toebii* türüne % 98 benzerlik göstermesi, *recN* ve *rpoB* gen sonuçlarında olduğu gibi TH7 izolatının kesin tür tayinin belirlenememesine sebep olmaktadır. TH7 izolatının en fazla *G. toebii* türüne benzerlik gösterdiği belirlenmiş, fakat benzerlik seviyesi kesin olarak belirlenememiştir. *Geobacillus* türlerinin HV bölgeleri incelendiğinde, % 98 benzerlik oranının yakın ilişki türler arasında görüldüğü gibi, *G. thermoleoverans*'a ait iki suş arasında da görülmesi, % 98 oranın kesin bir sonuç veremediğini göstermektedir. Bu veriler değerlendirildiğinde, TH7 izolatının *G. toebii* ile yakın ilişki olduğunu, ancak *G. toebii*'ye ait yeni bir suş mu, yoksa *Geobacillus* cinsine ait yeni bir tür mü olduğunun kesin olarak belirlenebilmesi için DNA-DNA hibridizasyonunun yapılması gerektiği tespit edilmiştir.

DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarının HV bölgelerinin birbirlerine ve *G. jurassicus*, *G. uzenensis* U^T ve *G. uzenensis* X (AF276305)'e % 99 ve üzeri benzerlik gösterdikleri ve bu benzerlik gösterdikleri suşlar ile HV filogenetik ağacında aynı grupta yer aldıkları belirlenmiştir. *recN* analizine göre yakın ilişki olduğu ancak benzerliklerinin kesin olarak belirlenemediği, Grup 3 üyeleri ve *G. subterraneus*'a ise HV bölgeleri % 97 oranında benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar *rpoB* verilerini destekler nitelikte olup, DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarının Grup 3 üyeleri ve *G. subterraneus*'tan farklı oldukları ancak *G. uzenensis* veya *G. jurassicus* türlerinden birine ait yeni suşlar olduğu belirlenmiştir. *G. jurassicus*'un *recN* ve *rpoB* analizi literatürde mevcut olmadığı için *recN* ve *rpoB* analizlerinde *G. jurassicus* ile ilgili bilgi karşılaştırılması yapılamamıştır.

Son olarak TF12 izolatının HV bölgesi benzerlikleri incelendiğinde, TF12 izolatının HV bölgesinin DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarına, Grup 3 üyelerine ve *G. uzenensis* ve *G. jurassicus* suşlarına % 97 oranında benzerlik gösterdiği, diğer *Geobacillus* izolatların ise 97'den daha az bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 12). *recN* analizine göre TF12 izolatı, DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarına % 94-96 oranında benzerlik gösterdiği için, TF12 izolatının diğer 6 izolata olan benzerliği için kesin bir sonuca varılamadı. *rpoB* ve HV analiz sonuçları sonucunda, TF12 izolatının DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarından farklı olduğu belirlendi. HV filogenetik ağacında da, TF12 izolatının *Geobacillus* türlerinden ve bizim kendi *Geobacillus* izolatlarımızdan ayrı bir dal oluşturduğu görülmektedir. *recN*, *rpoB* ve HV analiz verileri değerlendirildiğinde, TF12 izolatının *Geobacillus* cinsine ait yeni tür olma potansiyelinin çok yüksek olduğu, ancak bakteri sistematik otoriteleri tarafından kesin tür

tayinin yapılabilmesi için DNA-DNA hibridizasyonu yapılarak, bu yeni tür potansiyelinin netleştirilmesi gerektiği belirlenmiştir.

Sistematigi yapılmış *Anoxybacillus* cinsine ait izolatların 16S rRNA gen dizin analizleri, izolatlarımızın *Anoxybacillus* türlerine yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak 16S rRNA gen dizin analizinin sadece cins seviyesinde ve birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilen türlerin ayrımında kullanılmasının uygun olduğu belirlenmiştir (Stackebrandt vd., 2002). Bu nedenle, *Anoxybacillus* cinsine ait izolatlarımızın tür seviyesinde sınıflandırılmasının yapılabilmesi için genotipik analizlerin yapılması gerekmektedir. Yapılan pek çok çalışmada, kısmi *rpoB* dizin analizinin; türler arasında büyük farklılık gösterirken, aynı türe ait suşlar arasında büyük oranda korunduğu bu sayede taksonomik çalışmalarda moleküler markır olarak kullanılabilirliği ortaya konulmuştur (Mollet vd., 1997; Drancourt ve Raoult, 2002; Ko vd., 2002; Kim vd., 2003; Korczak vd., 2004; Korczak vd., 2006). *Anoxybacillus* cinsinin sistematiginde kısmi *rpoB* geninin kullanılabilirliği üzerine yapılan bir literatür çalışması bulunmamaktadır. Tarafımızdan *Anoxybacillus* tip türleri ve suşları kullanılarak yapılan bir çalışmada *Anoxybacillus* cinsinin sistematiginde kısmi *rpoB* geninin kullanılabilirliği araştırıldı ve bu araştırma sonucunda, kısmi *rpoB* geninin *Anoxybacillus* türleri arasında farklılık gösterirken ($\leq$ % 97), aynı türe ait suşlar arasında büyük oranda ($\geq$ % 98) korunduğu belirlendi. Bu sayede de kısmi *rpoB* geninin *Anoxybacillus* cinsinin sınıflandırılmasında moleküler markır olarak kullanılabilirliği ortaya konuldu (Data verilmemiştir). Bu çalışmanın verileri referans alınarak, *Anoxybacillus* izolatlarımızın *rpoB* gen dizinleri belirlendi ve *Anoxybacillus* suşlarının *rpoB* geni ile karşılaştırıldı ve filogenetik ağaç çizildi (Tablo 13; Şekil 21). Bu veriler değerlendirildiğinde, TF15, PDF3, PDF18, PDF21, PDF38, TH4, D1041 ve D1042 izolatlarının birbirlerine % 98 ve üzeri benzerlik gösterdikleri, bu nedenle aynı tür bakteriler olduklarına karar verildi. Bu sekiz izolatın, *A. gonensis* NCIBM 13933^T tip suşu ve diğer suşlarına % 98 ve üzeri benzerlik gösterirken diğer *Anoxybacillus* türlerine ise % 96'dan daha az bir benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda TF15, PDF3, PDF18, PDF21, PDF38, TH4, D1041 ve D1042 izolatlarının *A. gonensis* NCIBM 13933^T e ait yeni suşlar olduklarına karar verildi.

PDF1, PDF2, PDF15, PDF16 ve TH5 izolatlarının *rpoB* genleri birbirlerine % 99 ve üzeri benzerlik gösterdikleri için bu beş izolatın birbirinin aynı bakteriler olduklarına karar verildi. Bu beş izolatın *rpoB* gen dizinleri, % 98 oranında *A. kamcthankensis*'e benzerlik

gösterirken diğer *Anoxybacillus* türlerine % 95'den daha az benzerlik gösterdikleri belirlendi. Bu veriler göz önüne alındığında, PDF1, PDF2, PDF15, PDF16 ve TH5 izolatlarının *A. kamchatkensis*'e ait yeni suşlar oldukları belirlendi.

D1021 izolatının *rpoB* geni analiz verileri incelendiğinde, D1021 izolatının *Anoxybacillus* türlerine en fazla % 96 oranında benzerlik gösterdiği ve *rpoB* filogenetik ağacında da D1021 izolatının *Anoxybacillus* türlerinden ve diğer izolatlardan ayrı bir dal oluşturduğu görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda, D1021 izolatının *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğuna karar verildi. Ancak bakteri sistematik otoriteleri tarafından kesin tür tayininin yapılması için DNA-DNA hibridizasyonun yapılması gerektiği vurgulandığı için, D1021 izolatının *Anoxybacillus* türleriyle DNA-DNA hibridizasyonun yapılmasına karar verildi. Bu çalışma doğrultusunda, D1021 izolatının ve *Anoxybacillus* türlerinin genomik DNA'ları Marmur prosedürüne göre izole edildi ve Mandel ve Marmur (1968) tarafından geliştirilen termal denatürasyon yöntemine göre D1021 izolatının DNA baz kompozisyonu % 42,9 olarak belirlendi. Marmur prosedürüne göre izole edilen D1021 ve *Anoxybacillus* türlerinin genomik DNA'ları kullanılarak, De Ley ve arkadaşlarının (1970) geliştirdiği DNA-DNA hibridizasyon yöntemine göre DNA-DNA benzerlik seviyesi belirlendi. D1021 izolatının *A. pushchinoensis* DSM 12423^T'e % 38,7, *A. gonensis* NCIBM 13933^T'e % 55,6, *A. ayderensis* NCIBM 13972^T'e % 59, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T'e % 63, *A. kestanbolensis* NCIBM 13971^T'e % 32,8, *A. flavithermus* DSM 2641^T'e % 38,4, *A. bogrovensis* DSM 17956^T'e % 30 ve *A. thermarum* DSM 17141^T'a % 40 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Bakteri sistematik otoriteleri tarafından, aynı türe ait bakterilerin DNA-DNA homolojilerinin % 70'den daha fazla olduğu, farklı türlerin ise % 70'den daha az benzerlik gösterdiği kabul edilmektedir (Wayne vd., 1987). Bu nedenle, D1021 izolatının *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğuna karar verildi ve *Anoxybacillus kaynarcensis* D1021^T olarak adlandırıldı.

Thermus cinsine ait olan 5 izolatın (TF2, TF3, TF5, TF6 ve TF7), SDS-PAGE analizi sonucunda çok benzer protein profili gösterdiklerinden, beş izolattan sadece bir tanesi (TF5) temsili olarak seçildi. *Thermus* cinsinin tür tayinine yardımcı olabilecek herhangi bir gen analizi veya fenotipik test bulunamadığı için, TF5 izolatının kesin tür tayinin yapılabilmesi için DNA-DNA hibridizasyon çalışmasının yapılmasına karar verildi. 16S rRNA dizin analizi sonuçlarına göre, TF5 izolatı % 97'in üzerinde sadece *Thermus scotoductus* DSM 8553^T'a benzerlik gösterdiği için, DNA-DNA hibridizasyon çalışması TF5 ve *T. scotoductus* DSM 8553^T arasında yapıldı ve TF5 ve *T. scotoductus* DSM

8553^T'un DNA-DNA benzerlik seviyesi % 90 olarak belirlendi. Bakteri sistematik otoriteleri tarafından, aynı türe ait bakterilerin DNA-DNA homolojilerinin % 70'den daha fazla olduğu kabul edilmektedir (Wayne vd., 1987). Bu nedenle, TF5 izolatının, *T. scotoductus* DSM 8553^T türüne ait yeni bir suş olduğu belirlenmiştir.

Schlegelella cinsi *Schlegelella aquatica* LMG 23380^T ve *Schlegelella thermodepolymerans* DSM 15344^T; *Chelatococcus* cinsi *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T ve *Chelatococcus asaccharovorans* DSM 6462^T ve *Pseudoxanthomonas* cinsinin üyeleri, çoğunlukla mezofilik karakterlidirler, sadece *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T bakterisi termofilik özelliktedir. Bu cinslerin üyeleri arasında literatürde verilen yağ asidi içeriklerinin farklılık gösterdiği, bu nedenle bu cinslerin sınıflandırılmasında yağ asidi içeriklerinin kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu doğrultuda bu cinslere ait olan PDF7, PDF20 ve PDF31 izolatlarının yağ asidi içerikleri Microbial Identifikasyon System'i (MIS) ile belirlendi ve literatürdeki bilgilerle karşılaştırıldı (Tablo 14, 15 ve 16). Yağ asidi karşılaştırması incelendiğinde, PDF7, PDF20 ve PDF31 izolatlarının yağ asidi içeriklerinin ait oldukları cinslerin üyelerinin yağ asidi içeriklerinden çok farklı olduğu belirlendi. Bu nedenle, PDF7, PDF20 ve PDF31 izolatlarının kesin tür tayinlerinin yapılabilmesi için, DNA-DNA hibridizasyonlarının yapılmasına karar verildi ve DNA-DNA benzerlik seviyeleri belirlendi. PDF7 ve *S. aquatica* LMG 23380^T'in DNA-DNA benzerlik seviyesi % 50 iken; PDF7 ve *S. thermodepolymerans* DSM 15344^T arasındaki DNA-DNA benzerlik seviyesinin % 87 olduğu; PDF20 ve *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T arasındaki DNA-DNA benzerlik seviyesinin % 80; PDF31 ve *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T arasındaki DNA-DNA benzerlik seviyesinin % 91 olduğu belirlendi. Bakteri sistematik otoriteleri tarafından, aynı türe ait bakterilerin DNA-DNA homolojilerinin % 70'den daha fazla olduğu kabul edilmektedir (Wayne vd., 1987). Bu nedenle, PDF7 izolatının *S. thermodepolymerans* DSM 15344^T türüne ait yeni bir suş; PDF20 izolatının *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T türüne ait yeni bir suş; PDF31 izolatının da *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T türüne ait yeni bir suş olduğuna karar verildi.

Yapılan bu tez çalışmaları sonucunda, dünya literatürüne *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür kazandırılmıştır ve bu yeni tür *Anoxybacillus kaynarcensis* D1021^T olarak adlandırılmıştır. Ayrıca, *A. gonensis* NCIBM 13933^T e ait 8 yeni suş (TF15, PDF3, PDF18, PDF21, PDF38, TH4, D1041, D1042) ve *A. kamcthankensis*'e ait beş yeni suş

(PDF1, PDF2, PDF15, PDF16, TH5) literatüre kazandırıldı. PDF6 ve PDF32 izolatının *Aneurinibacillus danicus* türüne ait yeni suşlar, PDF13 ve PDF24 izolatlarının da *Aneurinibacillus aneurinilyticus*'a ait yeni suşlar olduğu belirlendi. PDF17 izolatının *B. thermoruber* DSM 7064^T, PDF27 izolatının *B. parabrevis*, PDF22 ve PDF28 izolatlarının *B. agri*, PDF29 izolatının ise *B. borstelensis* türüne ait yeni suşlar olduklarına karar verildi. PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarının *Brevibacillus* cinsine ait yeni tür olma potansiyeli çok yüksek olan yeni bir türün suşları oldukları düşünülmektedir. TH1 ve TH2 izolatlarının *G. thermodenitrificans*'ın, TF11 izolatının da *G. stearothermophilus*'un yeni suşları olduklarına karar verildi. TF1 izolatının, *G. kaustophilus* veya *G. thermoleovorans*'dan birine ait yeni bir suş, DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarının *G. uzensis* veya *G. jurassicus* türlerinden birine ait yeni suşlar olduğu belirlendi. TF12 izolatının *Geobacillus* cinsine ait yeni tür olma potansiyelinin çok yüksek olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca, *T. scotoductus* DSM 8553^T türüne ait beş yeni suş (TF2, TF3, TF5, TF6, TF7); *S. thermodepolymerans* DSM 15344^T türüne ait yeni bir suş (PDF7); *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T türüne ait yeni bir suş (PDF20); *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T türüne ait yeni bir suş (PDF31) dünya literatürüne kazandırıldı.

Bu çalışmada ayrıca, İzmir Kaynarca kaplıcasından izole edilen ve dünya literatürüne yeni tür olarak kazandırılan *Anoxybacillus kaynarcensis* D1021^T'de glukoz izomeraz enziminin aktivitesi belirlendi ve *A. kaynarcensis* D1021^T'e ait GI enzimini kodlayan genin klonlanması, enzimin biyokimyasal özelliklerinin ve kinetik parametrelerinin belirlenmesine çalışıldı. Bu tez kapsamında öncelikle, GI enzimini kodlayan genin tüm baz dizilimi açığa çıkarılmış ve sonrasında, *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sı GenBank'taki diğer bakterilerin GI genleriyle amino asit dizilimleri dikkate alınarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonuçlarına göre *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sı amino asit dizilimleri bakımından; *Geocillus stearothermophilus*'a % 92, *Geobacillus thermoglucosidasius* ve *Geobacillus kaustophilus*'a % 91, *Geobacillus thermodenitrificans*'a % 90, *Geobacillus caldxylosilyticus*'a % 89, *Bacillus halodurans*'a % 79, *Bacillus clausii*'e % 78, *Bacillus megaterium*'a % 77, *Bacillus cereus*'a % 76, *Bacillus subtilis*'e % 76, *Bacillus coagulans*'a % 75 ve daha birçok bakterinin GI genine de % 70'in üzerinde benzerlik göstermektedir. Genel olarak bakıldığında GI'lar amino asit dizilimlerine göre iki grup altında toplanırlar (Bhosale vd., 1996). GI'lar, enzimin N-terminal ucunda 40-50 amino asitlik bir bölgenin olup olmamasına göre 2 sınıfa ayrılmışlardır. Tip 1 GI'lar 390 amino asit içerir ve *Streptomyces* spp., *Actinoplanes* spp., *Ampullariella* spp., *Arthrobacter* spp., ve *Thermus*

thermophilus gibi türlere ait GI'lar bu sınıftandır. *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, ve *Thermotoga* spp. türlerine ait GI'lar ise 440 amino asitten meydana gelmişlerdir ve Tip 2 GI'lar olarak sınıflandırılırlar (Hess vd., 1998). GenBank'ta yapılan bu karşılaştırmalar sonucunda, *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının Tip 2 GI'lara benzerlik gösterdiği görülmektedir. *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının 441 amino asitten oluşması da bu sonucu doğrulamaktadır.

A. kaynarcensis D1021^T glukoz izomeraz geni, doğrudan pET28a+ ekspresyon vektörüne Xyla_Ex_F2 primeri ve Xyla_Ex_R3 primerleri kullanılarak klonlandı ve *E. coli* BL21 (DE3) suşunda ekspres edildi. *E. coli* BL21/pETD1021GI sistemi ile üretilen enzim, mezofilik olan *E.coli* BL21 hücresinde üretildi. Dolayısı ile bu konak hücreden elde edilen hücre özütünde vektörden çoğaltılan enzim dışında diğer tüm proteinlerin, mezofilik karakterde olduklarından dolayı kısa süreli bir ısı şoku uygulamasında, çok büyük bir bölümü denatüre oldu. Termofilik karakterli enzimler ise bu durumdan etkilenmedi. Bu sayede enzimin hidrofobik ve iyon değişim kromatografileri ile saflaştırma basamaklarında kolaylık sağlanmaktadır. Enzime ait saflaştırma tablosundan da görüleceği üzere ısı bozunumu yöntemi ile hücre özütlerindeki GI'ya ait spesifik aktivite belirgin bir oranda artırıldı.

Karakterizasyon çalışmaları enzim aktivasyonu üzerinden yapılmaktadır. Bu çalışmada enzim aktivasyonu, reaksiyon sonucu açığa çıkan fruktoz miktarına göre belirlenmektedir. Dolayısı ile glukoz izomeraz enziminin karakterizasyonunun yapılabilmesi için reaksiyon sonrasında açığa çıkan fruktoz miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Oluşan fruktoz miktarı Dische ve Borenfreund'un (1951) geliştirdikleri sistein-karbozol sülfirik asit metoduyla belirlenmiştir. Açığa çıkan fruktoz, bu reaksiyon sonrasında, pembe-mor renkli bir ürüne dönüşmektedir. Bir çözelti içerisindeki fruktoz miktarı 560 nm dalga boyunda yapılan spektroskopik ölçümler sonrası oluşturulan fruktoz standardından belirlenebilmektedir. Reaksiyon sonrasında özellikle analiz yapılacak örnek içerisinde yüksek miktarda fruktoz oluşmaktadır. Bu durum ise özellikle belli bir yoğunluktan sonra spektrofotometrede bulunması durumunda yüksek miktarlarda renkli ürün gerçek değerinin altında ölçüm alınmasına sebep olmaktadır. Lambert-Beer Kanunu olarak bilinen bu durum sonucunda artan fruktoz içeriğine karşı belli bir noktadan sonra alınan ölçümlerin gerçeği yansıtmadığı saptanmıştır. Bu nedenle enzim seyreltilmeden

yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar aldatıcı olmaktadır. Reaksiyon öncesinde enzimin gerekli miktarlarda seyreltilmesi gerekliliği anlaşılmıştır.

Yapılan kinetik incelemelerde, *A. kaynarcensis* D1021^T GI'nin glukoz için düşük *Km* değerine sahip olduğu, dolayısı ile enzimin glukozla olan ilgisinin yüksek olduğu belirlendi. Tablo 18'de de görüldüğü üzere, *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının *Km* değerinin birçok mikroorganizmanın *Km* değerine göre düşük olduğu görünmektedir. Genel olarak bakıldığında; *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının *Km* değeri amino asit olarak benzerlik gösterdiği türlere ait GI'ların *Km* değerine yakın olduğu görünmektedir.

Tablo 18. Çeşitli mikroorganizmalara ait GI'nin glukoz için *Km* değerleri

Mikroorganizma	<i>Km</i> (mM)	Kaynaklar
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	0,24	(Chen ve Anderson, 1979)
<i>Streptomyces albus</i>	86	(Sanchez ve Smiley, 1975)
<i>Arthrobacter</i> sp.	86	(Smith vd., 1991)
<i>Bacillus coagulans</i>	90	(Danno, 1970)
<i>Anoxybacillus kaynarcensis</i> D1021 ^T	101	Bu çalışma
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	120	(Liu vd., 1996)
<i>Bacillus</i> sp.	142	(Chauthaiwale ve Rao, 1994)
<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	146	(Karaoğlu, 2010)
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	250	(Suekane vd., 1978)
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	290	(Jenkins vd., 1992)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	298	(Kawai vd., 1994)
<i>Streptomyces</i> sp.	400	(Inyang vd., 1995)
<i>Lactobacillus brevis</i>	920	(Yamanaka, 1975)

GI'nin optimum sıcaklığı, genel olarak çeşitli organizmalarda 60°C ile 80°C arasında değişiklik göstermektedir (Bhosale vd., 1996). *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sı optimum 80°C'de aktivite gösterdiği bulundu. *Streptomyces* sp. (Inyang vd., 1995), *Bacillus* sp. (Chauthaiwale ve Rao, 1994), *Thermotoga neapolitana* (Hess vd., 1998) ve *Thermus thermosulfurogenes* (Bhosale vd., 1996) türlerine ait GI'nin optimum çalışma sıcaklıklarının 80°C'den daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu GI'lar haricindeki diğer GI'lar genel olarak optimum 60°C ile 80°C arasında aktivite göstermektedirler. Bu verilere

dayanılarak, 80°C'lik optimum çalışma sıcaklığı ile *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının genel olarak termofilik bir enzim olduğu söylenebilir.

GI'ların genel olarak optimum pH aralığı 7,0 ve 9,0 arasında değişmektedir. Sadece, *Thermoanaerobacterium* sp. (Lui vd., 1996), *Actinoplanes missouriensis* (VanTillbeurgh vd., 1992) ve *Lactobacillus brevis* (Yamanaka, 1975) türlerine ait GI'ların optimum pH değeri 6,5'dir. Bu GI'lar haricindeki diğer GI'ların genel olarak optimum pH değerleri 6,5'in üzerindedir. *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının optimum pH değeri 7,0 olarak bulunmuştur. Bu özelliği ile enzim, özellikle endüstriyel olarak arzu edilen asidik pH değerlerine genel olarak yakın olduğu görülmektedir.

