

**SICAK SU KAYNAKLARINDAN
TERMOFİLİK BAKTERİ TÜRLERİNİN
İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU**

Seda ERCAN-AKKAYA

Doktora Tezi

Fen Bilimler Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül-2005

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonunca kabul edilen 011051 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Seda ERCAN AKKAYA'nın "Sıcak su kaynaklarından termofilik bakteri türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu" başlıklı Biyoloji Anabilim dalındaki Doktora tezi 16.08.2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

| | Adı Soyadı | İmza |
|----------------------|----------------------------------|-------|
| Üye(Tez Danışmanı) : | Prof. Dr. Merih Kıvanç | |
| Üye | : Prof. Dr. Belma ASLİM | |
| Üye | : Doç. Dr. Kıymet GÜVEN | |
| Üye | : Yard. Doç Dr. Buket KUNDUHOĞLU | |
| Üye | : Yard. Doç Dr. Semra İLHAN | |

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Yönetim Kurulu'nuntarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET**Doktora Tezi****SICAK SU KAYNAKLARINDAN TERMOFİLİK
BAKTERİ TÜRLERİNİN İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU****Seda ERCAN-AKKAYA****Doktora Tezi****Anadolu Üniversitesi****Fen Bilimleri Enstitüsü****Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ****2005, 152 sayfa**

Bu çalışmada; Gazlıgöl, Gecek, Ömerli, Hüdai, Sarıcakaya, Gediz, Eynal ve Kızıldere kaplıcalarından alınan sıcak su örneklerinden optimum 60°C ve 75°C'de izole edilen termofilik bakterilerin, biyokimyasal testler, SDS-PAGE analizi % G+C oranlarının saptanması, yağ asidi analizleri ve DNA dizi analizleri yapılarak, identifikasyonları yapılmış ve enzimatik özellikleri araştırılmıştır. DNA dizi analizi sonuçlarına göre, iki adet Gr(-) bakterinin *Thermus thermophilus* ve *Meiothermus taiwanensis* türlerine ait yeni alt türler olabileceği sonucuna varılmış, yedi adet sıcak su kaynağında bulunan bakteriyal çeşitlilik belirlenmiş, bu kaynaklarda *Geobacillus* ve *Thermus* türlerinin yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiş, *Archaea* izolasyonu ise yapılamamıştır.

Anahtar Kelimeler:*Thermus*, *Meiothermus*, *Geobacillus*, Termofil,**Termal kaynak**

ABSTRACT**PhD Thesis****ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THERMOPHILIC
BACTERIA SPECIES FROM HOT SPRINGS****Seda ERCAN AKKAYA****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANC****2005, 152 pages**

In this study thermophilic bacteria were isolated from Gazlıgöl, Gecek, Hüdai, Sarıcakaya, Gediz, Eynal and Kızıldere hot springs and grew optimally 60°C and 75 °C. These isolates were identified according to nutritional characteristics, total protein profiles, cellular fatty acid profiles, % G+C ratio and sequence of 16S rDNA gene. Their enzyme activities were also investigated.

We showed according to 16s rDNA sequence results that our two new Gr(-) isolates belonging to *Thermus* and *Meiothermus* genus. Further bacterial diversity were determined of seven different hot springs.

We determined to *Geobacillus* and *Thermus* genus but no members of *Archaea* were detected in these hot springs.

Keywords: *Thermus*, *Meiothermus*, *Geobacillus*, Thermophil, Hot spring

Her zaman yanımda olan ve bana güç veren sevgili eşim Muzaffer'e, hayatım boyunca, sevgi ilgi sabır ve desteklerini hep hissettiğim annem, babam ve kardeşim Ferda'ya sonsuz teşekkürlerimle...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımı yürütmem için fakülte ve bölüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, benden sonsuz desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof Dr. Merih KIVAC' a, bilgi ve materyal desteğinden faydalandığım sayın Prof Dr. Tony WILLIAMS (Department of Biochemistry, Faculty of Basic Medical Sciences, Queen Mary and Westfield College, University of London)'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım sayın hocam Doç.Dr. Kıymet GÜVEN, Yard. Doç. Dr Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ, Arş Gör. M. Burçin MUTLU, Uzm. Erdoğan ÇAKIR, Yard Doç. Dr. Emel SÖZEN', Yard. Doç Dr. Asuman DEMİROĞLU (Gebze İleri teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)'a teşekkür ederim.

Her konuda benden ilgi ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Dr. Emel ERGENE, Yard. Doç. Dr. Filiz SUSUZ, Arş Gör. Meral YILMAZ, Uzm. Biyolog Hülya TAŞKIN, Tkn. Mustafa KARAKAŞ, Emine DİNÇER ve emeği geçen bütün arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

011051 no'lu proje ile doktora çalışmamı destekleyen Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu'na ve vergi vererek çalışmalarımızı sürdürmezi sağlayan Türk Halkı'na teşekkürlerimi sunuyorum.

Seda ERCAN AKKAYA

Eylül-2005

İÇİNDEKİLER

| | <u>savfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| İÇİNDEKİLER | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | ix |
| | |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.2 Termal Çevreler..... | 4 |
| 1.2.1. Sıcak Sulardaki Termofiller..... | 5 |
| 1.2.1.1. Termofilik basiller..... | 5 |
| 1.2.1.2. Termofilik gram pozitif basiller..... | 8 |
| 1.2.1.3. Termofilik Gram Negatif Basiller..... | 15 |
| 1.2.1.4. <i>Thermus</i> Cinsi..... | 16 |
| 1.2.1.5. <i>Meiothermus</i> Cinsi..... | 19 |
| 1.2.1.6. Diğer Termofilik Basiller..... | 29 |
| 1.2.2. Sıcak Sulardaki Hipertermofiller..... | 31 |
| | |
| 2. MATERYAL VE YÖNTEM | 37 |
| 2.1. Materyal..... | 37 |
| 2.1.1. Örneklerin alınması ve laboratuvara taşınması..... | 37 |
| 2.1.2. Kullanılan besi ortamları ve kimyasal ayıraçlar..... | 37 |
| 2.1.2.1. Besi ortamları..... | 37 |
| 2.1.2.2. Kimyasal ayıraçlar..... | 46 |
| 2.1.2.3. Kullanılan primer dizileri..... | 50 |
| 2.1.2.4. Standart olarak kullanılan bakteriler..... | 51 |
| 2.2. Yöntem..... | 51 |
| 2.2.1. Örneklerin analize hazırlanması..... | 51 |
| 2.2.2. Mikroskopik inceleme..... | 52 |
| 2.2.3. Biyokimyasal testlerin uygulanması..... | 52 |