Literatürdeki GI'ların ısı kararlılıkları incelendiğinde, *Streptomyces olivochromogenes* (Joo vd., 2001) GI'sının 30 dakika sonunda 50°C'de % 100 kararlı, 65°C'de % 50 aktivite kaybı, 70°C'de ise % 70 aktivite kaybı gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus* sp. (Kwon vd., 1987) GI'sının 30 dakika sonunda 50°C'de % 100 kararlı, 60°C'de aktivitesinin % 35'inin kaybettiği, 30 dakika sonunda ise % 65 kayıp gösterdiği belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. (Khire vd., 1990) GI'sının 70°C' sadece 10 dakika kararlı kalabildiği, 80°C'de 10 dakika sonunda % 80 aktivite kaybettiği gösterilmiştir. *Geobacillus stearothermophilus* (Suekane vd., 1978) GI'sının 75°C'de 60 dakikaya kadar kararlı olduğu; *Streptomyces corchorusii* (Joo vd., 2001) GI'sının 85°C'de 30 dakika sonunda % 100 kararlı olduğu görülmektedir. *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının ısı kararlılığı incelendiğinde, 30 dakika sonunda 65°C'de % 30, 70°C'de % 40 ve 75°C'de ise % 50 aktivite kaybettiği görülmektedir. *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının, optimum sıcaklıkta 80°C'de 30 dakika sonunda aktivitesini % 60 oranında kaybettiği görülmektedir, endüstriyel alanda GI'ların kullanım sıcaklığı olan 60°C'de ise yarım saat sonunda % 95 aktivite gösterdiği, 50°C ve 55°C'de ise hiç aktivite kaybetmediği görülmektedir. Bu açıdan *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının avantajlı olmasına karşın, + 4°C'de 1 hafta boyunca bekletilen enzimin günlük aktivite ölçümleri sonucunda, aktivitesinde sürekli bir azalmanın olduğu belirlenmiştir. Bu durum özellikle enzimin saklanma koşullarının belirlenmesi açısından önemli bir sıkıntı oluşturmaktadır. Bu nedenle, *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının ileriki çalışmalarda + 4°C'de ısı kararlılığının mutasyonlarla artırılması yoluna gidilmesinin iyi olacağı düşünülmektedir.

Literatürdeki GI'ların pH kararlılıkları incelendiğinde, *Bacillus coagulans* (Danno vd., 1970) GI'sının 60 dakika sonunda, pH 4'de % 100 aktivite kaybettiği, pH 5'de hiç aktivite kaybetmediği ve pH 9'da ise % 20 aktivite kaybettiği gözlenmiştir. *Geobacillus*

stearothermophilus (Suekana vd., 1978) GI'sinin 30 dakika sonunda pH 5'de % 100 aktif olduğu, *Streptomyces olivochromogenes* (Suekana vd., 1978) GI'sinin ise 30 dakika sonunda pH 4'de % 100 aktif olduğu belirlenmiştir. *Bacillus* sp. (Kwon vd., 1987) GI'sinin 30 dakika sonunda pH 6'da kararlı kaldığı, *Lactobacillus* sp. (Yamanaka vd., 1977) GI'sinin 30 dakika sonunda pH 6,5'da kararlı kaldığı, *Streptomyces* sp. (Khire vd., 1990) GI'sinin ise 30 dakika sonunda pH 9'da % 100 kararlı olduğu belirtilmiştir. *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sinin pH kararlılığı incelendiğinde, 30 dakika sonunda pH 5'de % 30, pH 5,5'de % 20, pH 6-8 aralığında yaklaşık % 10 aktivite kaybettiği görülmektedir. *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sinin pH 6-6,5 aralığında 3 saat sonunda % 40 aktivite kaybettiği, pH 5-5,5 değerlerinde ise % 75-85 aktivite kaybettiği görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sinin endüstriyel olarak arzu edilen asidik pH değerlerinde çok kararlı olmadığı görülmektedir.

Endüstriyel alanda özellikle gıda sektöründe duyulan talep sonucunda; daha çok verimli, yüksek sıcaklık ve asidik pH değerlerinde çalışabilen glukoz izomerazlara ihtiyaç duyulmuş ve bu ihtiyaçlardan dolayı bugüne kadar birçok termofilik ve asidik karakterli bakterinin glukoz izomerazı ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Halen daha, endüstriyel açıdan daha çok arzu edilen özellikli glukoz izomerazlara ihtiyaç bulunmaktadır. Yukarıda yapılan araştırmalar ve karşılaştırmalar sonucu *A. kaynarcensis* D1021^T GI'si hakkında tespit ettiğimiz bazı özellikler açısından, enzimin endüstride kullanılmakta olan enzimlerle rekabet edebilir olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada, Karakoç Kaplıcası (İzmir), Kaynarca Kaplıcası (İzmir), Nebiler Kaplıcası (İzmir), Alangüllü Kaplıcası (Aydın), Çamköy Çamur Ilıcasının (Aydın) termofilik bakteri florası belirlendi. Bu kaplıca ve kaynak sularının filtreden geçirilmesi suretiyle ve yapılan zenginleştirme kültürleri sonucunda, Karakoç kaplıcasından 10, Kaynarca kaplıcasından 7, Nebiler kaplıcasından 8, Alangüllü kaplıcasından 8, Çamköy Çamur ılıcasından 8, ve Aydın Germencik Ömerbeyli jeotermal sahasından 10 adet olmak üzere birbirinden farklı olabilecek olan toplam 51 adet izolat seçildi. Bakterilerin sınıflandırılması için gerekli olan genotipik bilginin ilk ve temel adımı olan 16S rRNA gen analizi yapılarak, 12 izolatın *Geobacillus*, 18 izolatın *Anoxybacillus*, 9 izolatın *Brevibacillus*, 5 izolatın *Thermus*, 4 izolatın *Aneurinibacillus* ve 1'er izolatında *Pseudoxanthomonas*, *Schlegelella* ve *Chelatococcus* cinslerine ait oldukları belirlendi.

İzolatların tür seviyesinde sistematiklerinin yapılabilmesi için kemotaksonomik ve genotipik analizler yapıldı. Bu analizler sonucunda, İzmir Kaynarca kaplıcasından izole edilen D1021 izolatının, *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğu belirlendi ve *Anoxybacillus kaynarcensis* D1021^T olarak adlandırıldı. Karakoç, Kaynarca ve Nebiler kaplıcasından izole edilen TF15, PDF3, PDF18, PDF21, PDF38, TH4, D1041, D1042 izolatlarının *Anoxybacillus gonensis* NCIBM 13933^T'e ait suşlar oldukları ortaya çıkarıldı. Çamköy Çamur ılıcası ve Aydın Germencik Ömerbeyli jeotermal sahasından izole edilen PDF1, PDF2, PDF15, PDF16, TH5 izolatlarının *Anoxybacillus kamcthankensis*'e ait yeni suşlar oldukları belirlendi.

Alangüllü kaplıcasından izole edilen PDF6 ve PDF32 izolatının *Aneurinibacillus danicus* türüne ait yeni suşlar, Nebiler kaplıcasından izole edilen PDF13 ve PDF24 izolatlarının da *Aneurinibacillus aneurinilyticus*'a ait yeni suşlar olduğu belirlendi. Ayrıca, PDF17 izolatının *B. thermoruber* DSM 7064^T, PDF27 izolatının *B. parabrevis*, PDF22 ve PDF28 izolatlarının *B. agri*, PDF29 izolatının ise *B. borstelensis* türüne ait yeni suşlar olduklarına karar verildi. Çamköy Çamur ılıcasından ve Aydın Germencik Ömerbeyli jeotermal sahasından izole edilen PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarının *Brevibacillus* cinsine ait yeni tür olma potansiyellerinin çok yüksek olduğu ve Alangüllü kaplıcasında izole edilen PDF19 izolatının da bu üç suşla yakın ilişki olduğu fakat bazı farklılıklar arz ettiği için yeni bir tür olabileceği düşünülmektedir.

TH1 ve TH2 izolatlarının *G. thermodenitrificans*'ın, TF11 izolatının da *G. stearothermophis*'un yeni suşları olduklarına karar verildi. TH7 izolatının *G. toebii* türüne yakın benzerlik gösterdiği belirlenmiş, fakat benzerlik oranı kesin olarak belirlenemedi. TF1 izolatının, *G. kaustophilus* veya *G. thermoleovorans*'tan birine ait yeni bir suş, DF20, TF13, TF14, TF16, TF17 ve TH6 izolatlarının *G. uzenensis* veya *G. jurassicus* türlerinden birine ait yeni suşlar olduğu belirlendi. TF12 izolatının *Geobacillus* cinsine ait yeni tür olma potansiyelinin çok yüksek olduğu sonucuna varıldı.

Ayrıca, *T. scotoductus* DSM 8553^T türüne ait beş yeni suş (TF2, TF3, TF5, TF6, TF7); *S. thermodepolymerans* DSM 15344^T türüne ait yeni bir suş (PDF7); *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069^T türüne ait yeni bir suş (PDF20); *Pseudoxanthomonas taiwanensis* KCTC 22832^T türüne ait yeni bir suş (PDF31) dünya literatürüne kazandırılmıştır.

Yapılan bu çalışma sonucunda bakteri tür tayininde son zamanlarda kullanılan fenotipik ve genotipik testlerin kullanılması ile dünya literatürüne bir adet yeni bakteri türü, toplamda 50 yeni suş ve ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda yeni tür olma potansiyeline sahip yeni *Brevibacillus* spp. ve *Geobacillus* spp. elde edilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca, İzmir Kaynarca kaplıcasından izole edilen ve dünya literatürüne yeni tür olarak kazandırılan *Anoxybacillus kaynarcensis* D1021^T'de glukoz izomeraz aktivitesi belirlendi. *Anoxybacillus kaynarcensis* D1021 glukoz izomeraz enzimin tüm baz dizilimi belirlendi ve enzimi kodlayan gen pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak *E. coli* BL21(DE3) suşunda aşırı miktarlarda üretildi. Enzimin bu mikroorganizmadan izole edilip kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı, biyokimyasal çalışmalar yapılarak enzimin karakterizasyonu tamamlandı. Elde edilen verilere göre *Anoxybacillus kaynarcensis* D1021^T GI'sı optimum 80°C'de ve 7,0 pH'da çalışan termofilik bir enzimdir. Enzimin *K_m*'si 101,75 mM *V_{max}*'ı ise 14,06 µmol/dk/mg protein olarak bulundu.

A. kaynarcensis D1021^T GI'sının pH kararlılığı incelendi ve 30 dakika sonunda pH 5'de % 30, pH5,5'de % 20, pH 6-8 aralığında yaklaşık % 10 ve pH 10 ve pH 11 de ise % 25 ve % 30 aktivite kaybettiği görüldü. *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının ısıl kararlılığına bakıldı ve 30 dakika sonunda 65°C'de % 30, 70°C'de % 40 ve 75°C'de ise % 50 aktivite kaybettiği görüldü. *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının, optimum sıcaklıkta 80°C'de 30 dakika sonunda aktivitesini % 60 oranında kaybettiği belirlendi.

6. ÖNERİLER

Çamköy Çamur Ilıcasından ve Aydın Germencik Ömerbeyli jeotermal sahasından izole edilen PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarının HV analizleri sonucunda, *Brevibacillus* cinsine ait yeni tür olma potansiyeli çok yüksek olan yeni bir türün suşları oldukları düşünülmektedir. PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarının kesin tür tayinlerinin yapılabilmesi için, 16S rRNA gen dizin analizine göre % 97 ve üzeri benzerlik gösterdiği *Brevibacillus* tip türlerinin satın alınıp, DNA-DNA hibridizasyonlarının yapılması gerekmektedir.

HV bölgesine dayalı filogenetik ağaç analizinde, PDF19 izolatının, en yakın akrabalık ilişkisinin PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarıyla olduğu, *Brevibacillus* türlerinden ayrı bir dalda toplandığı belirlenmişti. Alangüllü Kaplıcasında izole edilen PDF19 izolatının HV analizi sonucunda, bu üç suşla yakın ilişkili olduğu fakat aralarında farklılıklar da olduğu için, ilk olarak PDF19 izolatının, PDF4, PDF10 ve PDF11 izolatlarıyla akrabalık ilişkisinin kesin olarak tanımlanabilmesi amacıyla DNA-DNA hibridizasyonlarının yapılması gerekmektedir. Hibridizasyon sonucunda PDF19 izolatının bu üç izolattan farklı olduğu belirlenirse, *Brevibacillus* tip türleriyle DNA-DNA hibridizasyonlarının yapılarak PDF19 izolatının kesin tür tayinin yapılması gerekmektedir.

Zeigler'in 2005 yılında *Geobacillus* cinsinin sistematğinde *recN* geninin kullanılabilirliği üzerine yaptığı çalışmada, BGSC bakteri bankasından satın aldığı *G. uzenensis* X BGSC 92A2 bakterisinin Nazina ve arkadaşları tarafından literatüre kazandırılan *G. uzenensis* X bakterisi olmadığını veya Nazina ve arkadaşları tarafından literatüre verilen GenBank sırasının yanlış olduğunu belirtmiştir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan HV analizleri sonucunda, Zeigler'in *recN* analizi için kullandığı *G. uzenensis* X bakterisinin; Nazina ve arkadaşları tarafından literatüre kazandırılan *G. uzenensis* X olmadığı ve bu bakterinin *G. subterraneus* olma ihtimalinin çok yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda, Zeigler *recN* analizi çalışmasında, *G. uzenensis* bakteri olarak sadece bu şüpheli suşu kullandığı için, elde ettiği *G. uzenensis* X *recN* sırasının çok da güvenilir olmadığı ortaya çıkmaktadır.

Sistematikteki bu karmaşıklığın netleştirilmesi için, *G. uzenensis*'in tip türü olan *G. uzenensis* U^T'nin DSMZ bakteri bankasından satın alınıp, *recN* analizi yapılarak literature gerçek verilerin sunulması gerekmektedir. Ayrıca, sistematik çalışmalarında moleküler markır olarak kullanılan *rpoB* geninin bu tez kapsamında çalışan bölgesi, literatürde *G.*

uzenensis U^T için belirlenmemiştir. *G. uzenensis* U^T 'nin kısmi *rpoB* gen analizi yapılarak, çalışılan kısmi *rpoB*'nin *Geobacillus* cinsinin sistematigindeki kullanılabilirliği ile ilgili daha ileri düzeyde bilgilerin literatüre kazandırılması gerekmektedir. Ayrıca HV analizlerine göre, *G. uzenensis* U^T bakterisinin, *G. jurassicus* DS1^T ile çok yakın ilişkili oldukları ve birbirlerinden farklılık arz etmedikleri belirlenmiştir. *Geobacillus* cinsinin sistematiginde kullanılabilirliği gösterilen *recN* ve kısmi *rpoB* gen bölgeleri, bu yakın ilişkili *G. uzenensis* U^T ve *G. jurassicus* DS1^T bakterilerinde belirlenmemiştir. Bu nedenle, *G. jurassicus* DS1^T bakterisinin DSMZ bakteri bankasından satın alınıp, *recN* ve *rpoB* analizlerinin yapılarak bu iki genin *Geobacillus* cinsi içerisindeki ayırım gücü hakkındaki sistematik bilgilerin literatüre ilave edilmesi gerekmektedir.

recN, *rpoB* ve HV analiz verileri doğrultusunda, TF12 izolatının *Geobacillus* cinsine ait yeni tür olma potansiyelinin çok yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak bakteri sistematik otoriteleri tarafından kesin tür tayinin yapılabilmesi için 16S rRNA gen dizin analizine göre % 97 ve üzeri benzerlik gösterdiği *Geobacillus* tip türlerinin elde edilip, DNA-DNA hibridizasyonlarının yapılması gerekmektedir.

A. kaynarcensis D1021^T GI'sının, + 4°C'de aktivite kaybettiği bu nedenle enzim saklama koşullarında önemli bir problemin olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, *A. kaynarcensis* D1021^T GI'sının ileriki çalışmalarda + 4°C'de ısı kararlılığının kesinlikle mutasyonlarla artırılması gerekmektedir. Ayrıca, asidik pH'larda çalışabilecek ve pH kararlılığını arttırmayı sağlamaya yönelik mutasyon çalışmaları yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abel, K., De Schmertzing, H. ve Peterson, J. I., 1963. Classification of Microorganisms by Analysis of Chemical Composition Feasibility of Utilizing Gas Chromatography, J. Bacteriol., 85, 1039-1044.
- Adamian, L. ve Liang, J., 2002. Interhelical Hydrogen Bonds and Spatial Motif in Membrane Proteins: Polar Clamps and Serine Zippers, Proteins, 47, 209-218.
- Adekambi, T., Colson, P. ve Drancourt, M., 2003. *rpoB*-based Identification of Nonpigmented and Late-pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. J. Clin. Microbiol., 41, 5699-5708.
- Adekambi, T. ve Drancourt, M. 2004. Dissection of Phylogenetic Relationships Among 19 Rapidly Growing *Mycobacterium* Species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* Gene Sequencing. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 2095-2105.
- Adekambi, T., Drancourt, M ve Raoult, D., 2008 (a). The *rpoB* Gene as a Ttool for Clinical Microbiologists. Trend in Microbiology, 17, 37-45.
- Adekambi, T., Shinnick, T., Raoult, D ve Drancourt, M., 2008 (b). Complete *rpoB* Gene Sequencing as a Suitable Suoolement to DNA-DNA Hhybridization for Bacterial Species and Genus Delination. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58, 1807-1814.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aguilar, A., 1996. Extremophile Research in the European Union: from Fundamental Aspects to Industrial Expectations, FEMS Microbiol. Rev., 18, 89-92.
- Anon, X., 1979. New Applications Expand HFCS Markets Increase Demand and Tighten Supplies, Food Product Development., 13, 12- 38.
- Anon, X., 1993. Multifunctional Sweeteners, Baking and Snack., 15, 31-34.
- Arahal D. R., Sánchez E., Macián M. C. ve Garay E., 2008. Value of *recN* Sequences For Species Identification and as a Phylogenetic Marker within the Family “Leuconostocaceae”. International microbiology, 11, 33-39.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S. ve Collins, M. D., 1991. Phylogenetic Heterogeneity Of The Genus *Bacillus* Revealed by Comparative Analysis of Small-Subunit-Ribosomal RNA Sequences. Lett. Appl. Microbiol., 13, 201-206.

- Auling, G., Busse, H. J., Egli, T., El-Banna, T. ve Stackebrandt, E., 1993. Description of the Gram-negative, Obligately Aerobic, Nitrilotriacetate (NTA)-Utilizing Bacteria as *Chelatobacter heintzii*, gen. nov., sp. nov., and *Chelatococcus asaccharovorans*, gen. nov., sp. nov. Syst Appl. Microbiol., 16, 104-112.
- Banat, I. B, Marchant, R. ve Rahman, T. J., 2004. *Geobacillus debilis* sp. nov., a Novel Obligately Thermophilic Bacterium Isolated From A Cool Soil Environment, and Reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 2194-2201.
- Bartfay, J., 1960, Glucose Isomerase in Barley Malt, Nature (London), 185- 924.
- Belduz, A.O., Dulger, S. ve Demirbag, Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53, 1315-1320.
- Belduz, A. O., Lee, E. J. ve Harman, J. G., 1993. Mutagenesis of the Cyclic AMP Receptor Protein of *Escherichia coli*: Targeting Positions 72 and 82 of the Cyclic Nucleotid Binding Pocket, Nuc. Acids. Res., 21, 1827-1835.
- Belfaqui, N. ve Pennick, M. J., 2000. A Bifunctional B-Xylosidase-Xylose Isomerase from *Streptomyces* sp. Ec 10., Enzyme and Microbiol Tech., 27, 114-121.
- Benson, H.J., 1985. Microbiological Applications, a Laboratory Manual in General Microbiology, fourth Edition, Wm C. Brown Publishers. Dubuque, Iowa.
- Bhat, M., 2000. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology, Biotechnol. Adv., 18, 355-383.
- Bhosale, S. H., Rao, M. B. ve Deshpande, V. V., 1996. Molecular and Industrial Aspects of Biol. Chem., 28, 510-516.
- Boguslawski, G. ve Rynski, M. J., 1982. Novel Strain of *Bacillus Licheniformis* Useful in Production of Glucose Isomerase and Method of Screening *Bacillus* Mutants for the Ability to Produce Glucose Isomerase in the Absence of Xylose, U.S. Patent, 4,355,103.
- Boyer, S.L., Flechtner, V.R. ve Johansen, J.R., 2001. Is the 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria, Mol. Biol. Evol., 18, 6, 1057- 1069.
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Bram, R.J., Young, R.A. ve Steitz, J.A., 1980. The Ribonucleic III Site Flanking 23S Sequences in the 30S Ribosomal Precursor RNA of *Escherichia coli*, Cell, 19, 393 401.

- Brock, T. D. ve Freeze, H., 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile, J. Bacteriol., 98, 289–297.
- Brown, S. H., Sjøholm, C. ve Kelly R. M., 1993. Purification and Characterization of a Highly Thermostable Glucose Isomerase Produced by the Extremely Thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima*., Biotechnol. Bioeng., 41, 878–886.
- Bruijn, F. J., Rademaker, J., Schneider, M., Rossbachl, U. ve Louws, F. J., 1996. Biology of Plant-Microbe Interaction, Volume 1, Stacey, G., Mullin, B.ve Gresshoff, P., Eds., PS Pres, 497 s.
- Burg, B.V.D., 2003. Extremophiles as a Source for Novel Enzymes, Current Opinion in Microbiology, 6, 213-218.
- Busse, J. ve Auling, G., 1988. Polyamine Pattern as a Chemotaxonomic Marker within the *Proteobacteria*, Syst. Appl. Microbiol., 11, 1-8.
- Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Vangrysperre, W. ve Debruyne, C. K., 1988. D-Xylose Isomerase from *Streptomyces violaceoruber*: Structural and Catalytic Roles of Bivalent Metal Ions, Enzyme Microb. Technol., 10, 695–700.
- Cappuccino, J.G. ve Sherman, N., 1992. Microbiology: a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York.
- Case, R., Boucher, Y., Dahllof, I., Holmstrom, C., Doolittle, W. F. ve Kjelleberg, S. 2007. Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers For Microbiol Ecology Studies. Applied and Environmental Microbiology, 73, 278-288.
- Cato, E.P., Hash, D.E., Holdeman, L.V. ve Moore, W.E.C., 1982. Electroforetic Study of *Clostridium* Species, J. Clin. Microbiol., 15, 688-702.
- Cavicchioli, R., 2002. Extremophiles and the Search for Extraterrestrial Life, Astrobiology, 2, 281-292.
- Chauthaiwale, J. V. ve Rao, M. B., 1994. Production and Purification of Extracellular Xylose Isomerase from an Alkaliphilic, Thermophilic *Bacillus* sp., Appl. Environ. Microbiol., 60, 4495–4499.
- Chen, W. P., Anderson, A. W. ve Han, Y. W., 1979. Production of Glucose Isomerase by *Streptomyces Flavogriseus*, Appl. Environ. Microbiol., 37, 324–331.
- Chien, A., Edgar, D. ve Trela, J., 1976. Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophilic *Thermus aquaticus*, J. Bacteriol., 127, 1550–1557.
- Cho, J. C. ve Tiedje, J. M., 2001. Bacterial Species Determination from DNA-DNA Hybridization by Using Genome Fragments and DNA Microarrays, Appl. Env. Microbiol., 67, 3677-3682.

- Colacino, F. ve Crichton, R.R., 1997. Enzyme Thermostabilization: The State of the Art, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 14, 211-277.
- Collyer, C. A. ve Blow, D. M., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 1362-1366.
- Condon, C., Squires, C. ve Squires, C.L., 1995. Control of rRNA Transcription in *Escherichia coli*, Microbiol. Rev., 59, 623-645.
- Conrads, G., Citron, D.M., Tyrell, K.L., Horz, H. ve Goldstein, E.J.C., 2005. 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences for Analysis of the Phylogenetic Relationships Among Species of the Genus *Porphyromonas*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55, 607-613.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T. ve Scanneu, J.W., 2002. Estimating Prokaryotic Diversity and Its Limits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 10494-10499.
- Curtis, T.P. ve Sloan, W.T., 2004. Prokaryotic Diversity and Its Limits: Microbial Community Structure in Nature and Implications for Microbial Ecology. Current Opinion in Microbiology, 7, 221-226.
- Çanakçı, S., 2003, Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Daffonchio, D., Borin, S., Frova, G., Manachini, P.L. ve Sorlini, C., 1998. PCR Fingerprinting of Whole Genomes: The Spacers Between the 16S and 23S rRNA Genes and of Intergenic tRNA Gene Regions Reveal a Different Intraspecific Genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*, Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 107-116.
- Dahllöf, I., Baillie, H. ve Kjelleberg, S., 2000. *rpoB*-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. Appl. Environ. Microbiol., 66, 3376-3380.
- Daniel, R.M. ve Cowan, D.A.C., 2000. Biomolecular Stability and Life at High Temperatures, Cell. Mol. Life Sci., 57, 250-254.
- Danno, G., 1970. Studies on D-Glucose Isomerizing Enzyme From *Bacillus Coagulans*, Strain Hn-68. VI. The Role of Metal Ions on the Isomerization of D-Glucose and DXylose by the Enzyme, Agric. Biol. Chem., 35, 997-1006.
- Das, R. ve Gerstein M., 2000. The Stability of Thermophilic Proteins: A Study Based on Comprehensive Genome Comparison, Funct. Integr. Genomics, 1, 76-88.
- De Ley, J., Cattoir, H. ve Reynaerts, A., 1970. The Quantitative Measurement of DNA Hybridization from Renaturation Rates, Eur. J. Biochem., 12, 133-142.