| | |
|--|------------|
| 2.2.4. Moleküler testler..... | 56 |
| 3. BULGULAR..... | 65 |
| 3.1. Termofilik Basillerin Morfolojik Özelliklerine Göre Tanımlanması..... | 65 |
| 3.2. Biyokimyasal Test Sonuçlarına Göre Termofil Bakterilerin Tanımlanması..... | 67 |
| 3.3 SDS-PAGE Analizi Sonuçlarına Göre İzolatların Benzerlik Oranlarının Saptanması..... | 82 |
| 3.4. Plazmid izolasyonu..... | 93 |
| 3.5. Yağ Asidi Analizi sonuçlarına göre İzolatların Benzerlik Oranlarının Saptanması..... | 93 |
| 3.6. Gr(-) örneklerdeki enzimlerin saptanması..... | 101 |
| 3.7. Ribotiplendirme | 103 |
| 3.8. DNA izolasyonu, 16srRNA geninin baz dizisinin belirlenmesi..... | 103 |
| 3.9. DNA Erime Noktasına (Tm) Göre % G+C Hesaplanması..... | 104 |
| 3.10. 16S rRNA Geninin PCR ile çoğaltılması..... | 104 |
| 3.11. DNA Dizi Analizi Sonuçları..... | 105 |
| 3.12. İdentifikasyon Sonuçlarının Karşılaştırılması..... | 108 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 109 |
| 4.1. Suşların İzolasyon, Morfoloji ve Biyokimyasal Karakteristikleri..... | 109 |
| 4.2. SDS-PAGE analizleri..... | 115 |
| 4.3. Gaz Kromatografisi İle Yağ Asidi Analizleri..... | 116 |
| 4.4. 16S rDNA Gen Dizi Analizi..... | 121 |
| 4.5. Gr(-) izolatların % G+C Değerleri..... | 121 |
| 4.5. İzolatların Enzim Özellikleri..... | 122 |
| KAYNAKLAR..... | 124 |
| EKLER..... | 133 |
| EK-1, İzolat 331'e Ait DNA Dizi Analizi Sonuçlarının <i>Thermus</i> Cinsine Ait Türlerin Baz Dizileri ile Karşılaştırılması..... | 133 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | | |
|-------|---|----|
| 1.1. | Filogenetik soy ağacı..... | 2 |
| 3.1. | S02 <i>Ge. Stearothermophilus</i> (VITEC) | 78 |
| 3.3. | K01 <i>Ge. Stearothermophilus</i> (VITEC) | 78 |
| 3.5. | Gg02..... | 78 |
| 3.2. | Ö08 | 78 |
| 3.4. | E02 <i>Ge. Thermodenitrificans</i> (VITEC) | 78 |
| 3.6. | Gc01..... | 78 |
| 3.7. | H24 İdentifiye edilememiş suş (VITEC, SDS-PAGE, GC) | 79 |
| 3.9. | H22 <i>Ge.stearothermophilus</i> (VITEC) | 79 |
| 3.11. | H21..... | 79 |
| 3.8. | Gg03 <i>Ge.stearothermophilus</i> (VITEC) | 79 |
| 3.10. | Gd12 <i>Ge. thermodenitrificans</i> (VITEC) | 79 |
| 3.12. | Gd10..... | 79 |
| 3.13. | Gc03 <i>Ge.stearothermophilus</i> (VITEC) | 80 |
| 3.15. | Gc02 <i>Ge.stearothermophilus</i> (VITEC) | 80 |
| 3.17. | E02 <i>Ge thermodenitrificans</i> | 80 |
| 3.14. | Ö02..... | 80 |
| 3.16. | Ö04..... | 80 |
| 3.18. | Ö06 İdentifiye edilememiş suş (VITEC) | 80 |
| 3 19 | 333 numaralı suş..... | 81 |
| 3.21. | 337 <i>Thermus sp.</i> | 81 |
| 3.23. | 331 <i>Thermus sp.</i> | 81 |
| 3.20. | 385 numaralı suş..... | 81 |
| 3.22. | 101 <i>Meiothermus sp.</i> | 81 |
| 3.24. | 335 numaralı suş..... | 81 |
| 3.25. | Comassie brillant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları..... | 83 |

| | |
|--|-----|
| 3.26. Comassie brillant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları..... | 84 |
| 3.27. Comassie brillant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları..... | 85 |
| 3.28. Comassie brillant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları..... | 86 |
| 3.29. Comassie brillant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları. | 87 |
| 3.30. Comassie brillant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları..... | 88 |
| 3.31. Gr(+) suşların SDS-PAGE analizine göre homolojisi..... | 89 |
| 3.32. Comassie brillant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları.: | 90 |
| 3.33 Comassie brillant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları. | 91 |
| 3.34 Comassie brillant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları. | 92 |
| 3.35. Gr(-) suşların SDS-PAGE analizine göre homolojisi..... | 92 |
| 3.36. Plazmid izolasyonu..... | 93 |
| 3.37. DNA izolasyonu..... | 103 |
| 3.38. PZR ürünleri (a)..... | 104 |
| 3.39. PZR ürünleri (b)..... | 104 |
| 3.40. PZR ürünleri (c)..... | 105 |

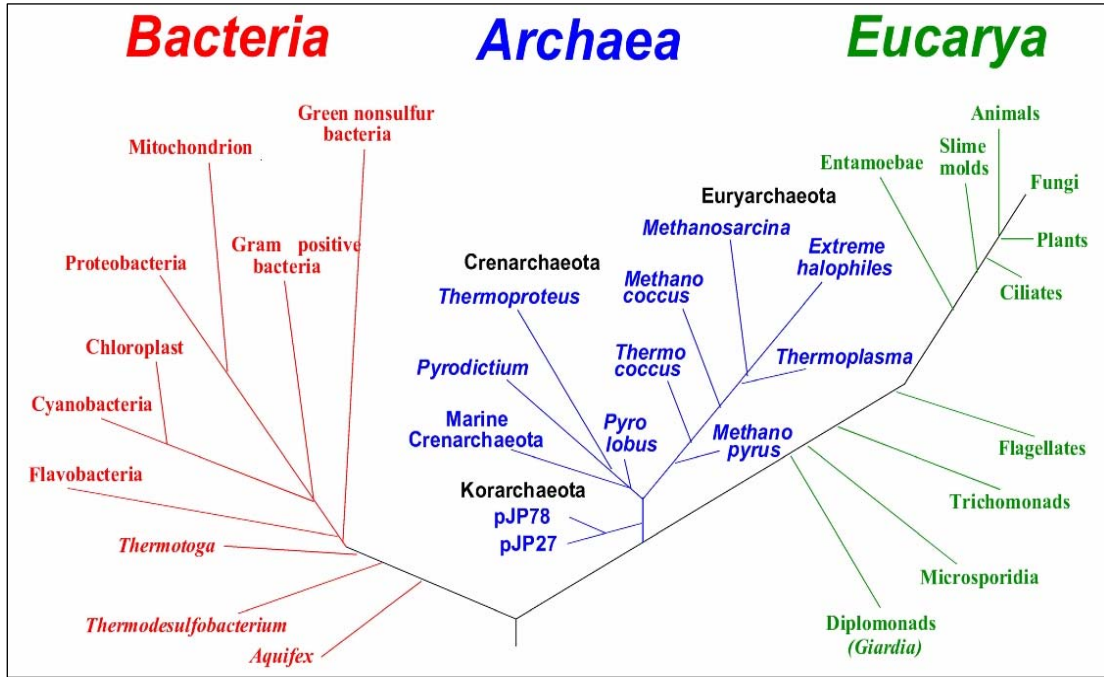
ÇİZELGELER DİZİNİ

| | | |
|-------|--|-----|
| 1.1. | Türkiyedeki 134 adet jeotermal sahanın isimleri ve kuyubaşı sıcaklıkları... | 6 |
| 1.2. | Gr(+) Termofilik Basillerin Biyokimyasal Özellikleri..... | 11 |
| 1.3. | Gr(+) Basiller İçin Yağ Asidi Özellikleri..... | 13 |
| 1.4. | <i>Thermus</i> cinsine ait türlerinin yağ asidi analizleri.. .. | 18 |
| 1.5. | <i>Thermus aquaticus</i> ve akraba türlerin karakteristikleri..... | 19 |
| 1.6. | Termus cinsine ait türlerinin biyokimyasal özellikleri..... | 20 |
| 1.7. | <i>Meiothermus</i> cinsine ait türlerinin biyokimyasal özellikleri. | 23 |
| 1.8. | <i>Meiothermus</i> cinsine ait türlerinin yağ asidi analizleri. | 24 |
| 1.9. | Diğer Termofilik Basillerin Biyokimyasal Özellikleri..... | 30 |
| 1.10. | Diğer Termofilik Basillerin Biyokimyasal Özellikleri..... | 31 |
| 1.11. | Hipertermofilik Basillerin Karakteristik Özellikleri..... | 35 |
| 3.1. | Gram pozitif suşların biyokimyasal test sonuçları. | 70 |
| 3.2. | Gram pozitif suşların biyokimyasal test sonuçları. | 71 |
| 3.3. | Gram pozitif suşların biyokimyasal test sonuçları. | 72 |
| 3.4. | Gram pozitif suşların biyokimyasal test sonuçları. | 73 |
| 3.5. | Gram Negatif Suşların Biyokimyasal test sonuçları..... | 74 |
| 3.6. | Gram pozitif suşların biyokimyasal test sonuçları. | 75 |
| 3.7. | Gram Negatif Suşların Biyokimyasal test sonuçları..... | 77 |
| 3.8. | Gr(+) Basillerde Yağ Asidi Analizi Sonuçları..... | 93 |
| 3.9. | Gr(+) Basillerde Yağ Asidi Analizi Sonuçları..... | 96 |
| 3.10. | Gr(+) Basillerde Yağ Asidi Analizi Sonuçları..... | 97 |
| 3.11. | Gr(-) Basillerde Yağ Asidi Analizi Sonuçları..... | 99 |
| 3.12. | Gr(-) Basillerde Yağ Asidi Analizi Sonuçları..... | 100 |
| 3.13. | Gr(-) örneklerde kullanılan API-ZYM Kiti substratına göre enzimler..... | 101 |
| 3.14. | Gr(-) örneklerde tespit edilen enzimler ve yoğunluk düzeyleri..... | 102 |
| 3.15. | Ribotiplendirme çalışması..... | 103 |
| 3.16. | Gr(-) basillerin % G+C değerleri..... | 104 |
| 3.17. | İzolara uygulanan, biyokimyasal testler, VITEC testleri, yağ asidi analizleri,DNA dizi analizi sonuçlarının karşılaştırılması..... | 108 |

1. GİRİŞ

Gezegelimiz üzerindeki mikrobiyal hayat, yüksek yapılı organizmaların varolmasından yaklaşık olarak 3–3,7 milyon yıl önce oluşmuştur. Mikroorganizmalar biyosferin yaygın ve önemli bir kısmını oluşturmasına rağmen, besin üretiminde kullanılanlar ve hastalık yapanların dışında büyük bir çoğunluğu tanımlanamamıştır. Mikrobiyal hayat yalnızca bizim gördüğümüz hava, toprak, ve göllerde değil, yeryüzünde, kutuplardaki buzulların arasından, kaynayan yanardağ bacalarına, tuz göllerinden sodalı sulara ve yüksek asit ortamlara kadar yayılmış durumdadır. Su sıcaklığının kaynama noktasına ulaştığı değerlerde bile mikrobiyal yaşam varlığını sürdürmektedir. Atmış beş derecenin üzerinde yalnızca prokaryotik yaşam formları bulunmaktadır. Ancak, daha yüksek sıcaklıklarda sadece *Bacteria* ve *Archaea* varlığını sürdürebilmektedir. Bu da bizim bu sıcak çevreleri ve burada bulunan yaşam çeşitliliğini merak etmemizi sağlamıştır (Madigan ve ark., 2000).

Yakın zaman önce derin deniz termalleri gibi farklı anaerobik habitatların bulunması, biyoteknolojik potansiyele sahip anaerobik mikroorganizmaların izolasyonunu mümkün kılmıştır (Johanson 1999). Modern moleküler yöntemler keşfedildiğinde, mikroorganizmaların araştırılması daha da ilerlemiştir. 1990'da Wosse, Kandler ve Wheelies (Wosse ve ark., 1990) canlıları *Bakteria*, *Archaea* ve *Eucarya* olarak üç domaine ayırmayı önermişlerdir. Bu ayırımı vücut, biyokimyasal, filogenetik, ve genomik yapılarına bakarak yapmışlardır (Şekil 1.1). 1977'de yapılan bir çalışmada da *Archaeobacteria* farklı bir hayat formu olarak kabul edilmiş ve canlılar alemi, 16S rRNA dizilişleri başta olmak üzere, hücre duvarı, lipitler, RNA polimeraz ve protein sentezi özelliklerine göre üç önemli gruba ayrılmıştır (Gupta 1998). Canlılar *Bacteria*, *Archaea* ve *Eukarya* olarak sınıflandırılmıştır (Madigan ve ark., 2000). Yapılan filogenetik incelemeler sonucu *Archaea*'lar ile *Eukaryotlar*'ın atalarının yakın akraba oldukları *Archaea* ve *Bacteria*'nın ise prokaryotlara dahil olmasına rağmen, filogenetik olarak birbirinden farklı olduğu bildirilmiştir (Gupta 1998).



Şekil 1.1 Filogenetik soy ağacı (Wosse ve ark., 1990).

Dünyamız'da solfatarik alanlar, hidrotermal kuyular, sıcak su kaynakları gibi çeşitli jeotermal alanlardan aerobik termofillerin izolasyonları yapılmaktadır (Gillian ve ark. 2001). Yapılan pek çok çalışmada, sıcaklığın mikroorganizmaların fizyolojik aktiviteleri ve gelişimleri üzerindeki en önemli faktörlerden biri olduğu, yüksek sıcaklığın farklı mikroorganizmalar tarafından farklı derecelerde tolere edildiği, pek çok ökaryotik canlının kısa bir süre bile olsa 50⁰C sıcaklığa dayanamazken, buna karşın bir grup mikroorganizmanın daha yüksek sıcaklıklarda yaşayabildiği bildirilmiştir (Williams ve ark. 1995).

Yapılan araştırmalarda termofillerin yüksek sıcaklıkta büyüyen organizmalar olduğu, güneş ile, jeotermal olarak, yada biyolojik olarak ısıtılmış çevrelerin tipik üyeleri olarak. üç farklı sıcaklık aralığında rasgele yayıldıkları, (termofiller 35-70⁰C, ekstrem termofiller 55-85⁰C, hipertermofiller 75-113⁰C) saptanmıştır. Endonezya sıcak sularının termofilik bakteriyel komünitesinin incelenmesi üzerine yapılan bir çalışmada da sıcaklığı 82 ve 90⁰C, pH'2 olan, Domas ve Cibuni alanları incelenmiş, *Proteobacteria*, *Bacillus* ve *Flavobacterium* üyelerini içeren bir mikrobiyal komünitenin var olduğu bildirilmiştir (Gillian ve ark. 2001).

Thermus cinsi üyelerinin ise karasal sıcak su kaynaklarından yaygın olarak izole edilen ekstrem termofilik, aerobik bakteriler olduğu, bütün suşların 55⁰C'nin üzerindeki sıcaklıklarda nötr ve alkali pH seviyelerinde, zorunlu heteretrof olarak gelişirken, nadiren miksotrofik olarak gelişen suşların da bulunduğu, bazı *Thermus* türlerinin ise, O₂ yerine NO₃, Fe(III) ve S⁰, ü elektron alıcısı olarak kullanarak anaerobik şartlar altında yaşayabildikleri tespit edilmiştir (Williams ve Da Costa., 1994). Derin deniz çukurlarının bulunduğu çevrelerde ise obligat anaerobik pek çok tür bulunmasına rağmen son zamanlarda bu alanlarda yaşayan fakültatif aerobik türlere de rastlanmış, diğer taraftan pek çok zorunlu aerobik bakteri Orta Atlantik sınırı ve Guaymas havzasında bulunan derin deniz hidrotermal çukurlarından izole edilmiş, bu sonuçlara bakılarak termofilik, obligat yada fakültatif aerobik popülasyonların, hidrotermal çukurların oksidatif mikrohabitatlarında yer aldıkları bildirilmiştir (Sako ve ark., 2003).

Taiwan da yapılan bir çalışmada da, optimum 55-60⁰C'de gelişen, aerobik, termofilik, spor oluşturmeyen, kırmızı pigment oluşturan, heterotrofik, oldukça uzun boya sahip ve filamentli iki yeni bakteri izole edilmiş, yapılan 16S rRNA analizleri, DNA-DNA hibridizasyonu, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri, yağ asidi dizilişlerine göre bu suşların, *Meiothermus taiwanensis* sp. nov. suş *WR-30* ve suş *WR-220* olarak isimlendirildiği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2002).

Çin de yapılan başka bir çalışmada ise, gram negatif, termofilik, optimum 55⁰C'de gelişen ancak 40⁰C'nin altında ve 70⁰C'nin üzerinde zor gelişen, sakkaroz ve maltozu kullanamayan, jelatin ve nişastayı hidroliz edemeyen, pembe pigmentli bakteriler izole edilmiş, 16S rRNA analizleri, DNA-DNA hibridizasyonu yapılmış, bu yeni suş, *Meiothermus rosaceus* sp. nov. olarak adlandırılmıştır (Chen ve ark., 2002).

Sarı pigmentli, 55-60⁰C'de optimum gelişme gösteren, *Meiothermus timidus* sp. nov., ise orta Portekiz ve Azores den izole edilmiş, 16S rRNA analizlerine göre bu suşun *Meiothermus* 'ların yeni bir üyesi olduğu görülmüş, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri, yağ asidi dizilişleri yapılmış, bu suşun *Meiothermus timidus* olarak isimlendirilmesi önerilmiştir (Pires ve ark., 2005).