- Dekker, K., Yamagata, H., Sakaguchi, K. ve Udaka, S., 1991. Xylose (Glucose) Isomerase Gene from the Thermophile *Thermus Thermophilus*: Cloning, Sequencing, and Comparison with Other Thermostable Xylose Isomerases, J. Bacteriol., 173, 3078–3083.
- Delamare, A.P.L., Artico, L.D.O., Grazziotin, F.G., Echeverrigaray, S. ve Costa, S.O.D., 2002. Total Protein Electrophoresis and RAPD Fingerprinting Analysis for the Identification of *Aeromonas* at the Species Level, Braz. J. Microbiol., 33, 4, 358–362.
- Dische, Z. ve Borenfreund, E., 1951. A New Spectrophotometric Method for The Detection and determination of Ketosugars and Trioses, J. Biol. Chem., 192, 583–587.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta A. ve Rousselier, P., 2001. Phylogenetic Analysis of *Klebsiella species* delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen.nov., with Description of *Raoultella ornithinolytica* comb.nov., *Raoultella terrigena* comb.nov and *Raoultella planticola* comb.nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 925–932.
- Drancourt, M. ve Raoult, D. 2002. *rpoB* Gene Sequence-Based Identification of *Staphylococcus* species. Journal of Clinical Microbiology, 40, 1333–1338.
- Drancourt, M., Roux, V., Fournier, P.E. ve Raoult, D., 2004. *rpoB* Gene Sequence-based Identification of Aerobic Gram-positive Cocci of the Genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. Journal of Clinical Microbiology, 42, 497–504.
- Duguet, M., 1995. Nucleic Acids and Molecular Biology, Volume 9, Lilley D. ve Eckstein, F., Eds., Springer Verlag., Berlin, Germany, 84 s.
- Duim, B., Vandamme, P. A. R., Rieger, A., Laevens, S., Dijkstra, J. R., ve Wagenarr, J. A., 2001. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting, Microbiology, 147, 2729–2737.
- Dulger, S., 1997. Ayder Kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Elbanna, K., Lütke-Eversloh, T, Trappen, S., Mergaert, J., Swing, J. ve Steinbüchel, A., 2003. *Schlegella thermodepolymerans* gen. nov. sp. nov., a Novel Thermophilic Bacterium that Degrades Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-merxaptopropionate). Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53, 1165–1168.
- Eriksson, L. ve Heitmann, J., 1998. Proceedings of the Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Volume 3, Montreal.
- Erlich, H., Gelfand, D. ve Saiki, R., 1988. Specific DNA Amplification Product Review, Nature, 33, 461–462.

- Fang, X.W., Golden, B.L., Littrell, K., Shelton, V., Thiagarajan, P., Pan, T. ve Sosnick, T.R., 2001. The Thermodynamic Origin of the Stability of a Thermophilic Ribozyme, PNAS, 98, 8, 4355-4360.
- Farber, G. K., Glasfeld, A., Tiraby, G., Ringe, D. ve Petsko, G. A., 1989. Crystallographic Studies of the Mechanism of Xylose Isomerase, Biochemistry, 28, 7289-7297.
- Ferguson, D.A.J. ve Lambe, D.W.J., 1984. Differentiation of *Compylobacter* species by Protein Banding Patterns in Polyacrylamide Slab Gels, Journal of Clinical Microbiology, 20, 453-460.
- Finkmann, W., Altendorf, K., Stackebrandt, E ve Lipski, A., 2000. Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov. sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 273-282.
- Forterre, P., Bergerat, A. ve Lopez-Garcia, P., 1996. The Unique Topology and DNA Topoisomerases of Hyperthermophilic Archaea, FEMS Microbiol. Rev., 18, 237-248.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. ve Jurtshuk, P.J.R., 1992. How Close is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient to Guarantee Species Identity, Int. J. Syst. Bacteriol., 42, 1, 166-170.
- Gaikwad, S. M., Rao, M. B. ve Deshpande, V.V., 1992. D-Glucose/Xylose Isomerase from *Streptomyces*. Differential Roles of Magnesium and Cobalt Ions, Enzyme Microb. Technol., 4, 317-320.
- Galtier, N., Tourasse, N. ve Gouy, M., 1999. A Nonhyperthermophilic Common Ancestor to Extant Life Forms. Science, 283, 220-221.
- Garcia-Martinez, J., Acinas, S.G., Anton, A.I. ve Rodriguez-Valera, F., 1999. Use of 16S - 23S Ribosomal Genes Spacer Region in Studies of Prokaryotic Diversity, Journal of Microbiology Methods, 36, 203-209.
- Genersch, E. ve Otten, C., 2003. The Use of Repetitive Element PCR Fingerprinting (rep-PCR) for Genetic Subtyping of German Field Isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae*, Apidologie, 34, 195-206.
- Gey, M. ve Unger, K., 1995. Calculation of the Molecular Masses of Two Newly Synthesized Thermostable Enzymes Isolated from Thermophilic Microorganisms, J. Chromatogr., 166, 188-193.
- Glazunova, O. O., Raoult, D ve Roux, V. 2010. Partial *recN* Gene Sequencing: a New Tool for Identification and Phylogeny within the Genus *Streptococcus*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 2140-2148.

- Gonzalez, J.M. ve Saiz-Jimenez, C., 2002. A Fluorimetric Method for the Estimation of G+C Mol Content in Microorganism by Thermal Denaturation Temperature, Environmental Microbiology, 4, 11, 770-773.
- Gonzalez, J. M., ve Saiz-Jimenez, C., 2005. A Simple Fluorimetric Method for the Estimation of DNA-DNA Relatedness between closely Related Microorganisms by Thermal Denaturation Temperatures, Extremophiles, 9, 75-79.
- Goodfellow, M. ve O'Donnell, A.G., 1993. Root of Bacterial Systematics. Handbook of New Bacterial Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., Eds., Academic Press Ltd., London.
- Goto, K. Omura, T., Yukihiro, H. ve Sadaie, Y., 2000. Application of the Partial 16S rDNA Sequences as an Index for Rapid Identification Of Species in The Genus *Bacillus*. J. Gen. Appl. Microbiol., 46, 1-8.
- Goto, K., Kato, Y., Asahara, M ve Yokota, A. 2002 (a). Evaluation of The Hypervariable Region in the 16S rDNA sequence as an index for rapid species identification in the genus *Paenibacillus*. J. Gen. Appl. Microbiol., 48, 281-285.
- Goto, K., Mochida, K., Asahara, M., Suzuki, M. ve Yokota, A. 2002 (b). Application of the Hypervariable Region of the 16S rDNA Sequence as an index for the Rapid identification of species in the genus *Alicyclobacillus*. J. Gen. Appl. Microbiol. 48, 243-250.
- Goto, K., Fujita, R., Kato, Y., Asahara, M. ve Yokota, A., 2004. Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (=NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 419-427.
- Goto, K., Tanimoto, Y., Tamura, T., Mochida, K., Arai, D., Asahara, M., Suzuki, M., Tanaka, H. ve Inagaki, K., 2002 (c). Identification of Thermoacidophilic Bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species Isolated from Acidic Environments in Japan. Extremophiles, 6, 333-340.
- Gray, M.W., Sankoff, D. ve Cedergren, R.J., 1984. On the Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A Global Phylogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA, Nuc. Acids Res., 12, 5837-5852.
- Greene, A.C., Patel, B.K.C., Sheehy, ve A. J., 1997. *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Manganese- and Iron-reducing Bacterium Isolated from a Petroleum Reservoir, Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 505-509.

- Grimont, F. ve Grimont, P.A.D., 1991. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, Stackebrandt, E. ve Goodfellow, M., Eds., John Wiley and Sons Ltd., West, Sussex.
- Gupta, M., 1995. Thermostability of Enzymes, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Gurtler, V., ve Stanisich, V.A., 1996. New Approaches to Typing and Identification of Bacteria Using the 16S-23S rDNA spacer, Microbiology, 142, 3-16.
- Hafner, E. W., 1985. Constitutive Mutant of a Thermostable Glucose Isomerase, U.S. Patent 4, 551, 430.
- Hafner, E. W. ve Jackson, D. M., 1985. Constitutive Glucose Isomerase Producer, U.S. Patent 4, 532, 208.
- Haki, G.D. ve Rakshit, S.K., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: a Review, Bioresource Technology, 89, 17-34.
- Haney, P., Konisky, J., Koretke, K.K., Luthey-Schulten, Z. ve Wolynes, P.G., 1997. Structural Basis for Thermostability and Identification of Potential Active Site Residues for Adenylate Kinases from the Archaeal Genus *Methanococcus*, Proteins, 28, 1, 117-30.
- Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R. ve Olsen, G., 1999. Thermal Adaptation Analyzed by Comparison of Protein Sequences from Mesophilic and Extremely Thermophilic *Methanococcus* species, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 3578-3583.
- Harvey, S., Hill, C.W., Squire, C. ve Squires, C.L., 1988. Loss of the Spacer Loop Sequence from the *rrnB* operon in the *Escherichia coli* K12 Subline that Bears the *relAI* mutation, J. Bacteriol., 170, 1235-1238.
- Hebeda, R.E., 1987. Corn Sweeteners. In: Watson, S.A. and Ramstad, P.E. (eds) "Corn Chemistry and Technology", AACC, Inc. St. Paul, MN., 501-534.
- Hess, J.M., Tchernajenko, V., Vieille, C., Zeikus, J.G. ve Kelly, R.M., 1998. *Thermotoga neapolitana* Homotetrameric Xylose Isomerase is Expressed as a Catalytically Active and Thermostable Dimer in *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol., 64, 2357-2360.
- Howling, D., 1992. Glucose Syrup: Production, Properties and Applications. In: Schenck, F.W. and R.E. Hebeda (Eds), "Starch Hydrolysis Products", VCH Publ. Inc. New York, 277-316.
- Hughenoltz, P. ve Pace, N.R., 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment : a molecular phylogenetic approach. TIBTECH., 14, 190-197.

- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L. ve Pace, N. R., 1998. Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring, J. Bacteriol., 180, 366–376.
- Inyang, C.U., Gebhart, U., Obi, S.K.C. ve Bisswanger, H., 1995, Isolation and Characterization of a D-Glucose/Xylose Isomerase from a New Thermophilic Strain *Streptomyces* sp. (Plc), Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, 632-638.
- Iuzuka, H., Ayukawa, Y., Suekane, S. ve Kano, M., 1971. Production of Extracellular Glucose Isomerase by *Streptomyces*, U.S. Patent, 3, 622, 463.
- İnan, K., 2005. Türkiye'nin Çeşitli Kaplıcalarından *Anoxybacillus* Türlerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Jaenicke, R. ve Bohm, G., 1998. The Stability of Proteins in Extreme Environments, Curr. Opin. Struct. Biol., 8, 738-748.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. ve Kersters, K., 1996. Evaluation of the DNA Fingerprinting Method AFLP as A New Tool n Bacterial Taxonomy, Microbiology, 142, 1881-1893.
- Jenkins, J., Janin, J., Rey, F., Chiadmi, M., Van Tilbeurgh, H., Lasters, I., DeMaeyer, M., VanBelle, D., Wodak, S. J., Lauwereys, M., Stanssens, P., Mrabet, N. T., Snauwaert, J., Matthyssens, G. ve Lambeir, G. A., 1992, Protein Engineering of Xylose (Glucose) Isomerase from *Actinoplanes missouriensis*, 1. Crystallography and Site Directed Mutagenesis of Metal Binding Sites, Biochemistry, 31, 5449-5458.
- Jensen, M.A., Webster, J.A. ve Strauss, N., 1993. Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms, Appl. Env. Microbiol., 59, 945-952.
- Johnson, J.M., Harris, C.H. ve Barbeau, W.E., 1989. Effects of HFCS Replacement for Sucrose on Browning, Starch Gelatinization and Sensory Characteristics of Cakes., Cereal Chem., 66, 3, 155 - 157.
- Johnson, J.L., 1985. Methods in Microbiology, Volume 18, Academic Press, Inc. Ltd., London.
- Jones, D. ve Krieg, N.R., 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1, Krieg, N. R. ve Holt, J. G., Eds., The Williams ve Wilkins Co., Baltimore, 15 s.
- Joo, G.J., Shin, J.H.; Heo, G.Y.; Kwak, Y.Y.; Choi, J.H.; Rhee, I.K., 2001. Purification and characterization of a thermostable xylose (glucose) isomerase from *Streptomyces chibaensis* J-59, Agric. Chem. Biotechnol. 44, 113-118.
- Karaoğlu, H., 2010. *Anoxybacillus gonensis* Glukoz İzomerazının Genetik Manipulasyonlarla bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Kasumi, T., Hayashi, K. ve Tsumura, N., 1982. Role of Cobalt in Stabilizing the Molecular Structure of Glucose Isomerase from *Streptomyces griseofuscus* S-41, Agric. Biol.Chem., 46, 21–30.
- Kataoka, M., Ueda, K., Kudo, T., Seki, T., ve Yoshida, T. 1997. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*, FEMS Microbiol. Lett. 151, 249-255.
- Kawai, Y., Konishi, H., Horitsu, H., Sakurai, H., Takamizawa, K., Suzuki, T. ve Kawai, K., 1994. Purification and Characterization of D-Xylose Isomerase from *Bifidobacterium adolescentis*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 691-694.
- Kerstens, K. ve De Ley J., 1975. Identification and Grouping of Bacteria by Numerical Analysis of Their Electrophoretic Protein Patterns, Journal of General Microbiology, 87, 333-342.
- Kerstens, K., Pot, B., Dewettinck, D., Torck, U., Vancanneyt, M., Vauterin, L., ve Vandamme, P., 1994. Bacterial Diversity and Systematics, Priest, F. G., Ramos-Cormenzana, A., ve Tyndall, B., Eds., Plenum Press, New York, 51 s.
- Khamis, A., Khamis, A., Colson, P., Raoult, D. ve La Scola, B., 2003. Usefulness of *rpoB* Gene Sequencing for Identification of *Afpia* and *Bosea* species, including a Strategy for Choosing Discriminative Partial Sequences. Appl. Environ. Microbiol., 69, 6740–6749.
- Khire, J.M. Lachke, A.H. Srinivasan, M.C. ve Vartak, H.G., 1990. Characterization of the Purified Extracellular D-xylose Isomerase Devoid of D-glucose Isomerase from *Chainia* sp. Appl. Biochem. Biotechnol., 23, 41-52.
- Kim, K. S., Ko, K. S., Chang, M. W., Hahn, T. W., Hong, S. K. ve Kook, Yoon. H. 2003. Use of *rpoB* sequences for phylogenetic study of Mycoplasma species. FEMS Microbiology Letters, 226, 299-305.
- Ko, K. S., Lee, H. K., park, M. Y., Yun, Y. J., Woo, S. Y., Miyamoto, H. ve Kook, Y. H. 2002. Application of RNA Polymerase β -subunit Gene (*rpoB*) Sequences for the Molecular Differentiation of *Leigonella* species, Journal of Clinical Microbiology, 40, 2653-2658.
- Kohilu, U., Nigam, P., Singh, D. ve Chaudhary, K., 2001. Thermostable, Alkaliphilic and Cellulase Free Xylanases Production by *Thermoactinomyces thalophilus* Subgroup C., Enzyme Microb. Technol., 28, 606–610.
- Korczak, B., Christensen, H., Emler, S., Frey, J. ve Kuhnert, P., 2004. Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 1393-1399.
- Korczak, B. M., Stieber, R., Emler, S., Burnens, A. P., Fery, J. ve Kuhnert, P., 2006. Genetic relatedness within the genus *Campylobacter* inferred from *rpoB* sequences, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 937-945.

- Kulp, K., Lorenz, J.K. ve Stone, M., 1991. Functionality of Carbohydrate Ingredients in Bakery Products. *Food Technology*, 45, 3, 136, 138-140, 142.
- Kumar, H.D. ve Swati, S., 2001. Modern Concepts of Microbiology, Second Revised, Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Kumar, S., Tsai, C. ve Nussinov, R., 2000. Factors Enhancing Protein Thermostability, *Protein Engineering*, 13, 3, 179-191.
- Kuhnert, P. ve Korczak, Bozena, M. 2006. Prediction of Whole-genome DNA*DNA Similarity, Determination of G+C Content and Phylogenetic Analysis within *Pasteurellaceae* by Multilocus Sequence Analysis (MLSA). *Microbiology*, 152, 2537-2548.
- Kwon, H.J. Kitada, M. Horikoshi, K., 1987. Purification and Properties of the D-xylose Isomerase from Alkalophilic *Bacillus* No. KX-6. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1983-1989.
- Laemli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of the Head of the Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- La Scola, B., Gundi, V. A. K. B., Khamis, A. ve Raoult D. 2006. Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 44, 827–832.
- Lee, C., Bhatnagar, L., Meng, M. ve Zeikus, J. G., 1989. Catalytic Mechanism of Xylose (Glucose) Isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*. *The journal of Biological Chemistry*, 265, 19082-19090.
- Lee, K.Y., Wahl, R. ve Barbu, E., 1956. Contenu en Bases Purique et Pyrimidiques des Acides Deoxyribonucleiques des Bacteries, *Ann. Inst. Pasteur*, 91, 212-224.
- Lee, Y.-E., Matur, V. R. ve Zeikus, J. G., 1993. Cloning, Sequencing and Biochemical Characterization of Xylose Isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* Strain B6A-RI, *J. Gen. Microbiol.*, 139, 1227–1234.
- Lilburn, T.G. ve Garrity, G.M., 2004. Exploring Prokaryotic Taxonomy, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 7-13.
- Lin, J.J., Kuo, J. ve Ma, J., 1996. A PCR-Based DNA Fingerprinting Technique: AFLP for Molecular Typing of Bacteria, *Nucleic Acids Research*, 24, 3649-3650.
- Lopez-Garcia, P., 1999. DNA Supercoiling and Temperature Adaptation: A Clue to Early Diversification of Life?, *J. Mol. Evol.*, 49, 4, 439-452.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. ve Schleifer, K.-H., 1998. Bacterial Phylogeny Based on Comparative Sequence Analysis, *Electrophoresis*, 19, 554-568.

- Lui, S. Y., Wiegel, J. ve Gherardine, F. C., 1996, purification and Cloning of a thermosable Xylose (Glucose) Isomerase from *thermus thermophilus* through Random PCR Mutagenesis. Gene Cloning and Protein Characterization, Eur. J. Biochem., 269, 157-163.
- Maidak, B.L., Olsen, G.J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M.J. ve Woese, C.R., 1996. The RDP (Ribosomal Database Project), Nucleic Acids Res., 24, 82-85.
- Mandel, M. ve Marmur, J., 1968. Use of Ultraviolet Light Temperature Profile for Determination of the Guanine plus Cytosine Content of DNA, Enzymol., 12, 195- 206.
- Marguet, E. ve Forterre, P., 1994. DNA Stability at Temperature Typical for Hyperthermophiles, Nuc. Acid. Res., 22, 1681-1686.
- Marmur, J., 1961. A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms, J. Mol. Biol., 3, 208-218.
- Marmur, J. ve Doty, P., 1962. Determination of the Base Composition of deoxyribonucleic Acid from its Thermal Denaturation Temperature, J. Mol. Biol., 5, 109-118.
- Marteinsson, V.T, Hauksdottir. S., Hobel, C.F.V., Kristmannsdottir, H., Hreggvidsson, G.O.ve Kristjansson, J.K., 2001. Phylogenetic Diversity Analysis of Subterranean Hot Springs in Iceland, Appl. Env. Microbiol., 67, 9, 4242-4248.
- Maslow, J. N., Mulligan, M. E. ve Arbeit, R. D., 1993. Molecular Epidemiology: Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms, Clin. Infect. Dis., 17, 153–164.
- Meadeu, P. G., J. Aduse-Opoku, J., Reizer, A., Reizer, Y. A., Lanceman, M. F. Martin ve Mitchell, W. J., 1994, The Xylose Isomerase-Encoding Gene (xylA) of *Clostridium thermosaccharolyticum*: Cloning, Sequencing and Phylogeny of XylA. Enzymes Gene 141, 97–101.
- Meintains, C., Chalkou, K.I., Kormas, K.A., Lymperopoulou, D.S, Katsifas, E.A., Hatzinikolaou, D.G. ve Karagouni, A.D., 2008. Application of *rpoB* Sequence Similarity Analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the Differentiation of species within the genus *Geobacillus*. Letters in Applied Microbiology. 46, 395-401.
- Mellmann, A., Becker, K., Eiff, C., Keckevoet, U., Schumann, P. ve Harmsen, D., 2006. Sequencing and *Staphylococci* identification. Emerg. Infect. Dis., 12, 333–336.
- Migula, W., 1990. System der Bakterien, vol. 2. Jena: gustav Fisher (in German)
- Minana-Galbis, D., Pinzon, D. L., Loren, J. G., Manresa, A. ve Oliart-Ros, R.M., 2010. Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. Nov. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 1600-4.

- Miquel, P., 1888, Monographie d'un Bacille Vvant Au-Dela de 70°C, Ann Micrographic, 1, 3.
- Mollet, C., Drancourt, M. ve Raoult, D., 2000. *rpoB* Sequence Analysis as a Novel Basis for Bacterial Identification. Molecular Microbiology, 26, 1005-1011.
- Mora, D., Ricci, G., Guglielmetti, S., Daffonchio, D. ve Fortina, M.G., 2003. 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region Sequence Variation in *Streptococcus thermophilus* and elated Dairy streptococci ve Development of a Multiplex ITS-SSCP Analysis for Their Identification, Microbiology, 149, 807-813.
- Morse, R., Collins, M. D., Ohanlon, K., Wallbanks, S. ve Richardson, P. T., 1996. Analysis of the β' subunit of DNA-Dpendent RNA polymerase does not support the hypothesis inferred from 16S rRNA analysis that *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) is a tachyelic (fast-evolving) bacterium, Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 1004-1009.
- Mosca, A., Summanen, P., Finegold, S.M., Michele de G. ve Miragliotta, G., 1998. Cellular Fatty Acid Composition, Soluble-Protein Profile, and Antimicrobial Resistance of *Eubacterium lentum*, Journal of Clinical Microbiology, 36, 3, 752-755.
- Mota, F. F., Gomes, E. A., Paiva, E, Rosado, A. S ve Seld,n, L. 2004. Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene, Letters in Applied Microbiology, 39, 34-40.
- Mozhaev, V., 1993. Mechanism-based Strategies for Protein Thermostabilization, Trends Biotechnol., 11, 88-95.
- Nabors, L. O. ve Gelardi, C. R., 1991, Alternative Sweeteners, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., 110, 36.
- Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E. V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A. E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., OSipov, G. A., Belyaev, S. S. ve Ivanov, M. V. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 433-446.
- Nguimbi, E., Li, Y., Gao, B., Li, Z., Wang, B., Wu, Z., Yan, B., Qu, Y. ve Gao, P., 2003. 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer Regions in Cellulolytic *Myxobacteria* ve Differentiation of Closely Related Strain, System. Appl. Microbiol., 26, 262-268.
- Olive, D.M. ve Bean, P., 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organism, Journal of Clinical Microbiology, 37, 1661-1669.

- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R. ve Stahl, D.A., 1986. Microbial Ecology and Evolution: a Ribosomal RNA Approach, Ann. Rev. Microbiol., 40, 337-365.
- Olsen, G.J.; Woese, C.R.; Overbeek, R.C. 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology, J. Bacteriol., 176, 1-6.
- Outtrup, H., 1974. New Glucose Isomerase By Fermentation, German Patent Application, 2, 400, 323.
- Palleroni, N. J., 1993. Structure of Bacterial Genome, Handbook of New Bacterial Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., Eds., Academic Press Ltd, London.
- Pedersen, K., 2000. Exploration of Deep Intraterrestrial Microbial Life: Current Perspectives, FEMS Microbiol. Lett., 185, 9–16.
- Perez, G., Cardell, E. Ve Zarate, V. 2000. Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. Lait, 80, 589-600.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. ve Laurinavichius, K., 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a Novel Anaerobic, Alkaliphilic, Moderately Thermophilic Bacterium from Manure, and Description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. Nov., Int. J.Syst. Evol. Microbiol., 50, 2109-2117.
- Pikuta, E., Cleland, D. ve Tang J., 2003. Aerobic Growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1^T: Emended Descriptions of *A. pushchinoensis* and the Genus *Anoxybacillus*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53, 1561-1562.
- Pomeranz, Y., 1985. Functional Properties of Foods, Academic Press Inc., Orlando, Florida, 536.
- Poonam, N. ve Dalel, S., 1995. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing, Enzyme Microb. Technol., 17, 770–778.
- Pot, B., Vandamme, P. ve Kersters, K., 1994. Modern Microbial Methods, Chemical Methods in Prokaryotic Systematics, Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., Eds., John Wiley ve Sons Ltd., Chichester, England, 493 s.
- Pubols, M. H., Zahnley, J. C. ve Axelrod, B., 1963. Partial Purification and Properties of Xylose And Ribose Isomerase in Higher Plants, Plant Physiol., 38, 457–461.
- Querol, E., Perez-Pons, J.A. ve Mozo-Villarians, A., 1996. Analysis of Protein Conformational Characteristics Related to Thermostability, Protein Eng., 9, 265-271.

- Rademaker, J.L.W., Hoste B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. ve Bruijn, F.L., 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR Genomic Fingerprinting with DNA-DNA Homology Studies: *Xanthomonas* as a Model System, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 665-677.
- Rainey, F. A., Fritze, D. ve Stackebrandt, E., 1994. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. FEMS Microbiology Letters, 115, 205-212.
- Rangarajan, M. ve Hartley, B.S., 1992. Mechanism of D-Fructose Isomerization by *Arthrobacter* D-Xylose Isomerase, Biochem. J., 283, 223-233.
- Rao, M., Tankasale, A., Ghatge, M. ve Desphande, V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 597-634.
- Register, K.B., Boisvert, A. ve Ackermann, M.R., 1997. Use of Ribotyping to Distinguish *Bordetella bronchiseptica* Isolates, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 47, 678-683.
- Rinia, H. A., Boots, J. W., Kik, R. A., Snel, M. M. E., Demel, R. A., Killian, J. A., van der Eerden, J.P.J.M. ve Kruijff, B., 2002. Domain Formation in Phosphatidylcholine bilayers Containing Transmembrane Peptides: Specific Effects of Flanking Residues, Biochemistry, 41, 2814-2824.
- Ronimus, R.S., Parker, L.E. ve Morg, H.W., 1997. Utilization of RADP-PCR for Identifying Thermophilic and Mesophilic *Bacillus* species, FEMS Microbiology Letter, 147, 75-79.
- Rose, I. A., O'connell, E. L. ve Mortlock, R. P., 1969. Stereochemical Evidence for a Cis-Enediol Intermediate In Mn-Dependent Aldose Isomerases, Biochim. Biophys. Acta, 178, 376.
- Rossello-Mora, R. ve Aman, R., 2001. The Species Concept for Prokaryotes, FEMS Microbiology Reviews, 25, 39-67.
- Rowland, G. C., Aboshkiwa, M. ve Coleman, G. 1993. Comparative sequence analysis and predicted phylogeny of the DNA-dependent polymerase beta subunits of *Staphylococcus aureus* and other eubacteria. Trans. Biochem. Soc. 21, 40S.
- Russell, R., Ferguson, J., Hough, D., Danson, M. ve Taylor, G.L., 1997. The Crystal Structure of Citrate Synthase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* at .9 Å Resolution, Biochemistry, 36, 9983-9994.
- Russell, R., Gerike, U., Danson, M., Hough, D. ve Taylor, G.L., 1998. Structural Adaptations of the Cold-Active Citrate Synthase from an Antarctic Bacterium, Structure, 6, 351-361.

- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffe, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. ve Erlich, H., 1988. Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with Thermostable DNA Polymerase, Science, 239, 487–491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Volume 2, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanchez, S. ve Smiley, K. L., 1975. Properties of D-Xylose Isomerase from *Streptomyces albus*, Appl. Microbiol., 29, 745-50.
- Sarıgül, N., Ege Bölgesi'ndeki Çeşitli Sıcak Su Kaynaklarından *Termus* Genusu Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu ve β -galaktosidaz Aktivitesinin Saptanması, 2007. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. ve Engel, P.C., 1998. Protein Thermostability in Extremophiles, Biochimie., 80, 933-941.
- Schinsky, M. F., Morey, R. E., Steigerwalt, A. G., Douglas, M. P., Wilson, R. W., Floyd, M. M., Butler, W. R., Daneshvar, M. I., ve Brown-Elliott, B. A. 2004. Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 1653–1667.
- Schleifer, K. H. ve Kandler, O., 1972. Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and Their Taxonomic Implications, Bacteriol. Rev., 36, 143-187.
- Sneath, A.P., 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Sneath, A.P., Mair, N.S., Sharpe, M.S., Holt, J.G., Eds., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Senes, A., Gerstein, M. ve Engelman, D.M., 2000. Statistical Analysis of Amino Acid Patterns in Transmembrane Helices: The Gxxxg Motif Occurs Frequently and in Association with Beta-Branched Residues at Neighboring Positions, J. Mol. Biol., 296, 921-936.
- Shida, Y. K., Takagi, H., Kadowaki, K., Komagata, K. 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriology, 46, 939-946.
- Shieh, K. K., 1977. Media Containing, 293-337.
- Sly, L.I. 1998. Australian Microbial Resources, Microbiol. Australia, 19, 27-35.
- Smith, C. A., Rangarajan, M. ve Hartley, B. S., 1991, D-Xylose (D-Glucose) Isomerase from *Arthrobacter* Strain Nrrl B3728, Biochem. J., 277, 255–261.

- Song, J., Lee, S.C., Kang, J.W., Baek, H.J. ve Suh, J.W., 2004. Phylogenetic Analysis of *Streptomyces* spp. Isolated from Potato Scab in Korea on the Basis of 16S rRNA Gene and rDNA Internally Transcribed Spacer Sequences, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 203-209.
- Sow, N.M., Dauphin, R.D., Roblain, D., Guiro, A.T. ve Thonart, P., 2005. Polyphasic Identification of A New Thermotolerant Species of Lactic Acid Bacteria Isolated from Chicken Faeces, African Journal of Biotechnology, 4, 409-421.
- Srinivasan, M. C., Vartak, H. G., Powar, V. K. ve Khire, J. M., 1983, High Activity Extracellular Glucose/(Xylose) Isomerase from a *Chainia* Species, Biotechnol. Lett., 5, 611–614.
- Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Masson, D.G., Ward, A.C., Goodfellow, M. and Bull, A.T., 2003. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. Applied and Environmental Microbiology, 69, 6189-6200.
- Stackebrandt, E., Wilhelm, F., Garrity, G. M., Grimont, P.A.D., Kampfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A. C., Whitman, W. B. 2002. Report of the ad hoc committee for the Re-Evaluation of the Species Definition in Bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 1043-1047.
- Staley, J. T. 2006. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. Phil. Trans. R. Soc. B. 361, 1899-1909.
- Stinear, T. P., Seemann, T., Pidot, S., Frigui, W., Reyssset, G., Garnier, T., Meurice, G., Simon, D., Bouchier, C. 2007. Reductive Evolution and Niche Adaptation Inferred from the Genome of *Mycobacterium ulcerans*, the Causative Agent of *Buruli ulcer*. Genome Res., 17, 192–200.
- Suekane, M., Tamura, M. ve Tomimura, C., 1978. Physicochemical and Enzymatic Properties of Purified Glucose Isomerase from *Streptomyces olivochromogenes* and *Bacillus stearothermophilus*, Agric. Biol. Chem., 42, 909–917.
- Summit, M., Peacock, A., Ringelberg, D., White, D.C. ve Baross, J.A., 2000. Phospholipid Fatty Acid-Derived Microbial Biomass And Community Dynamics In Hot, Hydrothermally Influenced Sediments from Middle Valley, Juan De Fuca Ridge. In Zierenberg, R.A., Fouquet, Y., Miller, D.J., Normark, W.R. (Eds.), Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results, 169, 1-19.
- Suzuki, K., Goodfellow, M. ve O'Donnell, A.G., 1993. Cell Envelopes and Classification, Handbook of New Bacterial Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A.G., Eds., Academic Press Ltd., London.
- Taillardat-Bisch, A., Raoult, D. Ve Drancourt, M. 2003. RNA polymerase β -subunit-based phylogeny of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp. and *Wolbachia pipientis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53, 455-458.

- Takami, H., Inoue, A., Fuji, F. ve Horikoshi, K., 1997. Microbial Flora in The Deepest Sea Mud of The Mariana Trench, FEMS Microbiol. Lett., 152, 279–285.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596–1599.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, ve D.G. Higgins. 1997. The ClustalX Windows interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. Nucleic. Acids. Res. 25, 4876-4882.
- Thompson, M.J ve Eisenberg, D., 1999. Transproteomic Evidence of a Loop-Deletion Mechanism for Enhancing Protein Thermostability, J. Mol. Biol., 290, 595-604.
- Tolner, B., Poolman, B. ve Konings, W.N., 1997. Adaptation of Microorganisms and Their Transport Systems to High Temperatures, Comp. Biochem. Physiol., 118, 3, 423-428.
- Tonjum, T., Welty, D.B., Jantzen, E. ve Small, P.L., 1998. Differentiation of *Mycobacterium ulcerans*, *M. marinum*, ve *M. haemophilum*: Mapping of Their Relationships to *M. tuberculosis* by Fatty Acid Analysis, DNA-DNA Hybridization, and 16S rRNA ene Sequence Analysis, Journal of Clinical Microbiology, 36, 918-925.
- Torsvik, V., Daae, F.L. ve Goksoyr, J., 1995. Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications, Trevors, J.T. ve Elsas, J.D., Eds., Springer Verlag Berlin, Germany, 29 s.
- Tourova, T. P., Korshunova, A. V., Mikhailova, E.M., Sokolova, D.S., Poltarau, A.B. ve Nazina ve T.N., 2010. Application of *gyrB* and *parE* Sequence Similarity Analyses for Dissemination of species within the Genus *Geobacillus*. Microbiology, 79, 356-369.
- Trent, D.J., 2000. Extremophiles in Astrobiology: Per Ardua ad Astra, Gravitational and Space Biology Bulletin, 13, 2, 5-11.
- Tsai, C. J. ve Nussinov, R., 1997. Hydrophobic Folding Units at Protein-Protein Interfaces: Implications to Protein Folding and to Protein-Protein Association, Protein Science, 6, 7, 1426-1437.
- Tunlid, A. 1999. Molecular biology: a Linkage Between Microbial Ecology, General Ecology and Organismal Biology. Oikos, 85, 177-189.
- Tyrrell, G.J., Bethune, R.N., Willey, B. ve Low, D.E., 1997. Species Identification of *Enterococci* via Intergenic Ribosomal PCR, Journal of Clinical Microbiology, 35, 5, 1054-1060.
- Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, H., Leemhuis, H. ve Dijkhuizen, L., 2002. Properties and Applications of Starchconverting Enzymes of the α -amylase Family, J. Biotechnol., 94, 137–155.

- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P. ve Swings, J., 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics, Microbiol. Rev., 60, 407-438.
- VanTilbeurgh H., Jenkins J., Chiadmi M., Janin J., Wodak S.-J., Mrabet N.T. ve Lambeir, A., 1992, M. Biochemistry, 31, 5467-5471.
- Vartak, H. G., Srinivasan, M. C., Powar, V. K., Rele, M. V. ve Khire, J. M., 1984, Characterisation of Extracellular Substrate Specific Glucose and Xylose Isomerases of *Chainia*, Biotechnol. Lett., 6, 493-494.
- Vauterin, L., Rademaker, J. ve Swings, J., 2000. Synopsis on the Taxonomy of the Genus *Xanthomonas*, Phytopathology, 90, 677-682.
- Versalovic, J., Koeuth, T. ve Lupski, J.R., 1991. Distribution of Repetitive DNA Sequences in Eubacteria and Application to Fingerprinting of Bacterial Genoms, Nucl. Acids. Res., 19, 6833-6831.
- Vieille, C., Burdette, D.S. and Zeikus, J.G., 1996. Thermozyms, Biotechnol. Ann. Rev., 2, 1-83.
- Vikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. ve Linko, M., 1994. Xylanases in Bleaching: from an Idea to the Industry, FEMS Microbiol. Rev., 13, 335-350.
- Vila, J., Marcos, M.A. ve Jimenez A.M.T., 1996. A Comparative Study Different PCR-Based DNA Fingerprinting Techniques for Typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex, J. Med. Microbiology, 44, 482-489.
- Vogt, G., Woell, S ve Argos, P., 1997. Protein Thermal Stability, Hydrogen Bonds, and Ion Pairs, J. Mol. Biol., 269, 631-643.
- Vongsuvanlert, V. ve Tani, Y., 1988. Purification and Characterization of Xylose Isomerase of a Methanol Yeast, *Candida Boidinii*, Which is Involved in Sorbitol Production from Glucose, Agric. Biol. Chem., 52, 1817-1824.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van L.T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemen, J., Muiper, M. ve Zabeau, M., 1995. AFLP: A New Concept for DNA Fingerprinting, Nucleic Acids Res., 21, 4407-4414.
- Waltenbury, D.R., Leduc, L.G. ve Ferroni, G.D., 2005. The Use of RAPD Genomic Fingerprinting to Study Relatedness in Strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Journal of Microbiology Methods, 62, 103-112.
- Wang, P. Y., Johnson, B. F. ve Schneider, H., 1980. Fermentation of D-Xylose by Yeasts Using Glucose Isomerase in the Medium to Convert D-Xylose to D-Xylulose, Biotechnol. Lett., 2, 273-278.

- Ward, D.M., Ferris, M.J., Nold, S.C. and Bateson, M.M. 1998. A natural view of Microbial Biodiversity within hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1353-1370.
- Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M. 1990. 16S rRNA Sequences Reveal Numerous Uncultured Microorganisms in a Natural Community. Nature (London), 345, 63-65.
- Watanabe, K., Oshima, T. ve Nishimura, S., 1976. CD Spectra of 5-methyl-2-thiouridine intRNA-met-F from an Extreme Thermophile, Nuc. Acids. Res., 3, 1703-1713.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimon, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebract, E., Starr, M.P. ve Trüper, H.G., 1987. Report of The *ad hoc* Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics, Int. J. Syst. Bacteriol., 37, 463-464.
- Weber, P., Fructose by Isomerisation of Glucose, 1976, U.K. Patent 1, 496, 309.
- Welsh, J. ve McClelland, M., 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers, Nucleic Acids Research, 18, 7213-7218.
- Weng, F. Y., Chiou, C. S., Lin, P. H. P. ve Yang, S. S., 2009. Application of *recA* and *rpoB* Sequence Analysis on Phylogeny and Molecular Identification of *Geobacillus*. Journal of Applied Microbiology, 107, 452-464.
- Wharton, D.A., 2002. Life at the Limits: Organisms in Extreme Environments, Port Chester, N.Y., Cambridge University Press, USA, 157 s.
- Whitlow, M., Howard, A. J., Finzel, B. C., Poulos, T.L., Winborne, E. ve Gilliland, G. L., 1991. Proteins, Struct. Funct. Genet., 9, 153-173.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. ve Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: The Unseen Majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 6578-6583.
- Willems, A., Coopman, R. ve Monique G., 2001. Comparison of Sequence Analysis of 16S-23S rDNA Spacer Regions, AFLP Analysis and DNA-DNA Hybridizations in Bradyrhizobium, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 623-632.
- Willems, A., Munive, A., De Lajudie, P. ve Gillis, M., 2003. In Most Bradyrhizobium Groups Sequence Comparison of 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Regions Corroborates DNA-DNA Hybridizations, System. Appl. Microbiol., 26, 203-210.
- Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. ve Tingey, S.V., 1990. DNAPolymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers, Nuc. Acids Res., 18, 6531-6535.
- Woese, C.r. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev., 51, 221-271.

- Wulff, S.M. ve Helgeson, D.L., 1987. Preliminary Economic Feasibility Analysis of HFCS Processing in US with Emphasis on North Dakota, Agricultural Economics Report, No. 229. Dept. Agric. Econ. NDSU, Fargo, ND, 213.
- Yamada, Y., Hoshiona, K. ve Ishikawa, T. 1997. The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S ribosomal RNA: The Elevation of the sungenus *Gluconoacetobacter* to the Genetic level. Biosci. Biotech. Biochem., 61, 1244-1251.
- Yamanaka, K. ve Takahara, N., 1975. Purification and properties of D-xylose isomerase from *Lactobacillus xylosus*, Agric. Biol. Chem., 41, 1909-1915.
- Yip, M. J., Porter, J. L., Fyfe, J. A., Lavender, C. J., Portaels, F., Rhodes, M., Kator, H., Colorni, A., Jenkin, G. A. ve Stinear, T., 2007. Evolution of Mycobacteriumulcerans and other mycolactone-producingmycobacteria from a common *Mycobacterium marinum* progenitor., J Bacteriol., 189, 2021–2029.
- Yoon, J.H, Lee, S.T., Kim, S.B., Goodfellow, M. ve Park, Y.H., 1997, Inter- and Intraspecific Genetic Analysis of the Genus *Saccharomonospora* with 16S to 23S Ribosomal DNA (rDNA) and 23S to 5S rDNA Internally Transcribed Spacer Sequences, Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 661-669.
- Young, M. ve Cole, S.T., 1993., Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics, Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. ve Losick, R., Eds., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Zeigler, D.R., 2003. Gene Sequences Useful for Predicting Relatedness of Whole Genomes in Bacteria, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53, 1893-1900.
- Zeigler, D. R., 2005. Application of a *recN* sequence similarity analyses to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1171-1179.
- Zhou. F.X., Merianos, H.J., Brunger, A.T. ve Engelman, D.M., 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices, Proc. Natl. Acad. Sci., 98, 5, 2250-2255.

8. EKLER

Ek 1. PDF1 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGGATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
CATGATCTTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATT
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGCAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAACCTGGCGTTACAATGACGGTACCT
AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TGTC CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
CTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGANGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTG
CTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGG
GACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 2. PDF2 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGGATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
CATGATCTTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATT
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAACCTGGCGTTACAATGACGGTACCT
AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TGTC CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACGCCAGTGGCGAAGGCGG
CCCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTG
CTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGG
GACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 3. PDF3 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
 CATGATCTTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCTGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAACCTGGCGTTACGATGACGGTACCT
 AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
 GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
 CTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTG
 CTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCAAGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGG
 GACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 4. PDF4 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

TACATGCAAGTCGAGCGAGGGTTTTTCGAACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGG
 CACCTGCCTCTCAGACCGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTTG
 GATCGCATGATCTGAAAAGGAAAGATGGCGTTTGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGG
 ATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAATAAGTACCGTTTCAACAGGGCGGTACCTTGACG
 GTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
 AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGTT
 AAAGCCCCGGGGCTCAACCCCGGTTTCGCATCGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAGGA
 AAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
 GGCGGCTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
 GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGTTTTCAATACCCT
 CAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACT
 CAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCAAGCAACGC
 GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACCGCTCTGGAGACAGAGCTTCCCTTCGG
 GGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAG
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAG
 ACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC
 CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGATGCTACCTCGCGAGAGGACGCC
 AATCTCTTAAACCAATCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGA
 ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
 GCCCGTCACAC

Ek 5. PDF6 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAACGGAGAGCTTGCTCTC
 CTGCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACCGGGATAA
 CTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGGATTTTCAGACCGCATGGTTTGGAATGGAAAG
 ACCCTGTGTCACGCACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGCTGGTGGGGTAACGGCCTA
 CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGAACGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
 CGCCGGGATAACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCC
 AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
 GCAGGCGGCTTCTTAAGTCAGGTGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCACTTGAA
 ACTGGGAGGCTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GAGATGTGGAGGAACACCTGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAACCTGACGCTGAGGCG
 CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
 GCTAGGTGTTGGGGTCTCCAAACCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGG
 GGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCTGACCC
 CTCTAGAGATAGAGGCTTCCTTCGGGACAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC
 TCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCCA
 GCATTTCAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGTGGGGATGAC
 GTCAAATCATCATGCCCTTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAACG
 GGCAGCCAACTCGCGAGAGTGAGCCAATCCCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGC
 TGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA
 TACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACAC

Ek 6. PDF7 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCATCGGAACGTGCCCAGTAGTGGGGGATAGCCC
 GGC AAAAGCCGGATTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGAAAGGCCT
 CGCGCTATTGGAGCGGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGC
 GACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATG
 CCGCGTGCGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTGTTCGGGAAGAAATCCTCTG
 GGCTAATAACCCCGGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGC
 AGGCGGTTGTGCAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGTGAC
 TGCACGGCTGGAGTGCGGCAGAGGGGAGTGGAATTCCGCGTG TAGCAGTGAAATGCGTAGA
 TATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCTCCCTGGGCCTGCACTGACGCTCATGCACG
 AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAAC
 TGGTTGTTGGTCCTTCACTGGATCAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGG
 AGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGA
 TGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCTGGAGCCCTG
 CAGAGATGTGGGGGTGCTCGAAAGAGAGCCAGGACACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTCAGC
 TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTA
 CGAAAGGGCACTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAG
 GTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTACACACGTCATACAATGGCCGGTACAGAGGGCTG
 CCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAGAAAACCGGTCGTAGTCCGGATTGCAGTCTGCAA
 CTCGACTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGTCGCGGTGAATACGT
 TCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACAC

Ek 7. PDF10 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

TACATGCAAGTCGAGCGAGGGTTTTTCGAACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGG
 CAACCTGCCTCTCAGACCGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTT
 GGATCGCATGATCTGAAAAGGAAAGATGGCGTTTGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGC
 GCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
 GGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACCCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
 AATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCG
 GATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAATAAGTACCGTTTGAACAGGGCGGCACCTTGAC
 GGTACCTGACGAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
 CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGT
 TAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTTCGCATCGGAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAGG
 AAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGTTTTCAATACCC
 TCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACG
 CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCTCTGGAGACAGAGCTTCCCTTCG
 GGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCGACCCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGAGA
 GACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
 CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGATGCTACCTCGCGAGAGGACGC
 CAATCTCTTAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG
 AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
 CGCCCGTCACAC

Ek 8. PDF11 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

TACATGCAAGTCGAGCGAGGGTTTTTCGAACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGG
 CAACCTGCCTCTCAGACCGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTT
 GGATCGCATGATCTGAAAAGGAAAGATGGCTTCTGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGC
 GCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
 GGTGACAGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
 AATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCG
 GATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAATAAGTACCGTTTGAACAGGGCGGTACCTTGAC
 GGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
 CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGT
 TAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTTCGCATCGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAGG
 AAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGCGGCTTTCTGGTCCGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGCGGAGCAAACAGGATTA
 GATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGTGTTGGGGGTTTCATACCCTCAG
 TGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACTCAA
 AGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCACGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAA
 GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCTCTGGAGACAGAGCTTCCCTTCGGGGC
 AGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAGAGAGACT
 GCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
 GGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGATGCTACCTCGCGAGAGGACGCCAAT
 CTCTTAAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATC
 GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTCACAC

Ek 9. PDF13 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTT
 CGGCGGTACAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAA
 CTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAA
 GACCTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
 GAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAA
 CCGCCAGGATGACCTCCTGGTCTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
 CGCAGGCGGCTTCTTAAGTCAGGTGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCACTTGA
 AACTGGGAAGCTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
 AGAGATGTGGAGGAACACCCGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACGCTGAGGC
 GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGAG
 TGCTAGGTGTTGGGGACTCCAATCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTG
 GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA
 GCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCTGACC
 CTCCTAGAGATAGGAGCTCTCTTCGGAGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCC
 AGCATTGTTGGTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGTGGGGATGA
 CGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAC
 GGGCAGCCAACTCGCGAGAGTGCGCGAATCCCTTAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGG
 CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA
 ATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACAC

Ek 10. PDF15 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTGCG
 CATGATCTTTGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCGCTACAGGATGGGCCCCGCGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAAGTAACGGCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTGCT
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAAGTGGCGTTACGATGACGGTACCT
 AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
 GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
 CTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
 CTTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTG
 CTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGG
 GACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 11. PDF16 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
CATGATCTTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCTGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAAGTGGCGTTACGATGACGGTACCT
AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
CTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTG
CTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACTCAAGG
GAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGG
GACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 12. PDF17 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

TACATGCAAGTCGAGCGGATCTGTTTGAAGCTTGCTTCAGACAGGTTAGCGGCGGACGGGT
GAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCCGTAAGACCGGGATAACGTAGGGGAACTTACGCTAATA
CCGGATAGGGCACCTTCTCGCATGAGAGGGTGCGGAAAGGTGGCGCAAGCTACCACTTGCG
GATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGT
AGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAC
GATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACAAGTACCGTTTCGAACAG
GGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCG
GGTAAGTCTGATGTCAAAGCCCCGGGGCTCAACCCCCGGTACGCATTGGAACTGCTCGACTT
GGGTGCAGAAGAGGAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGCG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGG
GGGTTTCAATACCCTCAGTGCCGCGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCT
CGCAAGAGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCCCTAGAGAT
AGGGCTTCCCTTCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTCGGTT
GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCAT
CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTACAACGGGACGCAAGC
CCGCGAGGGTAAGCCAATCTCTTAAACCAGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGC
CTGCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC

Ek 13. PDF18 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGGATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAACACGAAAGACCG
 CATGGTCTTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCTGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGCAGTCACTGGCGGTACCTTGACGGTACCT
 AACGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGGAATTATTGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGG
 AATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
 TCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
 CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTGC
 TGTAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGG
 AATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAA
 CCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTTCCTCCTTCGGGGGA
 CAGGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 14. PDF19 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

TACATGCAAGTCGAGCGAGGGTTTTTCGGACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGG
 CAACCTACCTCTCAGACCGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTT
 GGGTCGCATGATCCGAAAAGGAAAGATGGCGTTTGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGC
 GCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
 GGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
 AATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCG
 GATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAATAAGTACCGTTGCAACAGGGCGGTACCTTGAC
 GGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
 CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGT
 TAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTTCGCATCGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAGG
 AAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGTTTCAATACCC
 TCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCTCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACG
 CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCTCTGGAGACAGAGCTTCCCTTCG
 GGGCAGCGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGA
 GACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCCTCATGCCCTTATGA
 CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGATGCTACCTCGCGAGAGGACGC
 CAATCTCTTAAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG
 AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTGCACAC
 CGCCCGTCACAC

Ek 15. PDF20 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GGGGACAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTCGGTTCGGAATAACTC
 AGGGAACTTGAGCTAATACCGGATACGTCCGAGAGGAGAAAGATTTATCGCCGAAGGATC
 GGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCT
 GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
 AGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATG
 AAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTCCGGGACGATAATGACGGTACCGGAAGAATAA
 GCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAA
 TCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGACGTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCA
 ACCTCGGAATTGCCTTTGATACTGGATGTCTCGAGACCGGAAGAGGTAAGTGGAAGTGC
 GTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGT
 CCGGTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTTGGTAGT
 CCACGCCGTAAACGATGGATGCTAGCCGTTGGGCAGCTTGCTGTTTCAAGTGGCGCAGCTAAC
 GCTTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGG
 GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGC
 CTTGACATGTCGCGTATGGATGCCAGAGATGGCTTCCTTCAGTTCGGCTGGCGCGAACAC
 AGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG
 CGCAACCCTCGCCCTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTTTAGGGGGACTGCCGGTGAT
 AAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACAC
 ACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGCAGCGAAAGGGCGACCTGGAGCTAATCCCCAAAA
 GCCGTCTCAGTTCAGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAAT
 CGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACAC

Ek 16. PDF21 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAACACGAAAGACCG
 CATGGTTTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCTG
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGCAGTCACTGGCGGTACCTTGACGGTACCT
 AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CACAGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
 GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
 CTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGGGCAAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTCTAGTG
 CTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGG
 GACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 17. PDF22 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

TACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGCAGG
 CAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTT
 GGATCGCATGATTTCGAAAAGAGAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGG
 CGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
 GGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
 GAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTC
 GGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAAACACGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGA
 CGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
 GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTG
 TTAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTTCGCATCGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAG
 GAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGTTTCAATACCC
 TCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGA
 GTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA
 AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCTCTGGAGACAGAGCTT
 CCCTTCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACT
 CTAGAGAGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCC
 CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGATGCTACCTCGCGAG
 AGGACGCCAATCTCTTAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATG
 AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
 TACACACCGCCCGTCACAC

Ek 18. PDF24 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAATGAAGAGCTTGCTCTT
 CGGCGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACTGGGATAA
 CTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTCAGACCGCATGGTCTGAAAGGGAAA
 GACTTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCT
 ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
 GAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAA
 CCGCCGGGATGACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
 CGCAGGCGGCTTCTTAAGTCAGGTGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCACTTGA
 AACTGGGAAGCTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
 AGAGATGTGGAGGAACACCCGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACGCTGAGGC
 GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGAG
 TGCTAGGTGTTGGGGACTCCAATCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTG
 GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA
 GCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCTGACC
 CTCCTAGAGATAGGAGCTCTCTTCGGAGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCC
 AGCATTTAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGTGGGGATGA
 CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAC
 GGGCAGCCAACTCGCGAGAGTGCGCGAATCCCTTAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGG
 CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA
 ATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACAC

Ek 19. PDF27 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

TACATGCAAGTCTTCGGACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTC
 TCAGACTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGA
 TCCGAAAAGAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAG
 TTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCC
 ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCACA
 ATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGT
 TCTGTTGTTAGGGACGAATAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACG
 AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
 CGGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGTTAAAGCCCGG
 GGCTCAACCCCGGTTTCGCATCGGAAAACGTGTAGCTTGAGTGCAGAAAGAGGAAAGCGGT
 ATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGCAAAGGCGGC
 TTTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGAGGAGCAAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGTTTCAATACCCTCAGTG
 CCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCTCTGGAGACAGAGCTTCCCTTCGGGGCAG
 CGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGC
 CGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
 CTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGATGCTACCTCGTGAGAGGACGCCAATCT
 CTTAAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGC
 TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
 TCACAC

Ek 20. PDF28 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

TACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCAGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGG
 CAACCTGCCTCTCAGACCGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTT
 GGATCGCATGATCTGAAAAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGG
 CGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
 GGGTGACCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
 GAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTC
 GGATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGACGAACACGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGA
 CGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
 GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTG
 TTAAAGCCCGGGGCTCGACCCCGGTTTCGCATCGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAG
 GAAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
 AAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGCGGAGCAAACAGGAT
 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGTTTCAATACC
 CTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAA
 CTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAAC
 GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCTCTGGAGACAGAGCTTCCCTTC
 GGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGTCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA
 AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGAG
 AGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG
 ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGATGCTACCTCGTGAGAGGACG
 CCAATCTCTTAAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCG
 GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
 CCGCCCGTCACAC

Ek 21. PDF29 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

TACATGCAAGTCGAGCGAGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGG
 CAACCTGCCCCGTAAGCTCGGGATAACATGGGGAACTCATGCTAATACCGGATAGGGTCTT
 CTCTCGCATGAGAGGAGACGGAAAGGTGGCGCAAGCTACCACTTACGGATGGGCCTGCGGC
 GCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
 GGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
 AATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCG
 GATTGTAAAGTTCTGTTGTCAGAGACGAACAAGCACCGTTTGAACAGGGCGGTACCTTGAC
 GGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
 CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGT
 TAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTTTCGCATCGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAGG
 AAAGCGGTATTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGCGGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGTGTGGGGGTTTCATACCCTCAGT
 GCCGCAGCTAACGCATAAGCACTCGCTGGGNGTACGCTCGCAGAGTGAACCTCAAAGGAATT
 GACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTT
 ACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGTCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGCGGTG
 ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTCG
 ACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACA
 CACGTGCTACAATGGCTGGTACAACGGGAAGCTAGCTCGCGAGAGTATGCCAATCTCTTAA
 AACCAGTCTCAGTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA
 ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
 C

Ek 22. PDF31 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CCGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAACACATCGGAATCTACTCCGTCGTGGGGGATAACGT
 AGGGAAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTAAAGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCT
 CACGCGATGGAATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGC
 GACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG
 CCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGGAAGAAATCCTGCT
 GGCTAATACCCGGCGGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGT
 AGGTGGTGGCTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATAC
 TGGGTCACTAGAGTGTGGTAGAGGGTGGCGGAATTCCCGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGA
 GATCGGGAGGAACACCCGTGGCGAAGGCAGCCACCTGGGCCAACACTGACACTGAGGCACG
 AAAGCGTGGGGAGCAAACAAGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAAC
 TGGATGTTGGGTTCAATTTGGGACTCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGG
 GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
 TATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCGCGGAACCTG
 CCCAGAGATGGGCGGGTGCCCTTCGGGAGCCGCGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC
 TCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCCA
 GCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
 ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTACTACAATGGTGGGGACAG
 AGGGCTGCGAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAGAAACCCCATCTCAGTCCGGATTGGAG
 TCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGT
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC

Ek 23. PDF32 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCAACGGAGAGCTTGCTCTC
 CTGCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTACGACCGGGATAA
 CTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGGATTTTCAGACCGCATGGTTTGGAATGGAAAG
 ACCCTGTGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTA
 CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGAACGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
 CGCCGGGATAACCTCCCGGTCTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCC
 AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
 GCAGGCGGCTTCTTAAGTCAGGTGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCACTTGAA
 ACTGGGAGGCTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GAGATGTGGAGGAACACCTGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGCCTGTAACGTACGCTGAGGCG
 CGAAAGCGTGGGGAACGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
 GCTAGGTGTTGGGGTCTCCAAACCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGG
 GGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGTG
 CATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCTGACCC
 CTCTAGAGATAGAGGCTTCCTTCGGGACAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC
 TCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCCA
 GCATTTCAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGTGGGGATGAC
 GTCAAATCATCATGCCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAACG
 GGCAGCCAACTCGCGAGAGTGAGCCAATCCCTTAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGC
 TGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA
 TACGTTCCCGGGTCTTGTACACAC

Ek 24. PDF38 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
 CATGATCTTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCTGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAAGTGGCGTTACGATGACGGTACCT
 AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
 GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
 CTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTG
 CTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAGTCAAAG
 GAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGG
 GACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 25. TF1 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACCAAATCGGAGCTTGCTCTGATTTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAA
 GACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCCCTTTGGCTGTCACCTTGC GGATGGGCCCCGCGGC
 GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAG
 GGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
 AATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCG
 GGTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTGCAAGAGGGGCGGCGCGGTGAC
 GGTACCTCACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGG
 CGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGT
 GAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAG
 GAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
 AAGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTACACCC
 TTTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAA
 CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAAC
 GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCT
 TCGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG
 GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTCTAGTTGCCAGCACGAAGGTGGGCACTCT
 AGAGGGACTGCCGGCGACAAGTCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT
 TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGG
 GGAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAA
 GCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACACCGCCCGTCACA

Ek 26. TF2 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GTGCCTAAGACATGCAAGTCGAGCGGGGCAGGTTTATACCTGTTTCAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAACGCGTGGGTGACCTACCCGGAAGAGGCGGACAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATCCG
 CCATGTGGTCCTGTCCTGTGGGGCAGGACTAAAGGGTGGATAGCCCGCTTCCGGATGGGCC
 CGCGTCCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGTC
 TGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCACTGAGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCA
 GTTAGGAATCTTCCGCAATGGACGGAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGC
 CCTTCGGGGTGTAAACTCCTGAACTGGGGACGAAAGCCCCGTGTAGGGGGATGACGGTACC
 CAGGTAATAGCGCCGGCCAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGCGCGAGCGT
 TACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGGC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGAGCGTGGGATACGCTCAGGCTAGAGGGTGGGAGAGGGTGGTG
 GAATTCCCGGAGTAGCGGTGAAATGCGCAGATACCGGGAGGAACGCCGATGGCGAAGGCAG
 CCACCTGGTCCACTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACCGGATTAGATAC
 CCGGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGCGCTAGGTCTCTGGGTTTATCTGGGGCCGAAGC
 CAACGCGTTAAGCGCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGA
 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
 CAGGCCTTGACATGCTGGGGAACCTAGGTGAAAGCCTGGGGTGCCCGTGAGGGAGCCCTAG
 CACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCCTGCCCTTAGTTGCCAGCGGGTTGGGCCGGGCACTCTAAGGGGACTGCCT
 GCGAAAGCAGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCTGGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCGA
 CACACGTGCTACAATGCCCACTACAGAGCGAGGCGACCCAGTGATGGGGAGCGAATCGCAA
 AAAGGTGGGCGTAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCCGGAATCGCTAG
 TAATCGCGGATCAGCCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
 AC

Ek 27. TF3 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GTGCCTAAGACATGCAAGTCGAGCGGGGCAGGTTTATACCTGTTTCAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAACGCGTGGGTGACCTACCCGGAAGAGGCGGACAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATCCG
 CCATGTGGTCCTGTCCTGTGGGGCAGGACTAAAGGGTGGATAGCCCGCTTCCGGATGGGCC
 CGCGTCCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGTC
 TGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCACTGAGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCA
 GTTAGGAATCTTCCGCAATGGACGGAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGC
 CCTTCGGGGTGTAAACTCCTGAACTGGGGACGAAAGCCCCGTGTAGGGGGATGACGGTACC
 CAGGTAATAGCGCCGGCCAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGCGCGAGCGT
 TACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGGC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGAGCGTGGGATACGCTCAGGCTAGAGGGTGGGAGAGGGTGGTG
 GAATTCCCGGAGTAGCGGTGAAATGCGCAGATACCGGGAGGAACGCCGATGGCGAAGGCAG
 CCACCTGGTCCACTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACCGGATTAGATAC
 CCGGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGCGCTAGGTCTCTGGGTTTATCTGGGGCCGAAGC
 CAACGCGTTAAGCGCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGA
 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
 CAGGCCTTGACATGCTGGGGAACCTAGGTGAAAGCCTGGGGTGCCCGTGAGGGAGCCCTAG
 CACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCCTGCCCTTAGTTGCCAGCGGGTTGGGCCGGGCACTCTAAGGGGACTGCCT
 GCGAAAGCAGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCTGGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCGA
 CACACGTGCTACAATGCCCACTACAGAGCGAGGCGACCCAGTGATGGGGAGCGAATCGCAA
 AAAGGTGGGCGTAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCCGGAATCGCTAG
 TAATCGCGGATCAGCCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTC
 AC

Ek 28. TF5 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GTGCCTAAGACATGCAAGTCGAGCGGGGCAGGTTTATACCTGTTTCAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAACGCGTGGGTGACCTACCCGGAAGAGGCGGACAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATCCG
 CCATGTGGTCCTGTCCTGTGGGGCAGGACTAAAGGGTGGATAGCCCGCTTCCGGATGGGCC
 CGCGTCCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGTC
 TGAGAGGACGGCCGGCCACAGGGGCACTGAGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCA
 GTTAGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGC
 CCTTCGGGGTGTAAACTCCTGAACTGGGGACGAAAGCCCCGTGTAGGGGGATGACGGTACC
 CAGGTAATAGCGCCGGCCAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGCGCGAGCGT
 TACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGGC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGAGCGTGGGATACGCTCAGGCTAGAGGGTGGGAGAGGGTGGTG
 GAATTCCCGGAGTAGCGGTGAAATGCGCAGATACCGGGAGGAACGCCGATGGCGAAGGCAG
 CCACCTGGTCCACTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACCGGATTAGATAC
 CCGGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGCGCTAGGTCTCTGGGTTTTCTGGGGGCCGAAAC
 TAACGCGTTAAGCGCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGA
 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
 CAGGCCTTGACATGCTGGGGAACCTGGGTGAAAGCCTGGGGTGCCCGTGAGGGAGCCCTAG
 CACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCCTGCCCTTAGTTGCCAGCGGGTTGGGCCGGGCACTCTAAGGGGACTGCCT
 GCGAAAGCAGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCTGGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGTGA
 CACACGTGCTACAATGCCCACTACAGAGCGAGGCGACCTGGCAACAGGGAGCGAATCGCAA
 AAAGGTGGGCGTAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCCGGAATCGCTAG
 TAATCGCGGATCAGCCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
 AC

Ek 29. TF6 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GTGCCTAAGACATGCAAGTCGAGCGGGGCAGGTTTATACCTGTTTCAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAACGCGTGGGTGACCTACCCGGAAGAGGCGGACAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATCCG
 CCATGTGGTCCTGTCCTGTGGGGCAGGACTAAAGGGTGGATAGCCCGCTTCCGGATGGGCC
 CGCGTCCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGTC
 TGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCACTGAGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCA
 GTTAGGAATCTTCCGCAATGGACGGAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGC
 CCTTCGGGGTGTAAACTCCTGAACTGGGGACGAAAGCCCCGTGTAGGGGGATGACGGTACC
 CAGGTAATAGCGCCGGCCAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGCGCGAGCGT
 TACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGGC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGAGCGTGGGATACGCTCAGGCTAGAGGGTGGGAGAGGGTGGTG
 GAATTCCCGGAGTAGCGGTGAAATGCGCAGATACCGGGAGGAACGCCGGTGGCGAAGGCAG
 CCACCTGGTCCACTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACCGGATTAGATAC
 CCGGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGCGCTAGGACTCTGGGTTTATCTGGGGGCCGAAG
 CCAACGCGTTAAGCGCGCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTA
 CCAGGCCTTGACATGCTGGGGAACCTAGGTGAAAGCCTGGGGTGCCCGTGAGGGAGCCCTA
 GCACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCCTGCCCTTAGTTGCCAGCGGGTTGGGCCGGGCACTCTAAGGGGACTGCC
 TCGGAAAGCAGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCTGGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCG
 ACACGCGTGCTACAATGCCCACTACAGAGCGAGGCGACCCAGTGATGGGGAGCGAATCGCA
 AAAAGGTGGGCGTAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCCGGAATCGCTA
 GTAATCGCGGATCAGCCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
 CAC

Ek 30. TF7 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GTGCCTAAGACATGCAAGTCGAGCGGGGCAGGTTTATACCTGTTTCAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAACGCGTGGGTGACCTACCCGGAAGAGGCGGACAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATCCG
 CCATGTGGTCCTGTCCTGTGGGGCAGGACTAAAGGGTGGATAGCCCGCTTCCGGATGGGCC
 CGCGTCCCATCAGCCAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGTC
 TGAGAGGACGGCCGGCCACAGGGGCACTGAGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCA
 GTTAGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGC
 CCTTCGGGGTGTAAACTCCTGAACTGGGGACGAAAGCCCCGTGTAGGGGGATGACGGTACC
 CAGGTAATAGCGCCGGCCAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGCGCGAGCGT
 TACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGGC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGAGCGTGGGATACGCTCAGGCTAGAGGGTGGGAGAGGGTGGTG
 GAATTCCCGGAGTAGCGGTGAAATGCGCAGATACCGGGAGGAACGCCGATGGCGAAGGCAG
 CCACCTGGTCCACTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACCGGATTAGATAC
 CCGGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGCGCTAGGTCTCTGGGTTTTCTGGGGGCCGAAGC
 TAACGCGTTAAGCGCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGA
 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
 CAGGCCTTGACATGCTGGGGAACCTGGGTGAAAGCCTGGGGTGCCCGTGAGGGAGCCCTAG
 CACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCCTGCCCTTAGTTGCCAGCGGGTTGGGCCGGGCACTCTAAGGGGACTGCCT
 GCGAAAGCAGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCTGGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCGA
 CACACGTGCTACAATGCCCACTACAGAGCGAGGCGACCTGGCAACAGGGAGCGAATCGCAA
 AAAGGTGGGCGTAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCCGGAATCGCTAG
 TAATCGCGGATCAGCCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
 AC

Ek 31. TF11 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACCGGATTGGGGCTTGCCTTGATTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCCGAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAA
 GACCGCATGGTCTTTCGGTTGAAAGGCGGCCTTTGGGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCCGCGG
 CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGA
 GGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
 GAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTC
 GGGTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTTGAAGAGGGCGGCGCGGTGA
 CGGTACCTCACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGG
 GCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCCTTAAGTCTGATG
 TGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGA
 GGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC
 GAAGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTCACACC
 CTTTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA
 CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCC
 TTCGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG
 GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTCTAGTTGCCAGCACGAAGGTGGGCACTC
 TAGAGGGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
 TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGG
 GGGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATG
 AAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
 TACACACCGCCCCGTCACA

Ek 32. TF12 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACCGGATCGGAGCTTGCTCTGGTTTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAA
 GACCGCATGGTCTTGGGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGG
 GTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGTCGTTTGAAGAGGGCGGCGCGGTGACG
 GTACCTCACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGC
 GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGG
 AGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTCACACCCT
 TTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
 CGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCTT
 CGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTCTAGTTGCCAGCATTTCGGTTGGGCACTCTA
 GAGGGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGG
 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
 CCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
 ACACCGCCCGTCACA

Ek 33. TF13 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACTGAATGGGAGCTTGCTCTTGTTTCGGTCCGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAA
 GACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGG
 GTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGTCGTTTGAAGAGGGCGGCGCGGTGACG
 GTACCTCACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGC
 GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTTCATTGGAAACTGGGGGACTTAAGTGCAGGAGAGG
 AGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTCACACCCT
 TTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTTCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
 CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCTT
 CGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTCTAGTTGCCAGCATTTCGGTTGGGCACTCTA
 GAGGGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGACCTGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGGG
 AGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGC
 CGGAATCGCTAGTGATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
 CACCGCCCGTCACA

Ek 34. TF14 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACCGAATGGGAGCTTGCTCTTGTTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAA
 GACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGG
 GTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTTGAAGAAGGCGGCGCGGTGACG
 GTACCTCACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGC
 GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCCCCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGGGCTTGAGTGCAGGAGAGG
 AGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTACACCCT
 TTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
 CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCTT
 CGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTCTAGTTGCCAGCATCGGGGTGGGCACTCTA
 GAGGGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGG
 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
 CCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACCGCCCCGTCACA

Ek 35. TF15 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGGATTGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAACACGAAAGACCG
 CATGGTCTTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCTGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAACCTGGCGTTACTGTGACGGTACCT
 AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
 GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
 CTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTG
 CTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGG
 GACAGGGGGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 36. TF16 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACCGAATGGGAGCTTGCTCTTGTTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAA
 GACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGG
 GTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTTGAAGAAGGCGGCGCGGTGACG
 GTACCTCACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGC
 GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCCCCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGGCTTGAGTGCAGGAGAGG
 AGAGCGGAATTCCGCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTACACCCT
 TTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
 CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCCC
 TTCGGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTCTAGTTGCCAGCATTGGGGTGGGCACT
 CTAGAGGGGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCC
 CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAG
 GGGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATG
 AAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
 TACACACCGCCCGTCACA