Ekstrem termofiller içinde yüksek sıcaklıkta yaşayanlar termostabil biyokatalizörlerinden dolayı çok ilgi çekmektedir. Bir çok ekstremofil

mikroorganizma, *Archaea* grubu içinde yer almaktadır. Bunların bir alt grubunun ise optimum 75°C 'de yaşayan ekstrem termofiller olduğu bildirilmiştir (Madigan ve ark., 2000).

Ülkemiz sıcak su kaynakları bakımından oldukça zengindir, ancak, yapılan literatür araştırmalarında, bu alanlarda yayılım gösteren mikroorganizmalarla ilgili daha önce yapılmış geniş bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bulduğumuz bölge ülkemizdeki termal kaynaklar bakımından oldukça zengin olmasına rağmen, bu kaynakların mikrobiyal özellikleri ve biyoteknolojik öneme sahip termofilik mikroorganizma profilleri açısından herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bizim çalışma alanı olarak seçtiğimiz kaynaklar, Afyon ili sınırları içinde bulunan, Ömerli ve Gecek (98°C), Gazlıgöl (74°C), Hüdai (71°C), Kütahya ili sınırları içinde bulunan Eynal-Simav (163°C), Gediz (78°C), Eskişehir ili sınırları içinde bulunan Sarıcakaya (56°C), Denizli ili sınırları içinde bulunan Kızıldere (212°C) dir. Çalışmamızda kaynakların seçimi yapılırken Eskişehir iline yakınlıkları ve İller Bankasının, Jeotermal Kaynaklı Belediyeler birliğinin verilerine dayanarak, 2001 yılında, yayınlamış olduğu sıcaklık değerleri baz alınmıştır.

Çalışmamızda özetlenmiş bilgiler ışığında, bölgemizde yaygın olarak bulunan termal kaynaklardan alınan su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu yapılmaya çalışılarak, bölgemizdeki sıcak su kaynaklarında bu mikroorganizmaların varlığının tespiti ile izolasyon ve identifikasyon yöntemlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

1.2. Termal Çevreler

Termofil mikroorganizmalar optimum 45°C 'de, hipertermofiller optimum 80°C 'de büyümektedirler. Bu yüksek sıcaklık doğada sınırlı alanlarda bulunur. Örneğin güneş enerjisi ile ısınan topraklar gün ortasında yaklaşık 50°C 'ye hatta bazen 70°C 'ye ulaşabilmektedir. Kompostlar ve silolarda sıcaklık $50-65^{\circ}\text{C}$ 'ye ulaşmaktadır. Bunun yanında son derece yüksek ısıya sahip volkanik alanlar da doğada yer almaktadır (Baross ve Deming 1995).

Pek çok sıcak kaynak kaynama noktasına yakın sıcaklıklara sahiptir. Ayrıca bazı termal çukurlardan ise 150-500°C civarında buhar fişkirir. Deniz dibindeki hidrotermal çukurlar 350°C yada daha yüksek sıcaklıklara sahiptir. Dünya üzerindeki sıcak su kaynakları Batı Amerika, Orta Afrika, Yeni Zellanda, İzlanda, Japonya, İtalya, Endonezya, Orta Amerika, Orta Afrika gibi ülkelerin bulunduğu geniş bir alanda bulunur. Bunların yanında Yellow Stone Ulusal parkı oldukça farklı sıcak su kaynağını bir arada bulunduran büyük bir alandır. Bu sıcak sular çeşitli kimyasal bileşiklere ve çeşitli pH değerlerine sahip olmakla birlikte kemoorganotrof mikroorganizmalar için yeterli düzeyde besin maddesine sahiptir (Madigan ve ark., 2000; Brock, 1986).

Jeotermal kaynaklar açısından oldukça zengin olan ülkemizde resmi kayıtlara alınmış 140 adet jeotermal saha bulunmaktadır. İller bankasının 2001 yılında yayınlamış olduğu listeye göre ülkemizdeki jeotermal kaynaklar ve kuyubaşı sıcaklıkları çizelge 1.1 de verilmiştir. Bu çizelgeye sıcaklığı kırk derecenin altında olan kaynaklar yazılmamıştır.

1.2.1. Sıcak sulardaki termofiller

1.2.1.1. Termofilik basiller

Termofilik basiller genellikle sıcak su kaynakları, solfatarlar ve jeotermal olarak ısınmış topraklardan izole edilirler. Termofil olmalarına rağmen mezofil çevrelerde de bulunabilirler. Bu çevrelerin yanı sıra topraktan, gübreden, lağım arıtma sistemlerinden, nehir ve göllerden, hava kontaminantlarından, ve konservelerden de izole edilebilirler (Kristjansson ve Stetter, 1991).

Kuzey İrlanda'da, Eyjafjordur bölgesindeki deniz tabanında bulunan büyük deniz dibi sıcak su konik kaynaklarının keşfedilmesi ve tanımlanması üzerine yapılan bir çalışmada 72°C'de pH'ı 10 olan su incelemiş, bu termal kaynakta Gr(+) bakteriler, *Archaea* ve *Desulfurococcus mobilis* üyeleri izole edilmiştir (Marteinson ve ark. 2001).

Çizelge 1.1 Türkiyedeki 134 adet jeotermal sahanın isimleri ve kuyubaşı sıcaklıkları

| Jeotermal kaynak | °C | Jeotermal kaynak | °C | Jeotermal kaynak | °C | Jeotermal kaynak | °C |
|------------------|-----|----------------------|-----|------------------|-----|-------------------|-----|
| Afyon | | Aksaray | | Bingöl | | Çanakkale | |
| Ömer-Gecek | 98 | Ziga | 53 | Kös | 47 | Tuzla | 174 |
| Arapderesi | 75 | Aydın | | Hscıköy | 62 | Kestenbul | 75 |
| Heybeli | 79 | Germencik | 232 | Harur | 52 | Hıdırlar | 81 |
| Gazlıgöl | 74 | Çamköy | 90 | Hozavit | 48 | Kumilicası | 69 |
| Hü dai | 71 | Salavatlı | 171 | Bitlis | | Ozancık | 65 |
| Ağrı | | Aydın şehir içi | 103 | Nemrut | 66 | Kırkgeçit | 52 |
| Di yadin | 71 | Gümüşköy | 41 | Ilıcaköy | 44 | Kara | 48 |
| Amasya | | Davutlar | 65 | Bolu | | Çan | 46 |
| Hamamözü | 42 | Ortakçı | 50 | Merkez | 44 | Küçükçetmi | 41 |
| Gözlek | 40 | Balıkesir | | Sarıot | 43 | Çankırı | |
| Ankara | | Gönen | 82 | Kesenözü | 73 | Çavundur | 54 |
| Kızılcahamam | 86 | Hisaralan | 100 | Efteni | 42 | Denizli | |
| Haymana | 45 | Hisarköy | 93 | Bursa | | Kızıldere | 212 |
| Seyhamamı | 43 | Pamukçu | 60 | Çekirge | 47 | Tekkehamamı | 100 |
| Dutluca | 51 | Kepekler | 60 | Kayarca | 83 | Gölemezli | 55 |
| Ayaş-çoban | 50 | Havran | 60 | Armutlu | 75 | Karahayıt | 56 |
| Erzurum | | Dağlıcası | 64 | Kemalpaşa | 51 | Kamarayenice | 56 |
| Pasinler | 43 | Güre | 58 | Oylat | 40 | Diyarbakır | |
| Kığhazman | 56 | Kızılköy | 51 | Orhaneli | 68 | Çermik | 51 |
| Meman | 45 | Yıldız | 47 | Kütahya | | Elazığ | |
| Eskişehir | | Şamdağ | 62 | Eynal | 163 | Kolan | 42 |
| Sakarılıca | 56 | Kahramanmaraş | | Naşa | 52 | Mardin | |
| Merkez | 45 | Süleymanlı | 43 | Çitgöl | 97 | Germilab | 61 |
| İzmir | | Kayseri | | Gediz | 78 | Muğla | |
| Balçova | 124 | Tekgöz | 40 | Yoncalı | 42 | Sultaniye | 41 |
| Seferhisar | 153 | Bayramhacı | 40 | Kızıışlın | 44 | Nevşehir | |
| Doğانبey | 64 | Kırşehir | | Emet | 47 | Kozaklı | 93 |
| Dikil Kaynarca | 130 | Terme | 56 | Yeniceköy | 49 | Acıgöl(tahmini) | 200 |
| Bademli | 70 | Meahmutlu | 70 | Dereli | 41 | Yozgat | |
| Çeşme | 61 | Karakut | 55 | Samrık | 46 | Köhne | 78 |
| Şifne | 57 | Bulamaçlı | 44 | Muratdağı | 42 | Cavlak | 46 |
| Nebir | 57 | Konya | | Hamaköy | 51 | Sarıkaya | 45 |
| Paşa | 43 | Ilgın | 42 | Manisa | | Yerköy | 47 |
| Aliğa | 58 | Sivas | | Salihli | 98 | Karadikmen | 40 |
| Bayındır | 45 | Sıcakçermik | 56 | Urganlı | 83 | Karamağra | 68 |
| Tokat | | Akçaağıl | 43 | Sart | 54 | Sakarya | |
| Sulusaray | 54 | Samsun | | Saraycık | 51 | Kuzuluk | 84 |
| Reşadiye | 48 | Havza | 54 | Menteşe | 63 | Rize | |
| Van | | Siirt | | Şehitler-Kula | 55 | Ayder | 55 |
| Hasanabdâl | 90 | Hıstaçermiği | 67 | Niğde | | Urfa | |
| Zereni | 55 | Ordu | | Narköy | 63 | Banaz | 61 |
| | | Fatsa | 49 | Çiftehan | 53 | Eşme | 40 |

(İller Bankası 2001)

Bu izolatlara 16S rRNA analizi uygulanmış, izole edilen 45 izolatın 41'inin *Aquificales* ordosuna, 10 tanesinin *Korarchaeota*'ya ait dizilim gösterdiği, izolatların fizyolojik özelliklerinin tamamıyla kaynak suyu habitatının indikatörleri olduğu saptanmış ve karasal mikroorganizmaların yeraltından taşındığı fikrinin mümkün olduğunu bildirmişlerdir (Marteinson ve ark. 2001).

Yellowstone Ulusal Parkında yapılan bir çalışmada Sarah ve arkadaşlarının (2002) bildirdiklerine göre sıcaklığı 35-60°C pH 7-9 olan 5 farklı sıcak su kaynağından alınan örneklerde yeni klorofilli sülfürsüz bakteri türleri izole edilmiş ve bazı alanların türe spesifik olduğu gösterilmiştir (Boomer ve ark. 2002).

Beldüz ve arkadaşlarının (2003) yaptığı bir çalışmada ise *Archaea* ve *Eubacteria* türlerinin dünyamızın ilk dönemlerinden bu yana varolduğu ve pek çok farklı cinsi içerdiği bildirilmiş, Türkiye'nin kuzey-doğu bölgesi sıcak sularında bulunan termofilik *Bacillus flavothermus* türleri karakterizasyonu yapılmaya çalışılmıştır (Beldüz ve ark. 2003).

Yine Portekiz'in kuzeyinde bulunan Vizela ve iç bölgesinde yer alan Alcafachea'dan alınan sıcak su kaynaklarından turuncu-kırmızı pigmentli *Thermus silvanus* sp.nov. ve sarı pigmentli *T. chliarophilus* sp. nov. izole edilmiş, *T. silvanus* 55°C, *T. chliarophilus*, 50°C'de optimum büyüme göstermiş, her iki tür de katalaz negatif özellikte olup, biyokimyasal özellikleri, yağ asidi dizilişleri ve 16S rRNA dizilişlerinin *T. ruber* ve diğer formlardan farklı olduğu bildirilmiştir (Tenreiro ve ark., 1995).

Chung ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise, İzlanda jeotermal kaynaklarından yüksek seviyede 3-hidroksi yağ asidi içeren, kırmızı-turuncu pigmentli, 55°C 'de optimum büyüme gösteren *Meiothermus cerbereus* sp. nov., izole edilmiş, bu izolatın, büyümek için sıvı besi ortamında, sistein, tiosulfat, tioglikolat ihtiyacı incelenmiş, diğer *Meiothermus* türlerine benzemediği tespit edilmiştir (Chung ve ark., 1997).

1.2.1.2. Termofilik gram pozitif basiller

Karakteristik Özellikleri

Genellikle jeotermal alanlarda yayılma gösteren mikroorganizmaların büyük kısmı H, Fe, S bileşiklerini indirgeyerek yaşamını sürdüren litotroflardır (Hugenholz ve ark., 1998). Organik atıkların aerobik şartlarda parçalanması ile ısınmış (65-80°C) kompostlar içinde ise *Bacillus* ve *Thermus* türlerine rastlanmıştır (Baker ve ark., 2001).

Doğal habitatları tercihen, termofilik çevreler, sıcak kaynaklar, solfatarlar ve jeotermal ısınmış sularda bulunan, *Bacillus*'lar endospor oluşturmaları, çubuk şeklinde ve aerobik olmaları ile pek çok *Eubacteria* cinsinden ayrılmaktadırlar (Beldüz ve ark. 2003).

İlk termofilik *Bacillus*'un 1888'de Miquel tarafından 70°C de, Paris Seine nehrinden izole edildiği bildirilmiş, sonraki 30-40 yıl içinde toprak, lağım ve besinlerden yaklaşık 60°C'de yaşayabilen basiller izole edilmiş, geçen 20 yıl içinde çok sayıda yeni termofilik basil türü tanımlanmıştır (Sarp ve ark. 1991).

Bacillus stearothermophilus orijinal suşu ise 1920'de Donk tarafından tanımlanmıştır. İlk tanımlanan bu suş kaybolmasına rağmen Gordon ve Smith bu suşu daha sonra yaptıkları çalışmalarda bu suşu, obligat termofilik suşlara referans olarak kabul etmişler ve *B. stearothermophilus*'un en önemli özellikleri arasında 37-70°C'de büyüme, nişastayı hidroliz edebilme, %3 NaCl toleransı gösterme, olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan pek çok karakteristik özellik araştırmasından sonra da, *B. stearothermophilus*'un, Bergeys Manuel sekizinci baskısında yerini aldığı bildirilmiştir (Sharp ve ark., 1991).

Sınıflandırma

Bacillus thermoglucosidasius

Bu mikroorganizmanın tanımlanması tip suş, *B. stearothermophilus*'a göre yapılmış, *B. stearothermophilus*' dan daha dar bir gelişme sıcaklığına sahip

olduğu (42-69⁰C) ancak, nişasta besi ortamında optimum gelişmenin 72⁰C'ye çıktığı, maksimum bölünme süresinin havalandırılmalı ortamda 61-63⁰C'de 21-29 dakikada pepton-yest extract besi ortamında olduğu, % G+C oranının 45-46 olduğu tip suş *B. stearothermophilus*'a % 31 DNA homolojisi gösterdiği bildirilmiştir (Çizelge 1.2.) (Suzuki ve ark. 1983).

Bacillus pallidus* ve *Bacillus thermocloaceae

Termofilik aerobiktir, 50-60⁰C'de yaşamakta, kanalizasyon balçığına karışmış bira ve maya atıklarında yaygın olarak bulunmaktadır. % 7 NaCl toleransı göstermektedir (Çizelge 1.2.) (Markossia ve ark. 2000).

Bacillus thertmoleovarans

İlk olarak, nehir ağızı çamurundan izole edilmiş olan bu tür, balçık içinde minimum tuz konsantrasyonunda, 60⁰C'de n-heptodekan kullanılarak geliştirilmiş ve tanımlanmıştır. % G+C oranı 52-58 olan, termofilik mikroorganizma *Thermoleophillum* ile DNA/DNA homolojisi göstermeyen bu türün, *B. stearothermofillus*' ile % 56-61 homoloji gösterdiği bildirilmiştir (Markosian ve ark., 2000).