Ek 37. TF17 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACCGAATGGGAGCTTGCTCTTGTTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAA
 GACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGG
 GTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGTCGTTTGAAGAGGGCGGCGCGGTGACG
 GTACCTCACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGC
 GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGGACTTGTGTGCAGGAGAGG
 GGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTCACACCCT
 TTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
 CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCTT
 CGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTCTAGTTGCCAGCATTTCGGTTGGGCACTCTA
 GAGGGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGG
 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
 CCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
 ACACCGCCCGTCACA

Ek 38. TH1 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACCGAACGAGAGCTTGCTCTTGTTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCCGCAAGACCGGGACAACCTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCAAA
 GACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCG
 CGTTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGG
 GTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTTGAATAAGGCGGCGCGGTGACG
 GTACCTCACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGC
 GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGG
 AGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTCACACCCT
 TTAGTGCTGTAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
 CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCTT
 CGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCCCTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTA
 GAGGGACTGCCGGCTAAAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGG
 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
 CCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
 ACACCGCCCGTCACA

Ek 39. TH2 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACCGAACGAGAGCTTGCTCTTGTTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCAAA
 GACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGG
 GTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTTGAATAAGGCGGCGCGGTGACG
 GTACCTCACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGC
 GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGG
 AGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTACACCCT
 TTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
 CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCTCCCTT
 CGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCCTCTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTA
 GAGGGACTGCCGGCTAAAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGG
 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
 CCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATAC
 ACACCGCCCGTCACA

Ek 40. TH4 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGGATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGCCG
 CATGGTCTTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCTGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGCAGTCACTGGCGGTACCTTGACGGTACCT
 AACGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
 GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
 CTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGAGGAGCAAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTG
 CTGTAGCTAACGCATTAAGCCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAA
 GGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTTCCTCCTTCGGGG
 GACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 41. TH5 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
 CATGATGTTCCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
 AAAGCTCCGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAACCTGGCGTTACTGTGACGGTACCT
 AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
 GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
 CTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGAGGAGCAAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTG
 CTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGG
 GACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 42. TH6 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACTGGATTGGAGCTTGCTCTGATTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAA
 GACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGG
 GTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTTGAAGAGGGCGGCGCGGTGACG
 GTACCTCACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGC
 GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGG
 AGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTACACCCT
 TTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
 CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCTT
 CGGGGGGACAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTCTAGTTGCCAGCATTTCGGTTGGGCACTCTA
 GAGGGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGG
 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
 CCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
 ACACCGCCCGTCACA

Ek 43. TH7 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACCGAACGGAAGCTTGCTTCTGTTTCGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
 AACCTGCCCCGTAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACACCGAA
 GACCGCATGATCTTCGGTTGAAAGGTGGCTTTTGTCTACCACTTACGGATGGGCCCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGTCTTCGG
 ATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAGAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACGGTGACG
 GTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGC
 GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGG
 AGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTTTTCCCTT
 TAGTGCTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACT
 CAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGC
 GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCTGGAGACAGGGCGTTCCCCCTTC
 GGGGGGGACAGGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCCTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTA
 GGGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGG
 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
 CCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
 ACACCGCCCGTCACA

Ek 44. DF5 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGGATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
 CATGATCTTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAACCTGGCGTTACAATGACGGTACCT
 AACGAGAAAGCCACGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
 GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
 CTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTG
 CTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAG
 GAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGG
 GATAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 45. DF11 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
 CATGATCTCTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGCAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAACCTGGCGTTACTGTGACGGTACCT
 AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCTTAAGTCTGACGTGAAAGCC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
 GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGC
 TCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
 TGGTAGTCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTGCTGT
 AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAAT
 TGACGGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT
 TACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGGGACA
 GGGTGACAGGAGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 46. DF16 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
 CATGATGTTTTGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCTGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAAGTGGCGTTACGATGACGGTACCT
 AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
 GAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGCT
 CTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
 TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTGCT
 GTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACTCAAAGGA
 ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC
 CTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGGGA
 CAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 47. DF17 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
 CATGATCTTTTCGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
 AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAAGTGGCGTTACTGTGACGGTACCT
 AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
 CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
 GAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
 TCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
 CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTGC
 TGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACTCAAAGG
 AATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
 CCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGGG
 ACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 48. DF20 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGGACTGGATTGGAGCTTGCTCTGATTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAA
 GACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGG
 GTCGTAAAGCTCTGTTGTGAGGGACGAAGGAGCGCCGTTTGAAGAGGGCGGCGCGGTGACG
 GTACCTCACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGC
 GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGG
 AGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTCTCTGGCCTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTCACACCCT
 TTAGTGCTGCAGCTAACGCGATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
 GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCAAGAGATTGGGCGTTCCCCCTTC
 GGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTT
 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTCTAGTTGCCAGCATTTCGGTTGGGCACTCTAGA
 GGGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT
 GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGTGGGGGA
 GCGAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGGAGCC
 GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAAC
 ACCGCCCCGTCACA

Ek 49. D1021 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC
 GAGCGGACGATTCAAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
 GGCAACCTGCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACG
 AAAGGTCGCATGATGTTTTCGTTGAAAGACGGCGCAAGCTGCCGCTACAGGATGGGCCCCGCG
 GCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
 AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
 GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTT
 CGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAAGTGGCGTTACTGTGA
 CGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
 GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGGGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATG
 TGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGA
 GGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC
 GAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
 TTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACC
 CTTTAGTGCTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA
 CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCC
 TTCGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGTCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTG
 GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTC
 TAAGGTGACTGCCGGCTAAAAGTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
 TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGTCGCGAACCCGCGAGG
 GGGAGCCAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGA
 AGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
 ACACACCGCCCGTCACACGGTACCATA

Ek 50. D1041 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

CGATTCAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
CATGATCTTTTNTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCTGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCNGGTCGT
AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAAGTGGCGTTACGATGACGGTACCT
AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCANAAGAGGAGAGCG
GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
CTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGANGCGCGAAAGCGTGAGGAGCAAACAGGGATTAGATA
CCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTNANAGGGTATCCACCCTTTAG
TGCTGTAGCTAACGCATTAANCACTTCNCANTCCGCNTGGGGANTACGCTCGCAAGAGTG
AAACTCAAAGNAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCAAGC
AACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCGAGAGATNGGGCGTTCCC
CCTTCGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTNGTCAGCTCGTGTGAGATGT
TGGGTAAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 51. D1042 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

GATTCAAAGGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
GCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCG
CATGATCTTTTCTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGTCTGCTACAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGT
AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAAGTGGCGTTACAATGACGGTACCT
AACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCG
GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
CTNTCTGGTCTGTAACTGACGNTGAGGCGCGAAAGCGTGAGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTATCCACCCTTTAGTG
CTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGAGATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGG
GACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGT
CCCACAACGAGCGCAACCCTCGACCTTAGTTGCCAGCATTC

Ek 52. PDF4 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

AGGGTTTTTCGAACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGAC
 CGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCTGAA
 AAGGAAAGATGGCGTTTGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTA
 GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTG
 GGA CTGAGACACGGCCCAG

Ek 53. PDF6 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCAACGGAGAGCTTGCTCTCCTGCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAA
 CCTGCCTGTACGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGGATTTT CAGA
 CCGCATGGTTTGGAAATGGAAAGACCCTGTGTACGCACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGC
 TAGCTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACG
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG

Ek 54. PDF10 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

AGGGTTTTTCGAACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGAC
 CGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCTGAA
 AAGGAAAGATGGCGTTTGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
 GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTG
 GGA CTGAGACCCGGCCCAG

Ek 55. PDF11 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

AGGGTTTTTCGAACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGAC
 CGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCTGAA
 AAGGAAAGATGGCTTCTGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
 GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACAGGCCACACTG
 GGA CTGAGACACGGCCCAG

Ek 56. PDF13 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAA
 CCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTCAG
 ACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACCTTTGGTACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAG
 CTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
 GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG

Ek 57. PDF17 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GATCTGTTTGAAGCTTGCTTCAGACAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAA
 CCTGCCCCGTAAGACCGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGGATAGGGCACCTTC
 TCGCATGAGAGGGTGCGGAAAGGTGGCGCAAGCTACCACTTGCGGATGGGCCTGCGGCGCA
 TTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
 GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG

Ek 58. PDF19 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

AGGGTTTTTCGGACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTACCTCTCAGAC
 CGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGGTGCGATGATCCGAA
 AAGGAAAGATGGCGTTTGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
 GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTG
 GGA CTGAGACACGGTCCAG

Ek 59. PDF22 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

AGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGCAGGCAACCTGCCTCTCAGAC
 TGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATGCGATGATTTCGAA
 AAGAGAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
 GGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACT
 GGGACTGAGACACGGCCCAG

Ek 60. PDF24 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCAATGAAGAGCTTGCTCTTCGGCGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAA
 CCTGCCTGTACGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTTCTTTCAG
 ACCGCATGGTCTGAAAGGGAAAGACTTTTGGTCACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAG
 CTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
 GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG

Ek 61. PDF27 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GAGGGTCTTCGGACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGA
 CTGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATGCGATGATCCGA
 AAAGAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
 GGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACT
 GGGACTGAGACACGGCCCAG

Ek 62. PDF28 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

AGTCCCTTCGGGGGCTAGCAGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGAC
 CGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCTGAA
 AAGAAAAGATGGCTTTTCGCTATCACTGGGAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
 GGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCCGCCACACT
 GGGACTGAGACACGGCCCAG

Ek 63. PDF29 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

AGTCCCTTCGGGGGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCCTAAGCT
 CGGGATAACATGGGGAACTCATGCTAATACCGGATAGGCTCTTCTCTCGCATGAGAGGAG
 ACGGAAAGGTGGCGCAAGCTACCACTTACGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
 GGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTG
 GGA CTGAGACACGGCCCAG

Ek 64. PDF32 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCAACGGAGAGCTTGCTCTCCTGCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAA
 CCTGCCTGTACGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGGATTTTCTAGA
 CCGCATGGTTTGGAAATGGAAGACCCCTGTGTACGTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGC
 TAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACG
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG

Ek 65. TF1 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCAAATCGGAGCTTGCTCTGATTTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 CCTGCCCCGAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGA
 CCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCCTTTGGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCGC
 ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGG
 TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG

Ek 66. TF11 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCGGATTGGGGCTTGCCTTGATTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 CCTGCCCCGAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGA
 CCGCATGGTCTTTCGGTTGAAAGGCGGCCTTTGGGCTGTCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG

Ek 67. TF12 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCGGATCGGAGCTTGCTCTGGTTTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 CCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGA
 CCGCATGGTCTTTGGGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCGCA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG

Ek 68. TF13 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACTGAATGGGAGCTTGCTCTTGTTTCGGTCCGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 CCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGA
 CCGCATGGTCTTTGGTGTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCGCA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG

Ek 69. TF14 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCGAATGGGAGCTTGCTCTTGTTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 CCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGA
 CCGCATGGTCTTTGGTGTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCGCA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG

Ek 70. TF16 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCGAATGGGAGCTTGCTCTTGTTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 CCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGA
 CCGCATGGTCTTTGGTGTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCGCA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG

Ek 71. TF17 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCGAATGGGAGCTTGCTCTTGTTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 CCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGA
 CCGCATGGTCTTTGGTGTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCGCA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG

Ek 72. TH1 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCGAACGAGCCTTGCTCTTGTGTTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAAC
 CTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCAAAGAC
 CGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCCTTCGGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCGCA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG

Ek 73. TH2 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCGAACGAGAGCTTGCTCTTGTGTTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 CCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCAAAGA
 CCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCCTTCGGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCGC
 ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGG
 TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG

Ek 74. TH6 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCGAATGGGAGCTTGCTCTTGTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 CCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGA
 CCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCGCA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG

Ek 75. TH7 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCGAACGGAAGCTTGCTTCTGTTCGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
 CCTGCCCCGTAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACACCGAAGA
 CCGCATGATCTTCGGTTGAAAGGTGGCTTTTGCTACCACTTACGGATGGGCCCCGCGGCGCA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG

Ek 76. DF20 16S rRNA HV Bölgesinin Baz sırası

GACCGAATGGGAGCTTGCTCTTGTTCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 CCTGCCCCGCAAGACCGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCGAAGA
 CCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGGCGGCGCAAGCTGCCACTTGCGGATGGGCCCCGCGGCGCA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGT
 GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG

Ek 77. DF20 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TTCATTTGTTGATCGGCGGGCGCGGCTCCGCTGAATTTGTCCGCTTCGGAGCAGAAAAGGC
 GGAAATCGAAGGGCTGTTTTTGCTTGATGATGACCGCCATCCGTGCTGGCAAAAATGCGCG
 GACGTTGGCATCGACGCGAGCGATGGCATGATCGTATTGCGCCGCGATATTTTAGCTAACG
 GAAAAAGCATTTGCCGCATCAATGGCAAGTTGGTCACCACGGCGGTGCTGCGCGACATTGG
 GCGACGCTCGTCGACATTCACGGACAGCATGAACATCAAGAGCTGATGGATCCGTCCCGC
 CACTTGCCGCTTTTAGATGAGTTCTGCGGCCTAGAGGCGGCAGAGGCGCTCGCCCGCTACC
 GCGCCGTTTTATGAGCGGTATGAAGCGCTCGGAAACAAATTGAAAAAGCTGAGCGAAAACGA
 GCAGCAAATGGCGCACCGGCTCGATTTGCTGACGTTTCAGCTGCGCGAAATCGAGCAGGCG
 GCGCTCGAGCCGGGCGAGGACGAGCGGCTGATGGAAGAAAAAGTGCGCATCGTCAATTTCC
 AAAAAATTTATACGGCGCTGCAGAAAAGCTACGAGGCGCTGGCTGGCGATGGGCGCGGGCT
 TGATTCGATCGGGGAGGCGATGCGCCATCTCGACGACGTCGCGGGCATGGACGCAGCGCTC
 AAAGAAGCGCACGAAACAACGGCGAACTGCTATTATTTGCTCGAGGAAGTGATGTACAAGC
 TGCGCGACCAAATCGAGGAGATGGAGTACGATCCGGCGCGGCTTGACGTCATCGAAAGCCG
 CCTCGCGGAAATCGGTCAGCTCAAACGGAATACGGAGCGACGATCGCCGAAGAAATCGAG
 ACGATCGAAAACCGCGAAACGCATGTGCATGAACTGAAGCAACAACCTTGCGGCGGTGGCGG
 ACGAGTTGCTCGCCGAGGCGAAAAACGTCACTGCTGTTGCGCAAACGTACGCCCGGGCTCT
 GATTGAGCGCATTCACCAAGAGTTGAAAGATTTGTACATGGACAAAACGAAATTTGACATC
 ATGTTTGCCAAGCGCGAAGGTCCGCTTGACGCCCCTTTGGTCGACGGCGTGCCGGTCAAGT
 TCCAGGAAGACGGCATCGATGTCGTCGAATTTTACATTTTCGACGAACGTCGGCGAGCCGTT
 AAAACCGCTCGCCAAAGTCGCTTCCGGCGGCGAGCTGTCGCGCATCATGCTGGCGTTGAAA
 ACGATTTTTTTCAAACATCAAGGGGTGACGTCGATTGTTTTTTGATGAGGTGACACAGGCG
 TCAGCGGCCGCGTCGCCCAGGCGATGGCGGAAAAAATTTACCGCATCGCCAGCCAATCGCA
 AGTGCTTTGCATTTCCCA

Ek 78. TF1 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TTCATTTGTTGATCGGCGGACGCGGCTCCGCTGAATTTGTCCGCTTTGGAGCGGAAAAGGC
 GGAAATCGAAGGGCTGTTTTTGCTTGATGATGACCGCCATCCGTGCTGGCAAAAATGCGCA
 GACGTTGGCATCGACGCCAGCGACGGCATGATCGTGTTGCGCCGCGATATTTTCGCCAACG
 GCAAAAGCGTCTGCCGCATTAACGGCAAGCTCGTCACGACGGCGGTGCTGCGCGACATCGG
 GCGACGCTTGTTGATATTCACGGCCAGCATGAACATCAAGAACTGATGGATCCGTCCCGC
 CATCTGCCGCTTTTAGACGAGTTCGGCGGCCTAGAGGCGGCAGAGGCGCTTGCTCGCTACC
 GCGCCGTCTACGAGCGGTATGAGGAGCTCGGAAACAAATTGAAAAAGCTGAGCGAAAATGA
 ACAGCAAATGGCGCACCGGCTTGATTTGCTGACGTTTCAGCTGCGTGAAATCGAGCAGGCG
 GCGCTTGAGCCGGGCGAGGACGAGCGGCTGATGGAGGAAAAAGTTCGCATCGTCAATTTTC
 AAAAAATTTATACCGCGCTGCAGAAAAGCTATGAGGCCCTCTCCGGAGAGGGACGCGGGCT
 TGATTCCATCGGGGAGGCGATGCGCCATCTCGATGACGTCGAGGCATGGATGCAGCGCTC
 AAAGATGCGCATGAAACGACGGCGAACTGCTACTATTTGCTCGAGGAAGTCATGTACAAGC
 TGCGCGATCAAATTGAGGAGATGGAATACGACCCAGAGCGGCTCGATGCCATTGAAAGCCG
 TCTCGCGGAAATCGGGCAGCTCAAACGAAAATACGGGGCGACAATCGCCGATATTTTGCAC
 TATGCCGAGGTGATCGCCGAGGAAATCGAGACAATCGAAAATCGCGAAACGCATGTGCATG
 AGCTTAAGCAGCAGCTCGCTCTGGTGACGGACGAGTTGCTCACGGAGGCGAAAAACGTCAC
 CGCTGTTTCGGCAAACATATGCCCGGCGCCTGATTGAGCGCATTTCATCAAGAACTGAAAGAC
 TTGTACATGGACAAAACGAAATTTGACATCGTATTTGCCAAGCGCGAAGGATCGCTTGACG
 CCCCCTTGGTCGACGGCGTGCCGGTTAGGTTCCAAGAAGACGGCATCGATGTCGTCGAGTT
 TTACATTTTCGACGAACGTCGGCGAGCCGTTAAAACCGCTCGTCAAAGTCGCTTCCGGCGGC
 GAGCTGTCGCGCATTATGCTGGCGTTGAAAACGATTTTTTCCAAACATCAAGGAGTGACGT
 CGATTGTTTTTGTATGAGGTCGACACCGGTGTCAGCGGACGCGTCGCCCAGGCAATGGCGGA
 AAAAAATTTACCGCATCGCCAGCCAGTCGCAAGTGCTTTGCATTTCCCA

Ek 79. TF11 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TTCATTTGCTCATCGGCGGGCGCGGTTTCGTCTGAGTTTCGTCCGTTTCGGCGCTAGAAGGCC
 GAAATCGAAGGGCTGTTTTTGATGATGACGACCGCCATCCATGCTGCCAAAAATGTGCGGG
 ATTGGCGTTGATGTGAGCGATGGGATGGTGGTGCTCCGCCGCGACATTTTGGCGAGCGGCA
 AAAGCATCTGCCGCATCAACGGCAAGCTCGTCACCACCGCCGTGCTGCGCGACATCGGTTTC
 GACGCTCGTCGATATTCACGGTCAGCATGAGCATCAAGAGCTGATGGATCCATCCCGCCAT
 CTGCCGCTTCTCGATGAGTTTGGCGGCGCGGAAACGGCGGGCGGCGCTGGCGCGTTATCGCG
 CTCTGTATGAAGAGCGTGAAGCGTTGGTAAAAAAGTTGAAAAAGCTGAGTGAAAATGAGCA
 GCAAATGGCGCATCGGCTCGATTTGCTGACGTTTCANCTGCGCGAAATCGAACAAGCCGGG
 CTCGAGATTGGCGAAGACGAGCGGCTGATGGAAGAAAAAGTTAGGATTTTGAATTTTCAAA
 AAATTTATCAAGCCATTCAGCATAGCTACGAAGCGCTCGCCGGCGAAGGACGCGGCTTGGA
 TTCGGTCGGCCAGGCGATGGGCCATCTCGAGGACGTCGCCGCGATGGACGCGGAACTTAAA
 GAGGCGCATGAAATGGTGGCCAACAGCTACTATTTGCTCGAGGAAGTCATGTATAGGCTGC
 GCGACCAACTTGAGGAGCTTGAATACGACCCGATGCGGCTTGACGCCATTGAAAGCCGCCT
 CGCGGAAATCCAGCAATTAAAACGGAAGTACGGAGCGACGATCGCCGATATTTTGCAGTAT
 GCCGAAGCGATCGCCGAAGAAATCGAGACGATTGAAAACCGCGACATGCATGTGCACGACC
 TCGAGCGGCAGCTTGCCGACGTGACCGGCAAATTGCTTGCCGAGGCGAAAAAGGTGACCAG
 CATCCGCCAGGCGTACGCCCGGCAGCTGATTGAGCGCATTGAGCAAGAATTGAAAGATTTG
 TACATGGAAAAACGCAGTTTGACATCGTCTTCGCCAAACGCGAAGGCCCGCTCGACGCCC
 CACTGGTCGACGGCGTGCCGGTCAAATTTGCGGAAGACGGCATCGATGTTGTGCAATTTTA
 CCTGTGACGAACGTGCGCGAGCCGCTGAAGCCGCTTGCCAAAACGCTTCAGGCGGCGAG
 CTGTGCGCATTTATGCTCGCATTGAAGACGATTTTTTTCGAAACACCAAGGTGTGACATCAA
 TTATTTTTTGATGAAGTCGACACCGGCGTCAGCGGCCGGGTCGCCCAGGCGATCGCCGAAAA
 AATTTACCGCATCGCCAGCCAGTCGCAAGTGCTTTGCATTTCCCA

Ek 80. TF12 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TTCATTTGTTGATCGGCGGGCGCGGCTCCGCTGAATTTGTCCGCTTTGGAGCAGAAAAGGC
 GGAAATCGAAGGGCTGTTTTTGCTTGATGACGCCCCGCCATCCGTGCTGGCAAAAATGCGCG
 GACGTTGGCATCGACGCCAGCGACGGCATGATCGTGTTGCGCCGCGACATTTTGGCCAACG
 GCAAAAGCGTCTGCCGCATTAACGGCAAGCTCGTCACCACGGCGGTGCTGCGCGACATTGG
 GCGACGCTTGTTGATATTCACGGCCAGCATGAACATCAAGAGCTGATGGATCCATCCCGC
 CATCTGCCGCTTTTAGACGAGTTCGGCGGCCTAGAGGCGGCAGAGGCGCTTGCCCGCTACC
 GCACCGTTTTATGAGCGGTATGAAGCGCTCGGAAACAAATTGAAAAAGCTGAGCGAAAACGA
 GCAGCAAATGGCGCACCGGCTCGATTTGCTGACGTTTCAGCTGCGCGAAATCAAACAGGCG
 GCGCTCGAGCCGGGCGAGGACGAGCGGCTGATGGAAGAAAAGGTGCGCATCGTCAATTTCC
 AAAAAATTTATACGGCGCTGCAGAAAAGCTACGAGGCGCTGGCTGGCGATGGGCGCGGGCT
 TGATTCGATCGGGGAGGCGATGCGCCATCTCGACGACGTCGCGGGCATGGATGCGGCGCTC
 AAAGAAGCGCACGAAACGACGGCGAACTGCTACTATTTGCTCGAGGAAGTGATGTACAAGC
 TGCGCGACCAAATCGAGGAGATGGAGTACGATCCGGCGCGGCTTGACGTCATCGAAAGCCG
 CCTCGCGGAAATCGGTCTGCTCAAACGGAATAACGGAGCGACGATCGCCGATATTTTGCAC
 TATGCCGAGACGATCGCCGAGGAAATCGAGACAATCGAAAATCGTGAAACGCATGTGCATG
 AGCTTAAGCAGCAGCTCGCTCTGGTGACGGACGAGTTGCTTACGGAGGCGAAAAACGTCAC
 CGCTGTTTCGGCAAACATATGCCCGGCGTCTGATTGAGCGCATTTCATCAAGAACTGAAAGAC
 TTATACATGGACAAAACGAAATTTGACATCGTATTTGCCAAGCGCGAAGGTCCGCTTGACG
 CCCCTTTGGTCGACGGCGTGCCGGTCAAGTTCCAGGAAGACGGCATCGATGTCGTCGAATT
 TTACATTTTCGACGAACGTCGGCGAGCCGTTAAAACCGCTCGTCAAAGTCGCTTCCGGCGGC
 GAGCTGTCGCGCATTATGCTGGCGTTGAAAACGATTTTTTCCAAACATCAAGGAGTGACGT
 CGATTGTTTTTGGATGAGGTCGACACCGGCGTCAGCGGACGCGTCGCCCAGGCGATGGCGGA
 AAAAAATTTACCGCATCGCCAGCCAATCGCAAGTGCTTTGCATTTCCCA