Bacillus caldotenax*, *Bacillus caldovelox*, *Bacillus caldoliyticus

86⁰C sıcaklık ve pH 8,2 de izole edilen bu bakteriler Gr(-), sporsuz termofillerle beraber bulunur, 70-75⁰C' de optimum büyüyüp, 80⁰C'de sadece pirüvatı kullanabilirler ve Brain Heart İnfusion ilavesi yapılmazsa bazal besi ortamında büyüme gösteremezler. Bu üç tür de farklı sıcaklıklarda, farklı hücre duvarı, farklı membran yapıları ve farklı spor oluşumu ile ayrılabilir, son derece termofilik olduklarından düşük sıcaklıkta aktif olmadıkları bildirilmektedir (Sharp ve ark., 1991).

Bacillus caustophilus

Pastörize süttten izole edilen bu türün, toplu iğne başı büyüklüğünde koloniler oluşturduğu 37⁰C’de 2-3 haftada büyüebildiği, optimum 60-65⁰C, maksimum 75⁰C’de yaşadığı saptanmış, *B. caldotenax*, *B. caldolyticus*’a yakın akraba olduğu bildirilmiştir (Nazina ve ark., 2001).

Bacillus thermocatenulatus

Termal kaynaklardan izole edilen bu tür, sarımsı koloniler oluşturan anaerobik bakteridir. G+C oranı % 69 dur ve bu oran termofiller içinde şimdiye kadar tanımlanmış en yüksek orandır (Nazina ve ark., 2001; Sharp ve ark., 1991).

Bacillus thermodenitrificans

B. stearothermophilus’dan morfolojik ve fizyolojik olarak fark gösteren bu tür ilk önce *Denitrobacterium thermophilum* olarak tanımlanmış, daha sonra yeniden adlandırıldığı bildirilmiştir (Takao ve ark., 2002).

Bacillus thermoruber

Gr(+), hareketli tek yada koloniler oluşturan bu bakteri, terminal yada subterminal oval sporlar ve katı besi yerinde kırmızı, yuvarlak, düzgün kenarlı, müsilajlı koloniler oluşturur, sıcaklık limiti 58⁰C’dir, G+C oranı % 57 olarak saptanmıştır (Kristjonsson ve Stetter 1991).

Bacillus flavothermus

Kirli sarı koloniler oluşturan bu bakteri *B. coagulansa* benzer gibi görünür, 30-70⁰C’de gelişebilir, kompleks besi ortamında anaerobik büyür ve G+C oranı % 61’dir (Beldüz ve ark., 2003).

Çizelge 1.2 Gr(+) Termofilik Basillerin Biyokimyasal Özellikleri +:Pozitif , -: Negatif, W: zayıf üreme

| | <i>B. stearothermophilus</i> | <i>B.thermoglucosidasius</i> | <i>B.paltidus</i> | <i>B. thermocloaceae</i> | <i>B. thermoleovarans</i> | <i>B.caldotenax</i> | <i>B.caldovelox</i> | <i>B. caldolyticus</i> | <i>B.caustophilus</i> | <i>B.thermocatenulatus</i> | <i>B.thermodenitrificans</i> | <i>B. thermoruber</i> | <i>B.flavothermus</i> |
|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Hareket | | + | + | | - | | | | | + | | | + |
| °C min. | 45 | 42 | 30 | 37 | 54 | | | | | 35 | 37-45 | 34 | 30 |
| °C opt. | 50 | 61-63 | 60-65 | 55 | 55-65 | | | | | 55-70 | | 45-48 | 65 |
| °C max | 76 | 67-69 | 70 | 70 | 70 | | | | | 78 | 70-72 | 58 | 70 |
| %3 NaCl | + | - | + | + | | + | - | - | - | + | + | - | - |
| %5 NaCl | - | - | + | w | | | | | - | - | + | - | |
| %7 NaCl | - | - | + | - | | | | | | | | | |
| %10 NaCl | - | - | + | - | - | | | | | | | | |
| PH | | 7,3-8,7 | 8,0-9,0 | 8-9 | 6,2-7,5 | | | | | | | | 5,5-9,0 |
| MR | - | w | | | | | | w | - | - | - | | |
| Acetoin | - | - | - | - | | - | - | | - | - | - | - | + |
| Katalaz | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - | + | - | + |
| Oksidaz | - | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | - | + |
| İndol | - | - | - | - | | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Nişasta | + | + | w | - | +a | R | R | + | + | - | + | + | + |
| Kazein | W | + | - | - | +a | + | + | + | + | + | - | + | |
| Jelatin | + | - | - | - | | + | + | + | + | - | - | + | - |
| Tribitryn | | | + | - | | | | | | | + | | |
| Aesculin | - | + | d | - | | | | | - | - | | | |
| Üre | | + | | | | | | | | | | + | - |
| Sitrat | - | +/- | - | | | + | + | + | + | + | - | - | - |
| NO ₃ -NO ₂ | + | + | - | - | | + | + | + | + | + | - | - | - |
| NO ₃ .N ₂ | - | - | - | - | | - | - | - | - | + | + | - | - |
| H ₂ S | | + | | | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Na NO ₃ | - | - | | | | - | - | - | - | + | - | + | - |
| Büy. | | | | | | | | | | | | | |
| Anaerob. | + | | - | - | | w | w | w | w | + | + | | + |
| Büy. | | | | | | | | | | | | | |
| Asit Ürt. | | | | | | | | | | | | | |
| Glikoz | + | + | + | - | +a | + | + | + | w | + | + | + | + |
| Fruktoz | + | + | + | - | +a | + | w | w | + | + | + | + | + |
| Sakkaroz | + | + | + | - | +a | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Maltoz | + | + | d | - | +a | + | + | w | w | + | + | + | + |
| Trehaloz | + | + | - | - | +a | - | + | + | w | + | + | + | + |
| Rhamnoz | - | + | - | - | +a | - | - | - | - | - | +/- | | + |
| Laktoz | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - | | |
| Cellobioz | | + | - | - | +a | | | | | + | | | |
| Galaktoz | W | - | - | - | +a | - | - | - | - | + | - | + | |
| Arabinoz | - | - | - | - | | - | - | - | - | - | - | + | w |
| Mannoz | + | + | - | - | | + | + | + | w | w | - | + | + |
| Riboz | | | - | - | +a | | | | | | + | + | |
| Ksiloz | - | - | - | - | | - | - | - | + | - | | + | |
| Dekstrin | + | + | | | | + | + | + | + | + | w | | |
| Gliserol | + | + | | | | + | + | w | - | + | w | + | |
| Salisin | - | + | | | | - | - | - | w | w | - | | |
| Adonitol | - | - | | | | - | - | - | - | - | - | | |
| Mannitol | - | + | | | +a | w | + | w | - | + | + | + | |
| Dulsitol | - | - | | | | - | - | - | - | - | - | | |
| Erithritol | - | - | | | | - | - | - | - | - | - | | |
| Glikojen | + | - | | | | - | - | + | - | - | - | | |
| Sorbitol | - | + | | | | - | - | - | - | - | - | | + |
| Rafinoz | + | | | | | w | w | - | - | - | + | | |
| Nişasta | + | + | | | | - | - | + | w | - | + | | |
| İnositol | | - | | | | - | - | - | - | - | | + | |
| İnulin | - | - | | | | - | - | - | - | - | - | | |

(Sharp ve ark., 1991)

Bacillus coagulans* ve *Bacillus smithi

B. coagulans süt ve karbonhidratlı besinlerden izole edilip, PH 4,5’de ve 65⁰C’de gelişme gösterebilir, G+C oranı % 41-55’dir. *B. smithi* peynirden izole edilmiştir, 25-60⁰C’de pH 5,7’de büyür, % 3NaCl de gelişmediği saptanmıştır (Çizelge 1.2) (Sharp ve ark., 1991).

Bacillus ascidocaldarius

Asit topraklar, havuzlar ve jeotermal kaynaklardan izole edilebilen bu tür, 45-70⁰C’de pH 2-6 aralığında gelişir, terminal yada subterminal spor oluşturur. G+C oranı % 62,2 olarak saptanmıştır (Kristjonsson ve Stetter 1991).

Bacillus acidoterrestris* ve *Bacillus cycloheptanicus

% G+C oranı *B. acidoterrestris* için 51-53 *B. cycloheptanicus* için 54-57’dir. Karbon kaynaklarını kullanımı, tuzluluk toleransı ve pH aralığın *B. ascidocaldarius*’ a benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Kristjonsson ve Stetter 1991).

Beslenme ve Büyüme

Heteretrofik, termofilik *Bacillus* türlerinin hepsinin nutrient agar ve tripton soya agar üzerinde heterotrofik olarak büyüdüğü bildirilmektedir. *Bacillus* türlerinin büyüme gereksinimleri üzerine yapılan bir çalışmada, *Bacillus stearothermophilus* kullanılmış ve karbon kaynağı olarak glikoz yada sakkaroz’a ihtiyaç duyduğu, tiamin, biotin, nikotinik asit, arjinin, histidin ve izolösinin ise büyümeyi arttırdığı bildirilmiştir. Atmış sekiz termofilik basil üzerinde yapılan çalışmada da termofilik basillerin vitamin ve kofaktörlere ihtiyaç gösterdiği saptanmıştır. *B. coagulans*’ın 26 suşu üzerinde yapılan bir çalışmada metionin ve glutamik asit için oksotrofik olduğu tespit edilmiştir (Sneath 1984; Kristjonsson ve Stetter 1991).

Termofilik *Bacillus* türlerinin karbonhidrat, şeker, alkol, organik asitler, polisakaritler, protein ve protein hidrolizatlarını ve lipitleri büyüme için kaynak olarak kullandıkları saptanmış, izole edilen suşların alkoller, metanol, etanol, ksilol, fenol, ve kresol'ü hidrolize ettikleri ve bunun sınıflandırmada kullanıldığı bildirilmiştir (Sharp ve ark., 1991; Edwards 1990).

Çizelge 1.3. Gr(+) Basiller İçin Yağ Asidi Özellikleri

| | <i>B.thermodenitrificans</i> 466 | <i>B.thermoleovarans</i> I 55366 ^T | <i>B.thermocatenulatus</i> BI259 | <i>B.stearothermophilus</i> | <i>B.caldotenax</i> DSM406 | <i>B.caldovelox</i> DSM411 | <i>B.caldolyticus</i> DSM 405 | <i>B.thermoglucoasidarius</i> | <i>B.licheniformis</i> | <i>B.smithi</i> DSM 459 | <i>B.thermosphaerictus</i> PI1 ^T | <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> DSM 10154 ^T |
|-----------|----------------------------------|---|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------|---|---|
| 10:0 | | 2,7 | | | | | | | | | | |
| a13:0 | | | | 5,1 | | | | | | | | |
| i14:0 | 0,4 | 1,0 | 1,3 | 0,1 | | | | | 0,5 | | | 0,2 |
| 14:0 | 1,8 | 1,4 | 0,6 | 1,5 | | | | 0,6 | | | | 0,2 |
| i15:0 | 33,6 | 22,6 | 25,5 | 39,8 | 29,8 | 27,0 | 22,0 | 22,0 | 38,0 | 190 | 130 | 543 |
| a15:0 | 1,8 | 1,3 | 0,6 | 6,4 | 2,0 | 1,0 | 1,0 | 1,6 | 30,4 | 12,0 | | 0,6 |
| 15:0 | 2,3 | 2,1 | 1,3 | 0,5 | 3,0 | 2,0 | 1,0 | | | 6,0 | 3,0 | 0,6 |
| i16:0 | 9,5 | 21,6 | 31,8 | 6,2 | 31,0 | 26,0 | 37,0 | 10,4 | 2,0 | 8,0 | 61,0 | 2,3 |
| 16:0 | 11,0 | 11,2 | 3,0 | 9,2 | 3,0 | 3,0 | 5,0 | 11,6 | 2,0 | 13,0 | 6,0 | 3,5 |
| i17:0 | 26,6 | 18,5 | 21,0 | 7,1 | 21,0 | 27,0 | 22,0 | 30,3 | 10,0 | 42,0 | 11,0 | 32,8 |
| a17:0 | 7,3 | 4,6 | 3,1 | 13,3 | 7,0 | 11,0 | 8,0 | 16,6 | 10,2 | | 1,0 | 0,8 |
| 17:0 | 2,9 | 1,3 | 2,3 | | 2,0 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | | | 1,0 | 0,2 |
| i18:0 | 0,2 | 0,9 | 1,3 | | 1,0 | | 2,0 | | | | 1,0 | |
| 18:1 | 1,3 | 1,2 | 0,7 | | | | | | | | | |
| 18:0 | 1,3 | 3,4 | 2,2 | | | | | 0,5 | | | | 0,3 |
| UN.St.C16 | | 6,6 | | | | | | | 1,7 | | 3,0 | |
| Diğer | | 0,2 | | 0,8 | 1,,0 | 2,0 | 1,0 | 5,6 | 5,2 | | | 4,2 |
| Toplam | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

(Nazina ve ark., 2001)

Gr (+) Termofilik basillerde enzimler

Termofilik basiller proteinlerinin sıcaklığa dirençli olması nedeni ile pek çok çalışmada model olarak kullanılmışlardır. Millitzer *B. subtilis* ve zorunlu termofil olan bir *Bacillus*'tan izole edilen malat dehidrojenaz enziminin termal stabilliğini araştırmıştır. Termofillerden izole edilen enzim 65⁰C'de 120 dakika stabil kalırken, *B. subtilis* enzimi hızla bozulmaya uğramıştır.

Bir başka çalışmada da *B. stearothermophilus* ve *B. cereus*'dan izole edilen 11 enzim karşılaştırılmış, enzimlerin 9 tanesinin *B. cereus* enzimlerinden daha stabil olduğu buna rağmen, piruvat kinaz, glutamat, oxaloasetat transaminaz'ın mezofiller ile benzer sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir (Kristjonsson ve Stetter 1991).

Enzimler normalde termal şartlara dirençli değildir, mikroorganizma büyürken membran, kofaktörler yada hücre bütünü tarafından oluşturulan şartlarla stabilize olabilir. Bu konuda yapılmış bir çalışmada *B. stearothermophilus*'tan izole edilen alkalın fosfataz enziminin hücreden ayrıldığında sabit kalamadığı, bu stabilliği hücre membranı enzimlerinin verdiği, başka bir araştırma da glutamin sentetaz enziminin substrat ve metal iyonlarına bağlanması ile dayanıklılık kazandığı bildirilmiştir (Sharp et. all., 1992; Collacine ve Crichton 1997).

Gr (+) Termofilik basillerdeki bakteriyofajlar

Termofilleri enfekte edebilen bakteriyofajların varlığı ilk olarak 1926'da Koser tarafından tanımlanmıştır. Kompost, toprak, balçık ve çürümüş samandan izole edilen 24 farklı bakteriyofaj tanımlanmış bu fajların geniş bir konukçu grubunu enfekte edebildiği bildirilmiştir. JS013 ve JS026 gibi bazı fajların ise konukçusuna özel olduğu bildirilmiş, fajların çoğunun 50 ⁰C'de 4-5 saat stabil kaldığı gözlenirken, 70 ⁰C'de 2 saatten sonra yaşayabilme yeteneklerini önemli ölçüde kaybettikleri saptanmıştır (Kristjonsson ve Stetter 1991).

Gr (+) Termofilik basillerde bakteriosinler

Termofilik basillerin de bakteriosin ürettikleri bildirilmiştir. Moleküler ağırlığı 13.500, yarılanma ömrü 75⁰C'de 80 dakika optimum pH 7.0 olan bakteriosin 93 Sharp ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bakteriosin 93'ün termofillerde çok aktif olmasına karşın mezofillerde etkili olmadığı bildirilmiştir (Sharp et. all., 1991).

1.2.1.3. Termofilik gram negatif basiller

Da Costa ve Rainey'in bildirdiğine göre, *Thermaceae* familyası içinde yer olan bu iki cinsin üyelerine ait bütün suşların Gr(-) çubuk şeklinde filamentli, hareketsiz, endospor oluşturmeyen, pek çoğunun sarı yada kırmızı pigment oluşturduğu, bazı suşların ise şeffaf olduğu, zorunlu aerobik olmalarına rağmen bazı suşların nitrat ve nitriti elektron alıcısı olarak kullanarak anaerobik büyüme gösterdikleri, tümünün oksidaz pozitif olduğu, 50-70⁰C'de optimum büyüme gösterdikleri, menaquinon 8 in dominant olduğu, *Thermus* ve *Meiothermus* olarak iki cinse ayrıldığı bildirilmiştir (Da Costa ve Rainey 2001).