Ek 81. TF13 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TTCATTTGTTGATCGGCGGGCGCGGCTCCGCTGAATTTGTCCGCTTCGGAGCAGAAAAGGC
 GGAAATCGAAGGGCTGTTTTTGCTTGATGATGACCGCCATCCGTGCTGGCAAAAATGCGCG
 GACGTTGGCATCGACGCGAGCGATGGCATGATCGTATTGCGCCGCGATATTTTAGCTAACG
 GAAAAAGCATTTGCCGCATCAATGGCAAGTTGGTCACCACGGCGGTGCTGCGCGACATTGG
 GCGACGCTCGTCGACATTCACGGACAGCATGAACATCAAGAGCTGATGGATCCGTCCCGC
 CACTTGCCGCTTTTAGATGAGTTCTGCGGCCTAGAGGCGGCAGAGGCGCTCGCCCGCTACC
 GCGCCGTTTTATGAGCGGTATGAAGCGCTCGGAAACAAATTGAAAAAGCTGAGCGAAAACGA
 GCAGCAAATGGCGCACCGGCTCGATTTGCTGACGTTTCAGCTGCGCGAAATCGAGCAGGCG
 GCGCTCGAGCCGGGCGAGGACGAGCGGCTGATGGAAGAAAAAGTGCGCATCGTCAATTTTC
 CAAAAAATTTATACGGCGCTGCAGAAAAGCTACGANGCGCTGGCTGGCGATGGGCGCGGGC
 TTGATTCGATCGGGGAGGCGATGCGCCATCTCGACGACGTGCGGGGCATGGACGCAGCGCT
 CAAAGAAGCGCACGAAACAACGGCGAACTGCTATTATTTGCTCGAGGAAGTGATGTACAAG
 CTGCGCGACCAAATCGAGGAGATGGAGTACGATCCGGCGCGGCTTGACGTCATCGAAAGCC
 GCCTCGCGGAAATCGGTGAGCTCAAACGGAAATACGGAGCGACGATCGCCGACATTTTGCA
 CTATGCCGAAACGATCGCCGAAGAAATCGAGACGATCGAAAACCGCGAAACGCATGTGCAT
 GAACTGAAGCAACAACCTTGCGGCGGTGACGGACGAGTTGCTCGCCGAGGCGAAAAACGTCA
 CCGCTGTTTCGGCAAACGTACGCCCCGGCGTCTGATTGAGCGCATTACCAAGAGTTGAAAGA
 TTTGTACATGGACAAAACGAAATTTGACATCATGTTTGCCAAGCGCGAAGGTCCGCTTGAC
 GCCCCTTTGGTCGACGGCGTGCCGGTCAAGTTCCAGGAAGACGGCATCGATGTCGTTCGGAT
 TTTACATTTTCGACGAACGTGCGCGAGCCGTTAAAACCGCTCGCCAAAGTCGCTTCCGGCGG
 CGAGCTGTCGCGCATCATGCTGGCGTTGAAAACGATTTTTTCCAAACATCAAGGGGTGACG
 TCGATTGTTTTTGATGAGGTCGACACAGGCGTCAGCGGCCGCGTCGCCAGGCGATGGCGG
 AAAAAATTTACCGCATCGCCAGCCAATCGCAAGTGCTTTGCATTTCCCA

Ek 82. TF14 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TTCATTTGTTGATCGGCGGGCGCGGCTCCGCTGAATTTGTCCGCTTTGGAGCAGAAAAGGC
 GGAAATCGAAGGGCTGTTTTTGCTTGATGACGCCC GCCATCCGTGCTGGCAAAAATGCGCG
 GACGTTGGCATCGACGCGAGCGATGGCATGATCGTATTGCGCCGCGATATTTTAGCTAACG
 GAAAAAGCATTTGCCGCATCAATGGCAAGTTGGTCACCACGGCGGTGCTGCGCGACATTGG
 GCGACGCTCGTCGACATTCACGGACAGCATGAACATCAAGAGCTGATGGATCCGTCCCGC
 CACTTGCCGCTTTTAGATGAGTTCTGCGGCCTAGAGGCGGCAGAGGCGCTCGCCCGCTACC
 GCACCGTTTTATGAGCGGTATGAAGCGCTCGGAAACAAATTGAAAAAGCTGAGCGAAAACGA
 GCAGCAAATGGCGCACCGGCTCGATTTGCTGACGTTTCAGCTGCGCGAAATCGAGCAGGCG
 GCGCTCGAGCCGGGCGAGGACGAGCGGCTGATGGAAGAAAAAGTGCGCATCGTCAATTTCC
 AAAAAATTTATACGGCGCTGCAGAAAAGCTACGAGGCGCTGGCTGGCGATGGGCGCGGGCT
 TGATTCGATCGGGGAGGCGATGCGCCATCTCGACGACGTCGCGGGCATGGACGCAGCGCTC
 AAAGAAGCGCACGAAACAACGGCGAAGTGTATTATTTGCTCGAGGAAGTGATGTACAAGC
 TGCGCGACCAAATCGAGGAGATGGAGTACGATCCGGCGCGGCTTGACGTCATCGAAAGCCG
 CCTCGCGGAAATCGGTCAGCTCAAACGGAATAACGGAGCGACGATCGCCGACATTTTGCAC
 TATGCCGAAACGATCGCCGAAGAAATCGAGACGATCGAAAACCGAGAAACGCATGTGCATG
 AACTGAAGCAACAAC TTGCGGCGGTGACGGACGAGTTGCTCGCCGAGGCGAAAAACGTCAC
 CGCTGTTTCGGCAAACGTACGCCCGGCGTCTGATTGAGCGCATTACCAAGAGTTGAAAGAT
 TTGTACATGGACAAAACGAAATTTGACATCATGTTTGCCAAGCGCGAAGGTCCGCTTGACG
 CCCCTTTGGTCGACGGCGTGCCGGTCAAGTTCCAGGAAGACGGCATCGATGTCGTCGAATT
 TTACATTTTCGACGAACGTGCGCGAGCCGTTAAAACCGCTCGCCAAAGTCGCTTCCGGCGGC
 GAGCTGTCGCGCATCATGCTGGCGTTGAAAACGATTTTTTCCAAACATCAAGGGGTGACGT
 CGATTGTTTTTTGATGAGGTCGACACAGGCGTCAGCGGCCGCGTCGCCCAGGCGATGGCGGA
 AAAAAATTTACCGCATCGCCAGCCAATCGCAAGTGCTTTGCATTTCCA

Ek 83. TF16 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TTCATTTGTTGATCGGCGGGCGCGGCTCCGCTGAATTTGTCCGCTTCGGAGCAGAAAAGGC
 GGAAATCGAAGGGCTGTTTTTGCTTGATGATGACCGCCATCCGTGCTGGCAAAAATGCGCG
 GACGTTGGCATCGACGCGAGCGATGGCATGATCGTATTGCGCCGCGATATTTTAGCTAACG
 GAAAAAGCATTTGCCGCATCAATGGCAAGTTGGTCACCACGGCGGTGCTGCGCGACATTGG
 GCGACGCTCGTCGACATTCACGGACAGCATGAACATCAAGAGCTGATGGATCCGTCCCGC
 CACTTGCCGCTTTTAGATGAATTCTGCGGCCTAGAGGCGGCAGAGGCGCTCGCCCGCTACC
 GCGCCGTTTTATGAGCGGTATGAAGCGCTCGGAAACAAATTGAAAAAGCTGAGCGAAAACGA
 GCAGCAAATGGCGCACCGGCTCGATTTGCTGACGTTTCAGCTGCGCGAAATCGAGCAGGCG
 GCGCTCGAGCCGGGCGAGGACGAGCGGCTGATGGAAGAAAAAGTGCGCATCGTCAATTTCC
 AAAAAATTTATACGGCGCTGCAGAAAAGCTACGAGGCGCTGGCTGGCGATGGGCGCGGGCT
 TGATTCGATCGGGGAGGCGATGCGCCATCTCGACGACGTCGCGGGCATGGACGCAGCGCTC
 AAAGAAGCGCACGAAACAACGGCGAACTGCTATTATTTGCTCGAGGAAGTGATGTACAAGC
 TGCGCGACCAAATCGAGGAGATGGAGTACGATCCGGCGCGGCTTGACGTCATCGAAAGCCG
 CCTCGCGGAAATCGGTCAGCTCAAACGGAATACGGAGCGACGATCGCCGACATTTTGCAC
 TATGCCGAAACGATCGCCGAAGAAATCGAGACGATCGAAAACCGCGAAACGCATGTGCATG
 AACTGAAGCAACAACCTGCGGCGGTGACGGACGAGTTGCTCGCCGAGGCGAAAAACGTCAC
 CGCTGTTTCGGCAAACGTACGCCCGGCGTCTGATTGAGCGCATTACCAAGAGTTGAAAGAT
 TTGTACATGGACAAAACGAAATTTGACATCATGTTTGCCAAGCGCGAAGGTCCGCTTGACG
 CCCCTTTGGTCGACGGCGTGCCGGTCAAGTTCCAGGAAGACGGCATCGATGTCGTCGAATT
 TTACATTTTCGACGAACGTGCGCGAGCCGTTAAAACCGCTCGCCAAAGTCGCTTCCGGCGGC
 GAGCTGTCGCGCATCATGCTGGCGTTGAAAACGATTTTTTCCAAACATCAAGGGGTGACGT
 CGATTGTTTTTGTATGAGGTCGACACAGGCGTCAGCGGCCGCGTCGCCCAGGCGATGGCGGA
 AAAAAATTTACCGCATCGCCAGCCAATCGCAAGTGCTTTGCATTTCCCA

Ek 84. TF17 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TTCATTTGTTGATCGGCGGGCGCGGCTCCGCTGAATTTGTCCGCTTCGGAGCAGAAAAGGC
 GGAAATCGAAGGGCTGTTTTTGCTTGATGATGACCGCCATCCGTGCTGGCAAAAATGCGCG
 GACGTTGGCATCGACGCGAGCGATGGCATGATCGTATTGCGCCGCGATATTTTAGCTAACG
 GAAAAAGCATTTGCCGCATCAATGGCAAGTTGGTCACCACGGCGGTGCTGCGCGACATTGG
 GCGACGCTCGTCGACATTCACGGACAGCATGAACATCAAGAGCTGATGGATCCGTCCCGC
 CACTTGCCGCTTTTAGATGAGTTCTGCGGCCTAGAGGCGGCAGAGGCGCTCGCCCGCTACC
 GCGCCGTTTTATGAGCGGTATGAAGCGCTCGGAAACAAATTGAAAAAGCTGAGCGAAAACGA
 GCAGCAAATGGCGCACCGGCTCGATTTGCTGACGTTTCAGCTGCGCGAAATCGAGCAGGCG
 GCGCTCGAGCCGGGCGAGGACGAGCGGCTGATGGAAGAAAAAGTGCGCATCGTCAATTTCC
 AAAAAATTTATACGGCGCTGCAGAAAAGCTACGAGGCGCTGGCTGGCGATGGGCGCGGGCT
 TGATTCGATCGGGGTGGCGATGCGCCATCTCGACGACGTCGCGGGCATGGACGCAGCGCTC
 AAAGAAGCGCACGAAACAACGGCGAACTGCTATTATTTGCTCGAGGAAGTGATGAACAAGC
 TGCGCGACCAAATCGAGGAGATGGAGTACGATCCGGCGCGGCTTGACGTCATCGAAAGCCG
 CCTCGCGGAAATCGGTCAGCTCAAACGGAATAACGGAGCGACGATCGCCGACATTTTGCAC
 TATGCCGAAACGATCGCCGAAGAAATCGAGACGATCGAAAACCGCGAAACGCATGTGCATG
 AACTGAAGCAACAACCTGCGGCGGTGACGGACGAGTTGCTCGCCGAGGCGAAAAACGTCAC
 CGCTGTTTCGGCAAACGTACGCCCGGCGTCTGATTGAGCGCATTACCAAGAGTTGAAGGAT
 TTGTACATGGACAAAACGAAATTTGACATCATGTTTGCCAAGCGCGAAGGTCCGCTTGACG
 CCCCTTTGGTCGACGGCGTGCCGGTCAAGTTCCAGGAAGACGGCATCGATGTCGTCGAATT
 TTACATTTTCGACGAACGTGCGCGAGCCGTTAAAACCGCTCGCCAAAGTCGCTTCCGGCGGC
 GAGCTGTCGCGCATCATGCTGGCGTTGAAAACGATTTTTTCCAAACATCAAGGGGTGACGT
 CGATTGTTTTTGTATGAGGTCGACACAGGCGTCAGCGGCCGCGTCGCCCAGGCGATGGCGGA
 AAAAAATTTACCGCATCGCCAGCCAATCGCAAGTGCTTTGCATTTCCCA

Ek 85. TH1 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TTCATCTATTGATCGGCGGGCGCGGTTCCGCCGAATTTGTCCGTTTCGGCGCGGAAAAGGC
 AGAAATCGAAGGGCTGTTTTTGCTTGATGATGACCGCTACCCATGTTGCCAAAAGTGCGCT
 GAGGTCGGCATCGATGTGAGCGAAGGAATGGTCGTTTTGCGCCGCGACATTTTGGCTAACG
 GCAAAGCGTCTGCCGCATTAACGGCAAGCTGGTGACAACCGCCATATTGCGGGAAGTTGG
 AGCGACGCTTGTCGATATTCACGGTCAGCATGAACATCAAGAGCTGATGGATCCATCGCGT
 CATTTACCGTTTCTTGATGAATTCGGCGGTGCGGAGATGGCGGAGGCGCTCGCACGCTACC
 GCGCTGTCTATGAACAGCATGAAGCGTTGGTGAAAAAATTAAAAAAGCTGAGTGAAAATGA
 ACAGCAAATGGCGCATCGACTTGATTTATTGACATTTTACGCTGCGCGAAATCGAACAGGCC
 AACTCGAGCTCGGAGAAGACGAACGGCTGATGAAAGAAAAAGTGCGCATTGTCAACTTTC
 AAAAGATATACAGTGCCATCCAAAAAAGCTATGAAGCGCTCTCCGGTGAAGGACGCGGCCT
 TGATTCGATCGGGGAAGCGATGGGCCACCTCGATGATGTCGCCGCGATGGATGCTGCGCTG
 AAGGAGGCGTACGAAACAGTTGCCAACAGCTACTACTTGCTTGAAGAAGTGATGTACAAGC
 TCGCGGACCAGCTCGAGGAGCTTGAGTATGACCCAGCGCGGCTTGACGCCATCGAAAGCCG
 CCTCGCTGAAATCCAGCAGTTAAACGAAAATACGGCGCAACGATCGCTGATATTTTGCAA
 TATGCTGAGGCGATTGCTGAGGAAATCGAGACGATTGAAAACCGTGAGACCCATGTGCATG
 AACTTGAGCGACAGCTTGCAGCAGTGACAAGCGATTTGCTGATGGAGGCGGAAAACGTGAC
 CAACGTTCCCGCACTTACGCCCCGGGAGCTGATTGAACGCATTCACCAAGAGTTAAAAGAT
 TTGTACATGGAGAAGACGCAGTTTGACATCATCTTTGCGAAACGTGAAGGACCACTCGATG
 CTCCATTGGTTGATGGCGTGCCGGTTAAGTTTACGAAGATGGCATCGACGTCGTTGAGTT
 TTATATTTTCGACGAACGTCGGCGAGCCGTTGAAACCGCTCGCTAAAGTTGCTTCGGGCGGT
 GGATTGTCACGATTATGTTAGCGTTGAAAACGATTTTTTCCAAACATCAAGGGGTGACGT
 CGATTATTTTCGACGAGGTGGATACAGGCGTCAGCGGTCGTGTTGCCCAAGCGATCGCCGA
 AAAAATTTACCGCATTGCCAGCGGTTCAACAAGTGCTTTGCATTTCCCA

Ek 86. TH2 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TTCATCTATTGATCGGCGGGCGCGGTTCCGCCGAATTTGTCCGTTTCGGCGCGGAAAAGGC
 AGAAATCGAAGGGCTGTTTTTGCTTGATGATGACCGCCACCCATGTTGCCAAAAGTGCGCT
 GAGGTCGGCATCGATGTGAGCGAAGGAATGGTCGTTTTGCGCCGCGACATTTTGGCTAACG
 GCAAAGCGTCTGCCGCATTAACGGCAAGCTGGTGACAACCGCCATATTGCGGGAAGTTGG
 AGCGACGCTTGTCGATATTCACGGTCAGCATGAACATCAAGAGCTGATGGATCCATCGCGT
 CATTTACCGCTTCTTGATGAATTCGGCGGTGCGGAGATGGCGGAGGCGCTCGCACGCTACC
 GCGCTGTCTATGAACAGCATGAAGCGTTGGTGAAAAAATTAAAAAAGCTGAGTGAAAATGA
 ACAGCAAATGGCGCATCGACTTGATTTATTGACATTTTACGCTGCGCGAAATCGAACAGGCC
 AACTCGAGCTCGGAGAAGACGAACGGCTGATGGAAGAAAAAGTGCGCATTGTCAACTTTC
 AAAAGATATACAGTGCCATCCAAAAAAGCTATGAAGCGCTCTCCGGTGAAGGACGCGGCCT
 TGATTCGATCGGGGAAGCGATGGGCCACCTCGATGATGTCGCCGCGATGGATGCTGCGCTG
 AAGGAGGCGTACGAAACAGTTGCCAACAGCTACTACTTGCTTGAAGAAGTGATGTACAAGC
 TCGCGGACCAGCTCGAGGAGCTTGAGTATGACCCAGCGCGGCTTGACGCCATCGAAAGCCG
 CCTCGCTGAAATCCAGCAGTTAAACGAAAATACGGCGCAACGATCGCTGATATTTTGCAA
 TATGCTGAGGCGATTGCTGAGGAAATCGAGACGATTGAAAACCGTGAGACCCATGTGCATG
 AACTTGAGCGACAGCTTGCAGCAGTGACAAGCGATTTGCTGATGGAGGCGGAAAACGTGAC
 CAACGTTCCCGCACTTACGCCCCGGGAGCTGATTGAACGCATTCACCAAGAGTTAAAAGAT
 TTGTACATGGAGAAGACGCAGTTTGACATCATCTTTGCGAAACGTGAGGGACCACTCGATG
 CTCCATTGGTTGATGGCGTGCCGGTTAAGTTTACGAAGATGGCATCGACGTCGTTGAGTT
 TTATATTTTCGACGAACGTGCGCGAGCCGTTGAAACCGCTCGCTAAAGTTGCTTCGGGCGGT
 GAATTGTCACGATTATGTTAGCGTTGAAAACGATTTTTTCCAAACATCAAGGGGTGACGT
 CGATTATTTTCGACGAGGTGGATACAGGCGTCAGCGGTCGTGTTGCCCAAGCGATCGCCGA
 AAAAATTTACCGCATTGCCAGCGGTTCAACAAGTGCTTTGCATTTCCCA

Ek 87. TH6 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TTCATTTGTTGATCGGCGGGCGCGGCTCCGCTGAATTTGTCCGCTTCGGAGCAGAAAAGGC
 GGAAATCGAAGGGCTGTTTTTGCTTGATGATGACCGCCATCCGTGCTGGCAAAAATGCGCG
 GACGTTGGCATCGACGCGAGCGATGGCATGATCGTATTGCGCCGCGATATTTTAGCTAACG
 GAAAAAGCATTTGCCGCATCAATGGCAAGTTGGTCACCACGGCGGTGCTGCGCGACATTGG
 GCGACGCTCGTCGACATTCACGGACAGCATGAACATCAAGAGCTGATGGATCCGTCCCGC
 CACTTGCCGCTTTTAGATGAGTTCTGCGGCCTAGAGGCGGCAGAGGCGCTCGCCCGCTACC
 GCGCCGTTTTATGAGCGGTATGAAGCGCTCGGAAACAAATTGAAAAAGCTGAGCGAAAACGA
 GCAGCAAATGGCGCACCGGCTCGATTTGCTGACGTTTCAGCTGCGCGAAATCGAGCAGGCG
 GCGCTCGAGCCGGGCGAGGACGAGCGGCTGATGGAAGAAAAAGTGCGCATCGTCAATTTTC
 CAAAAAATTTATACGGCGCTGCAGAAAAGCTACGANGCGCTGGCTGGCGATGGGCGCGGGC
 TTGATTCGATCGGGGAGGCGATGCGCCATCTCGACGACGTGCGGGGCATGGACGCAGCGCT
 CAAAGAAGCGCACGAAACAACGGCGAACTGCTATTATTTGCTCGAGGAAGTGATGTACAAG
 CTGCGCGACCAAATCGAGGAGATGGAGTACGATCCGGCGCGGCTTGACGTCATCGAAAGCC
 GCCTCGCGGAAATCGGTGAGCTCAAACGGAAATACGGAGCGACGATCGCCGACATTTTGCA
 CTATGCCGAAACGATCGCCGAAGAAATCGAGACGATCGAAAACCGCGAAACGCATGTGCAT
 GAACTGAAGCAACAACCTTGCGGCGGTGACGGACGAGTTGCTCGCCGAGGCGAAAAACGTCA
 CCGCTGTTTCGGCAAACGTACGCCCCGGCGTCTGATTGAGCGCATTACCAAGAGTTGAAAGA
 TTTGTACATGGACAAAACGAAATTTGACATCATGTTTGCCAAGCGCGAAGGTCCGCTTGAC
 GCCCCTTTGGTCGACGGCGTGCCGGTCAAGTTCCAGGAAGACGGCATCGATGTCGTTCGGAT
 TTTACATTTTCGACGAACGTGCGCGAGCCGTTAAAACCGCTCGCCAAAGTCGCTTCCGGCGG
 CGAGCTGTCGCGCATCATGCTGGCGTTGAAAACGATTTTTTCCAAACATCAAGGGGTGACG
 TCGATTGTTTTTGATGAGGTCGACACAGGCGTCAGCGGCCGCGTCGCCAGGCGATGGCGG
 AAAAAATTTACCGCATCGCCAGCCAATCGCAAGTGCTTTGCATTTCCCA

Ek 88. TH7 İzolatının *recN* Geninin Baz Sırası

TCGATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTGGAGAAGACAAGGCGGAAATA
 GAGGGGCTTTTTTTGCTAGAAAATGAAAACCATCCATGTTATGACAAATGCGCCGAAGTCG
 GCATTGACATTAGTGAAGGCATGGTTGTTTTGCGCCGTGAAATTTTCGCAACTGGAAAAAG
 CGTATGCCGCGTAAATGGAAAATTAGTGACGACGGCTATATTGCGCGATATCGGTTCTACG
 CTTGTGATATTCACGGTCAACATGAACATCAAGAATTAATGAATCCATCTCGTCATCTTC
 CGCTACTTGATGAATACGGCGGAGCGGAAATTGCGGAGGCTCTTGAGGAATATCGCGCCGT
 TTATGAGAAATATGAACAATTGCGAAAGAACTAAAAAAATTAAATGAAAATGAGCAACAA
 ATGGCGCACCGCCTTGATTTATTAACATTTTCAGCTAGATGAAATTCAAAAAGCGAATTTAC
 AGCCAAACGAAGATGAGCAGTTGATGGAAGAAAAAGTAAAAATTATGAACTTCCAAAAGAT
 TTACGAGGCGCTTAAACATAGTTATGAGGCATTATCCGGCGAACAGCGCGGTCTTGACTGG
 ATTGGTTTGGCCATGAGCCATTTAGATGATGTCGCTTCTATTGACCCGGCATTAAAAGAAG
 CGTATGAAACGATTGCGAATAGTTATTATTTATTGGAGGATATTACGTATAAATTGCGCGA
 TGAATCGAACAATTGGAATATGATCCAGCCCGCCTCGATTTTATTGAAAGCCGCCTTAGT
 GAAATCAACCAATTAACGAAAATACGGATCGACCATCGAAGATATTTTGCAATATGCAG
 AAAAAATTACAGAAGAAATCGATACGATTTCAGCATCGCGAAACCCATATTCATGAACTGCA
 AAAAGAATTGAAATCGGTGACGGAAGATTTATTAATCGAAGCCAAAAATGTGACGAATGTT
 CGCAAAAAGTACGCGAAAATGTTAATTGACCATATTCATCAAGAATTAAAAGAGCTGTATA
 TGGAAAAACACAATTTGATATCGTGTTTATGAAACGGGAAGGATCGCTTGATGCACCGCT
 GCTTGACGGTGTACCAGTGAAATTTTCATGAAGATGGCGTCGATGATGCGGAATTTTATATT
 TCCACATACGTTGGCGAACCGTTAAAACCGTTAGCGAAAATTGCCTCTGGCGGGGAATTGT
 CACGCATTATGCTTGCAATTAAGCATATTTTCCAAACATCGAGGGGTACATCGATCAT
 TTTTGATGAAGTGATACGGGAGTTAGCGGCCGGGTGTCACAGGCGATTGCCGAAAAAATT
 TACCGCATCTCCATCGATTTCGAAGTGCTTTGTATTTCCCA

Ek 89. PDF1 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCAAAAGTCAATAAGTTTGGTTTTATTGA
 AACTCCTTATCGTCGAGTCGATCCTGAAACAGGAAAAGTAACAAATCAAATTGACTATTTA
 ACGGCAGACGAGGAAGATAATTATGTCGTTGCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
 GAACATTTTTAGAAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAACATCGTTGTTAAGCG
 AGATCGTGTGACTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTGCGGTGGCGACAGCGTGC
 ATTCCGTTCTTAGAAAACGATGACTCGAACCCTGCGCTTATGGGTCCTAACATG

Ek 90. PDF2 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCAAAAGTCAATAAGTTTGGTTTTATTGA
 AACTCCTTATCGTCGAGTCGATCCTGAAACAGGAAAAGTAACAAATCGAATTGACTATTTA
 ACGGCAGACGAGGAAGATAATTATGTCGTTGCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
 GAACATTTTTAGAAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAACATCGTTGTTAAGCG
 AGATCGTGTGACTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTGCGGTGGCGACAGCGTGC
 ATTCCGTTCTTAGAAAACGATGACTCGAACCCTGCGCTTATGGGTCCTAACATG

Ek 91. PDF3 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCGAAAGTGAATAAATTTGGTTTTATTGA
 AACTCCTTATCGCCGAGTCGATCCTGAAACAGGGAAAGTAACGAATCAAATTGACTATTTA
 ACGGCGGATGAGGAAGATAATTACGTCGTTGCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
 GAACATTTTTTAGAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAATATCGTTGTTAAACG
 CGATCGTGTGGATTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTGCGGTAGCGACAGCGTGC
 ATTCCGTTTTTAGAAAACGATGACTCAAACCGTGCGCTTATGGGTCCCAACATG

Ek 92. PDF15 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCAAAAGTCAATAAGTTTGGTTTTATTGA
 AACTCCTTATCGTCGAGTCGATCCTGAAACAGGAAAAGTAACAAATCAAATTGACTATTTA
 ACGGCAGACGAGGAAGATAATTATGTCGTTGCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
 GAACATTTTTTAGAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAACATCGTTGTTAAGCG
 AGATCGTGTGCGACTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTGCGGTGGCGACAGCGTGC
 ATTCCGTTCTTAGAAAACGATGACTCGAACCGTGCGCTTATGGGTCCGAACATG

Ek 93. DF16 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCAAAAGTCAATAAGTTTGGTTTTATTGA
 AACTCCTTATCGTCGAGTCGATCCTGAAACAGGAAAAGTAACAAATCAAATTGACTATTTA
 ACGGCAGACGAGGAAGATAATTATGTCGTTGCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
 GAACATTTTTTAGAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAACATCGTTGTTAAGCG
 AGATCGTGTGCGACTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTGCGGTGGCGACAGCGTGC
 ATTCCGTTCTTAGAAAACGATGACTCGAACCGTGCGCTTATGGGTCCGAACATG

Ek 94. PDF18 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCGAAAGTGAATAAATTTGGTTTTATTGA
 AACTCCTTATCGCCGAGTCGATCCTGAAACAGGGAAAGTAACGAATCAAATTGACTATTTA
 ACGGCGGATGAGGAAGATAATTACGTCGTTGCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
 GAACATTTTTTAGAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAATATCGTTGTTAAACG
 CGATCGTGTGGATTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTGCGGTAGCGACAGCGTGC
 ATTCCGTTTTTAGAAAACGATGACTCAAACCGTGCGCTTATGGGTCCAAACATG

Ek 95. PDF21 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCGAAAGTGAATAAATTTGGTTTTATTGA
 AACTCCTTATCGCCGAGTCGATCCTGAAACAGGGAAAGTAACGAATCAAATTGACTATTTA
 ACGGCGGATGAGGAAGATAATTACGTCGTTGCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
 GAACATTTTTTAGAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAATATCGTTGTTAAGCG
 CGATCGTGTGGATTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTGCGGTAGCGACAGCGTGC
 ATTCCGTTTTTAGAAAACGATGACTCAAACCGTGCGCTTATGGGTCCCAACATG

Ek 96. PDF38 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCGAAAGTGAATAAATTTGGTTTTATTGA
 AACTCCTTATCGCCGAGTCGATCCTGAAACAGGGAAAGTAACGAATCAAATTGACTATTTA
 ACGGCGGATGAGGAAGATAATTACGTCGTTGCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
 GAACATTTTTTAGAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAATATCGTTGTTAAACG
 CGATCGTGTGGATTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTCGGTAGCGACAGCGTGC
 ATTCCGTTTTTAGAAAACGATGACTCAAACCGTGCGCTTATGGGTACAAACATG

Ek 97. TF1 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCATTGGCCGAACCTGACGCACAAGCGGCGTCTGTCCGCGCTTGGCCCTGGCGGATTG
 ACACGTGAGCGCGCTGGGTTTGAGGTGCGCGACGTTCACTATTCGCACTACGGGCGGATGT
 GTCCGATTGAAACGCCGGAAGGTCCGAACATCGGACCCATCAACTCGCTGTCCACTTACGC
 GAAAGTGAACAAGTTCGGCTTTATTGAAACGCCATACCGGCGCGTCGATCCGGAAACAGGG
 CGGGTGACGGACCAAATCGATTATTTGACAGCCGATGAAGAGGACAATTACGTTGTAGCGC
 AGGCGAACGTACCGCTTGCGGAGGACGGCACGTTCTTGAAGAAAACGTTGTGCCCCGTTT
 CCGCGGCGAGAACATCGTCTGTCGAAGCGCGATCGCGTCGACTACATGGACGTTTCGCCGAAG
 CAAGTCGTCTCGGCAGCGACGGCGTGCATCCCATTTTTTGAAAACGACGACTCGAACCGCG
 CGCTGATGGGTCCAAACATGCAAC

Ek 98. TF11 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCGCTCGCTGAACTGACGCATAAGCGCCGCGTTCTGCGCTTGGCCCCGGCGGATTGA
 CGCGCGAGCAGCCGGGTTTGAAGTGCGCGACGTTCACTATTCGCACTACGGGCGGTGTGTC
 CGATCGAGACGCCGGAAGGGCCGAACATCGGGCTCATCAACTCGCTGTCCACTTACGCGAA
 AGTGAACAAGTTTGGTTTTATTGAAACGCCATACCGGCGCGTCGATCCGGAAACAGGTCGG
 GTAACGGACCAAATCGATTATTTGACAGCCGATGAAGAGGACAATTACGTTGTAGCGCAGG
 CGAACGTACCGCTTGCGGAGGACGGCACGTTCTTGAAGAAAACGTCATCGCCCGTTTCCG
 CGGCGAGAACATCGTCTGTCGAAGCGCGATCGCGTCGACTATATGGACGTGTGCGCGAAGCAA
 GTTGTCTCGGCGGCGACGGCGTGCATCCCGTTTTTGGAAAATGACGACTCGAACCGCGCCT
 TGATGGGGGCGAACATGCAGC

Ek 99. TF12 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCGCTCGCTGAGCTGACGCACAAGCGCCGCTGTCCGCGCTCGGCCCTGGCCATTGA
 CGCCGACGCGCTGGTTTTGAGGTGTAACGTCGTTATTCGCACTATGGGCGGTGTGTCCGAT
 CGAATGCCGGAAGGTCCGAACATCGGGTCATCAACTCGCTGTCCACTTACGTAAGGTGAAC
 AAGTTCGGCTTTATTGAAACGTTACCGGCGCGTCGATCCGGAAACGGGACGGGTGACGGA
 CCACATCGATTATTTGACAGCTGATGAAGAGGACAATTACGTTGTAGCGCAGGCGAAATAC
 CGCTTGCGGAGGACGGCACGTTCTTGAAGAAAACGTATCGCCCGTTTCCGCGGCGAGAAT
 ATCGTCTGTTAAGCGCGACCGCGTCGACTACATGGACGTTTCGCCGAAGCAAGTCGTCTCGG
 CAGCGACGGCGTGCATCCCATTTTTTGAAAACGACGACTCGAACCGCGCGCTGATGGGTCC
 CAACATGCAAC

Ek 100. TF13 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCGCTCGCTGAGCTGACGCACAAGCGCCGCCTGTCCGCGCTCGGCCCTGGCGGATTG
 ACGCGCGAGCGCGCTGGTTTTGAGGTGCGCGACGTCCATTATTCGCACTAAGGCGGATGTG
 TCCGATCGAAACGCCGGAAGGTCCGAACATCGGGCTCATCAACTCGCTGTCCACTTACGCG
 AAGGTGAACAAGTTCGGCTTTATTGAAACGCCGTACCGGCGCGTCGATCCGGAAACGGGAC
 GGGTGACGGACCACATCGATTATTTGACAGCTGATGAAGAGGACAATTACGTTGTAGCGCA
 GGCGAACGTACCGCTTGCGGAGGACGGCACGTTCCCTTGAAGAAAACGTTGTCGCCCGTTTC
 CGCGGCGAGAATATCGTCGTTAAGCGCGACCGCGTCGACTACATGGACGTTTCGCCGAAGC
 AAGTCGTCTCGGCAGCGACGGCGTGCATCCCATTTTTTGAAAACGACGACTCAAACCGCGC
 CTTGATGGGTACCAACATGCAAC

Ek 101. TF14 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCGCTCGCTGAGCTGACGCACAAGCGCCGCCTGTCCGCGCTCGGCCCTGGCGGATTG
 ACGCGCGAGCGCGCTGGTTTTGAGGTGCGCGACGTCCATTATTCGCACTATGGGCGGATGT
 GTCCGATCGAAACGCCGGAAGGTCCGAACATCGGGCTCATCAACTCGCTGTCCACTTACGC
 GAAGGTGAACAAGTTCGGCTTTATTGAAACGCCGTACCGGCGCGTCGATCCGGAAACGGGA
 CGGGTGACGGACCACATCGATTATTTGACAGCTGATGAAGAGGACAATTACGTTGTAGCGC
 AGGCGAACGTATCGCTTGCGGAGGACGGCACGTTCCCTTGAAGAAAACGTTGTCGCCCGTTT
 CCGCGGCGAGAATATCGTCGTTAAGCGCGACCGCGTCGACTACATGGACGTTTCGCCGAAG
 CAAGTCGTCTCGGCAGCGACGGCGTGCATCCCATTTTTTGAAAACGACGACTCAAACCGCG
 CCTTGATGGGTCCGAACATGCAAC

Ek 102. TF15 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGTTTTGATCAACTCGCTTTCACATATGCGAAAGTGAATAAATTTGGTTTTATTGAA
 ACTCCTTATCGCCGAGTCGATCCTGAAACAGGGAAAGTAACGAATCAAATTGACTATTTAA
 CGGCGGATGAGGAAGATAATTACGTCGTTGCCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATGG
 AACATTTTTAGAAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAATATCGTTGTTAAGCGC
 GATCGTGTGGATTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTGCGGTAGCGACAGCGTGCA
 TTCCGTTTTTAGAAAACGATGGCTCAAACCGTGCGCTTATGGGTACCAACATG

Ek 103. TF16 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCGCTCGCTGAGCTGACGCACAAGCGCCGCCTGTCCGCGCTCGGCCCTGGCGGATTG
 ACGCGCGAGCGCGCTGGTTTTGAGGTGCGCGACGTCCATTATTCGCACTATGGGCGGATGT
 GTCCGATCGAAACGCCGGAAGGTCCGAACATCGGGCTCATCAACTCGCTGTCCACTTACGC
 GAAGGTGAGCAAGTTCGGCTTTATTGAAACGCCGTACCGGCGCGTCGATCCGGAAACGGGA
 CGGGTGACGGACCACATCGATTATTTGACAGCTGATGAAGAGGACAATTACGTTGTAGCGC
 AGGCAAACGTACCGCTTGCGGAGGACGGCACGTTCCCTTGAAGAAAACGTTGTCGCCCGTTT
 CCGCGGCGAGAATATCGTCGTTAAGCGCGACCGCGTCGACTATATGGACGTTTCGCCGAAG
 CAAGTCGTTTCGGCGGCGACGGCATGCATTCCGTTTTTGAAAACGACGACTCAAACCGCG
 CCTTGATGGGTCCAAACATGCAAC

Ek 104. TF17 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCGACGCAGAGCTGACGCACAAGCGCCGCCTGTCCGCGCTCGGCCCTGGCGGATTGA
 CGCGCGAGCGCGCTGGTTTTGAGGTGCGCGACGTCCATTATTGCGCACTATGGGCGGATGTG
 TCCGATCGAAACGCCGGAAGGTCCGAACATCGGGCTCATCAACTCGCTGTCCACTTACGCG
 AAGGTGAACAAGTTCGGCTTTATTGAAACGCCGTACCGGCGCGTCGATCCGGAACGGGAC
 GGGTGACGGACCACATCGATTATTTGACAGCTGATGAAGAGGACAATTACGTTGTAGCGCA
 GGCGAACGTACCGCTTGCGGAGGACGGCACGTTCCCTTGAAGAAAACGTTGTCGCCCGTTTC
 CGCGGCGAGAATATCGTCGTAAAGCGCGACCGCGTCGACTACATGGACGTTTCGCCGAAGC
 AAGTCGTCTCGGCAGCGACGGCGTGCATCCCATTTTTTGAAAACGACGACTCAAACCGCGC
 CTTGATGGGTCCCAACATGCAAC

Ek 105. TH1 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCATTGGCTGAGTTGACGCATAAACGCCGTCTTTCTGCGCTTGGTCCTGGCGGATTG
 ACGCGGGAGCGCGCCGATTGGAAGTGCGTGACGTTCACTATTCTCACTATGGACGGATGT
 GCCCGATCGAGACGCCAGAAGGTCCGAACATCGGGTTGATTAACTCACTGTCTACCTACGC
 GAAAGTAAACAAATTCGGCTTTATTGAAACACCATAACCGACGCGTCGATCCGGAGACAGGG
 AAAGTTACGGATCAAATTGATTATTTAACGGCCGACGAGGAAGACAACATATGTCGTGGCGC
 AAGCGAACGTGCCGCTTGCGGAAGATGGAACGTTCCCTTGAGGAAAACGTCATCGCTCGTTT
 CCGCGGTGAAAACATTGTCGTCAAACGCGACCGCGTCGACTATATGGACGTTTCGCCAAAG
 CAAGTTGTTTCTGCAGCAACGGCATGTATTCCGTTTTTTGAAAACGACGACTCGAACC GCG
 CCTTGATGGGTCCCAACATGCAAC

Ek 106. TH2 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCATTGGCTGAGTTGACGCATAAACGCCGTCTTTCTGCGCTTGGTCCTGGCGGATTG
 ACGCGGGAGCGCGCCGATTGGAAGTGCGTGACGTTCACTATTCTCACTATGGACGGATGT
 GTCCGATCGAGACGCCAGAAGGTCCGAACATCGGGTTGATTAACTCACTGTCTACCTACGC
 GAAAGTAAACAAATTCGGCTTTATTGAAACACCATAACCGACGCGTCGATCCGGAGACAGGG
 AAAGTTACGGATCAAATTGATTATTTAACGGCCGACGAGGAAGACAACATATGTCGTGGCGC
 AAGCGAACGTGCCGCTTGCGGAAGATGGAACGTTCCCTTGAGGAAAACGTCATCGCTCGTTT
 CCGCGGTGAAAACATTGTCGTCAAACGCGACCGCGTCGACTATATGGACGTTTCGCCAAAG
 CAAGTTGTTTCTGCAGCAACGGCATGTATTCCGTTTTTTGAAAACGACGACTCGAACC GCG
 CCTTGATGGGTCCCAACATGCAAC

Ek 107. TH4 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCGAAAGTGAATAAATTTGGTTTTATTGA
 AACTCCTTATCGCCGAGTCGATCCTGAAACAGGGAAAGTAACGAATCAAATTGACTATTTA
 ACGGCGGATGAGGAAGATAATTACGTCGTTGCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
 GAACATTTTTTAGAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAATATCGTTGTAAACG
 CGATCGTGTGGATTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTCGGTAGCGACAGCGTGC
 ATTCCGTTTTTTAGAAAACGATGACTCAAACCGTGCGCTTATGGGTCCCAACATG

Ek 108. TH5 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCAAAAGTCAATAAGTTTGGTTTTATTGA
 AACTCCTTATCGTCGAGTCGATCCTGAAACAGGAAAAGTAACAAATCAAATTGACTATTTA
 ACGGCAGACGAGGAAGATAATTATGTCGTTGCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
 GAACATTTTTTAGAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAACATCGTTGTAAAGCG
 AGATCGTGTCTGACTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTGCGGTGGCGACAGCGTGC
 ATTCCGTTCTTAGAAAACGATGACTCGAACC GTGCGCTTATGGGTGCTAACATG

Ek 109. TH6 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCGCTCGCTGAGCTGACGCACAAGCGCCGCTGTCCGCGCTCGGCCCTGGCGGATTG
 ACGCGCGAGCGCGCTGGTTTTGAGGTGCGCGACGTCCATTATTCGCACTATGGGCGGATGT
 GTCCGATCGAAACGCCGGAAGGTCCGAACATCGGGCTCATCAAGCGCTGTCCACTTACGCG
 AAGGTGAACAAGTTTCGGCTTTATTGAAACGCCGTACCGGCGCGTCGATCCGGAACGGGAC
 GGGTGACGGACCACATCGATTATTTGACAGCTGATGAAGAGGACAATTACGTTGTAGCGCA
 GGCGAACGTACCGCTTGCGGAGGACGGCACGTTCCCTTGAAGAAAACGTTGTGCGCCCGTTTC
 CGCGGCGAGAATATCGTTCGTTAAGCGCGACCGCGTCGACTACATGGACGTTTCGCCGAAGC
 AAGTCGTCTCGGCAGCGACGGCGTGCATCCCATTTTTTGAAAACGACGACTCAAACCGCGC
 CTTGATGGGTACCAACATGCAAC

Ek 110. TH7 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCGCTTGCTGAATTGACACATAAACGCCGTCTTTCTGCGTTAGGACCAGGTGGTTTTA
 ACTCGTGAACGCGCAGGTTTTGAGGTGCGTGACGTTCACTATTCACACTATGGACGAATGT
 GTCCGATTGAAACGCCTGAAGGTCCAAACATTGGGTTGATCAACTCACTATCTACGTATGC
 AAAAGTGAATAAATTTGGTTTTATCGAAACACCGTATCGACGTGTCGATCCGGAGACAGGA
 AGAGTTACCGATCAAATTGATTATTTAACAGCCGATGAAGAAGATAACTATGTCGTAGCGC
 AAGCGAACGTCCCTCTAGCGGAAGATGGAACGTTCTTAGAAGAAAATGTGGTTGCTCGTTT
 CCGCGGGGAAAACATTGTCGTAAAACGCGACCGTGTGCGACTATATGGACGTATCGCCAAAA
 CAAGTTGTATCGGCAGCGACAGCCTGCATTCCGTTTTTTGAAAACGTGACTCGAACC GCG
 CGCTTATGGGTACCAACATGCAAC

Ek 111. DF20 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

GAACCCGCTCGCTGAGCTGACGCACAAGCGCCGCTGTCCGCGCTCGGCCCTGGCGGATTG
 ACGCGCGAGCGCGCTGGTTTTGAGGTGCGCGACGTCCATTATTCGCACTATGGGCGGATGT
 GTCCGATCGAAACGCCGGAAGGTCCGAACATCGGGCTCATCAACTCGCTGTCCACTTACGC
 GAAGGTGAACAAGTTTCGGCTTTATTGAAACGCCGTACCGGCGCGTCGATCCGGAACGGGA
 CGGGTGACGGACCACATCGATTATTTGACAGCTGATGAAGAGGACAATTACGTTGTAGCGC
 AGGCGAACGTACCGCTTGCGGAGGACGGCACGTTCCCTTGAAGAAAACGTTGTGCGCCGTTT
 CCGCGGCGAGAATATCGTTCGTTAAGCGCGACCGCGTCGACTACATGGACGTTTCGCCGAAG
 CAAGTCGTCTCGGCAGCGACGGCGTGCATCCCATTTTTTGAAAACGACGACTCAAACCGCG
 CCTTGATGGGTACCAACATGCAAC

Ek 112. D1021 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGTTTTGATCAACTCGCTTTTCGACATATGCGAAAGTTAATAAATTTGGCTTTATTGA
AACGCCTTACCGTCGCGTTGATCCTGAAACAGGAAAAGTAACAAATCAAATTGACTATTTA
ACGGCAGACGAGGAAGATAATTATGTCGTTGCCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
GAACATTTTTTAGAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAACATCGTTGTTAAGCG
AGATCGTGTCTGACTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTCTGGTGCGACAGCGTGC
ATTCCGTTCTTAGAAAGCGATGACTCGAACC GTGCGCTTATGGGTACCAACATG

Ek 113. D1041 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCGAAAGTGAATAAATTTGGTTTTATTGA
AACTCCTTATCGCCGAGTCGATCCTGAAACAGGGAAAGTAACGAATCAAATTGGCTATTTA
ACGGCGGATGAGGAAGATAATTACGTCGTTGCCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
GAACATTTTTTAGAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAATATCGTTGTTAAACG
CGATCGTGTGGATTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTCTGGTAGCGACAGCGTGC
ATTCCGTTTTTTAGAAAACGATGACTCAAACCGTGCGCTTATGGGTACCAACATG

Ek 114. D1042 İzolatının *rpoB* Geninin Baz Sırası

ACATCGGATTAATTAACCTCGCTTTCCACATATGCGAAAGTGAATAAATTTGGTTTTATTGA
AACTCCTTATCGCCGAGTCGATCCTGAAACAGGGAAAGTAACGAATCAAATTGACTATTTA
ACGGCGGATGAGGAAGATAATTACGTCGTTGCCCAAGCGAACGTTCCGATTGCGGAAGATG
GAACATTTTTTAGAAGAAAACGTTGTTGCTCGCTTCCGTGGTGAAAATATCGTTGTTAAGCG
CGATCGTGTGGATTATGTAGACGTTTCTCCAAAACAAGTTGTGTCTGGTAGCGACAGCGTGC
ATTCCGTTTTTTAGAAAACGATGACTCAAACCGTGCGTTTATGGGTCCAAACATG

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Trabzon’da doğdu. İlköğrenimini Trabzon’da, Orta ve Lise öğrenimini Kırıkkale’de tamamladıktan sonra 1996-1997 öğretim yılında K.T.Ü Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 2001 yılında bu bölümden biyolog unvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime başladı ve 2005 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitime başladı. Halen K.T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.