İnkübasyon Şartları

Yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlara göre, *T. aquaticus* YT-1 optimum 70⁰C, maksimum 79⁰C, minimum 40⁰C'de gelişme gösterir ve pek çok suş da *T. aquaticus* gibi gelişir. *T. filiformis*, optimum 73⁰C, maksimum 80⁰C, minimum 37⁰C'de, *T. thermophilus*, optimum 65-72⁰C, maksimum 85⁰C, minimum 47⁰C'de, *Meiothermus ruber*, optimum 60⁰C, maksimum 70⁰C, minimum 35-40⁰C'de, *M. cerberus* optimum 55⁰C'de *M. cliophilus* optimum 50⁰C'de, *M. silvanus* optimum 55⁰C'de gelişir (Williams ve Da Costa 1994;).

1.2.1.4. *Thermus* cinsi

Karakteristik özellikleri

Thermus cinsi bakteriler pek çok doğal ve yapay kaynakta bulunabilirler. İlk izole edilen *Thermus aquaticus* Ulusal Yellow Stone Parkından nötr ve alkali sıcak sulardan izole edilmiş, daha sonra yapılan çalışmalarda ise, Yellow Stone Parkı ve diğer karasal suların yanı sıra deniz dibindeki termal çukurlardan da izole edildikleri bildirilmiştir (Williams and Da Costa 1994).

Williams ve Sharp'ın bildirdiğine göre ise, *Thermus* cinsine ait bakteriler gram negatif, 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 büyüeyebilen bakterilerdir. % 0,1 tripton, % 2,5-3 yeast extract ve düşük mineral tuzlarının bulunduğu besi ortamları gelişmeleri için yeterlidir. Bu grup bakteriler için özel bir zenginleştirme ortamı yoktur, uygun mineral tuzlarını içeren minimal organik ortamlarda gelişebilirler. *Thermus* suşları seçici olarak besi ortamı 162 de ve *Thermus* besi ortamında, çalkalamalı ortamda gelişirler. İlk yapılan çalışmalarda Japon bilim adamları bu bakterileri *Flavobacterium thermophilum* grubuna dahil etmişler daha sonraki çalışmalar sonucunda ise *Thermus* ismi verilmiştir (Williams ve Sharp 1995).

Sınıflandırma

Thermus aquaticus

Çubuk şeklinde 0.5-0.8µm çaplı, kısa filamentli, 70°C'de 48 saat inkübasyon sonucunda 1 mm çapında parlak sarı koloniler oluşturan, kazein, jelatin ve nişastayı hidroliz edebilen, laktoz ve melibiozu kullanamayan, nitrat ve nitrit indirgemesi yapamayan *T. aquaticus* türünün tamamında, 3-OH yağ asidi bulunduğu, % G+C oranının 60-64 arasında olduğu bildirilmiştir (Çizelge 1.4, 1.5, 1.6) (Da Costa ve ark., 2001).

Thermus brockianus

Çubuk şeklinde, kısa filamentlere sahip, soluk sarı koloniler oluşturan, kazeini hidrolize edemeyen bu türün yalnızca birkaçının nişasta ve jelatini kullanabildiği nitrat ve nitrit indirgenmesi yapabildiği, laktoz, trehaloz ve melibiozu karbon kaynağı olarak kullandığı (Çizelge 1.4, 1.5, 1.6), 3-OH yağ asidi bulundurmadığı ve % G+C oranının 63 olduğu bildirilmiştir (Williams ve ark., 1995).

Thermus filiformis

Parlak sarı koloniler oluşturan *T. filiformis*, sabit filamentli çubuk şeklinde yapıya sahiptir, tip suşu Wai33 yüksek oranda anteiso ve anteiso 3-OH yağ asidi içerirken, diğer suşlarda anteiso 3-OH yağ asidinin düşük oranda, 3-OH yağ asidinin hiç olmadığı, % G+C oranının ise 65 olduğu bildirilmiştir (Georganta ve ark., 1993; Da Costa ve ark., 2001).

Thermus oshimai

Çubuk şeklindeki hücreler kısa filamentlere sahiptir. Soluk sarı yada renksiz koloniler oluşturan *T. oshimai* kazein ve fibrini indirgeyebilir, sakkaroz, maltoz, laktoz ve trehalozu karbon kaynağı olarak kullanır, α ve β -galaktozidaz enzimlerine sahiptir, % G+C oranı 63 tür (Da Costa ve ark., 2001).

Thermus scodoductus

Flamentli hücrelere sahip olan *T. scodoductus*, 0,5x1,5 μ m boyutlarında, 65-70⁰C'de büyüyebilir ve renk oluşturmaz, ancak yaşlı kültürler koyu renkte pigment oluşturur. % G+C oranı 65'dir (Çizelge 1.4, 1.5, 1.6) (Chung ve ark., 2000; Da Costa ve ark., 2001).

Çizelge1.4 *Thermus* cinsine ait yağ asidi analizleri

| | <i>T.aquaticus</i> YT-1 | <i>T.ignitrrae</i> RF-4 ^T | <i>T.antranikianii</i> HN3-7 ^T | <i>T.brockianus</i> Ys38 | <i>T.filiformis</i> Wai33 AI | <i>T.oshimai</i> SPS-17 | <i>T.scodoductus</i> SE-1 | <i>T.thermophilus</i> HB8 |
|-------------------|----------------------------|--------------------------------------|--|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 14:0 iso | 0,9 | - | - | 1,6 | 0,9 | 0,5 | - | 0,8 |
| 15:0 iso | 17,6 | 50,7 | 10,8 | 33,5 | 4,1 | 37,7 | 15,8 | 32,4 |
| 15:0 anteiso | 1,9 | 2,9 | 1,7 | 3,1 | 18,9 | 3,8 | 16,1 | 4,7 |
| 15:0 | - | 1,3 | 1,9 | 0,6 | - | 3,7 | 1,1 | - |
| 16:0 iso | 13,0 | 1,0 | 9,6 | 12,1 | 8,4 | 3,1 | 3,8 | 5,8 |
| 16:0 | 16,3 | 9,0 | 11,9 | 9,2 | 3,5 | 2,7 | 8,0 | 8,0 |
| UN ^b | - | - | - | - | 2,9 | - | 2,5 | - |
| 15:0 iso 3-OH | 3,2 | - | - | - | 0,6 | - | - | - |
| 15:0 anteiso 3-OH | - | - | - | - | 1,1 | - | - | - |
| 17:0 iso | 2,7 | 1,9 | 6,2 | 3,3 | 36,7 | 3,7 | 25,8 | 5,7 |
| 17:0 anteiso | - | - | 3,1 | - | - | 2,1 | 1,2 | - |
| 17:0 | 2,4 | - | - | - | 0,9 | - | - | - |
| 16:0 iso 3-OH | 2,5 | - | - | - | - | - | - | - |
| 16:0 3-OH | 0,6 | - | 1,4 | 0,5 | 0,9 | - | - | - |
| 18:0 iso | 0,9 | - | - | - | - | - | - | - |
| 18:0 | 7,6 | - | - | - | 2,4 | - | - | - |
| 17:0 iso 3-OH | 0,7 | - | - | - | 8,8 | - | - | - |

(Chung ve ark., 2000).

Thermus thermophilus

Kısa filamentlere sahip çubuk şekilli hücreler, *Thermus* besi yerinde parlak sarı koloniler oluştururlar. Bütün suşlar % 3 NaCl içeren *Thermus* besi ortamında ve 80-82⁰C sıcaklıkta büyüme gösterebilir. Bu tür, içinde halotolerant suşları da barındırır, % G+C oranının ise % 65 olduğu bildirilmiştir (Da Costa ve ark., 2001).

Çizelge:1.5 *Thermus* ve akraba türlerin karakteristikleri (Opt: Optimum, Mak: Maksimum, Min: Minimum, +: Pozitif sonuç, -: Negatif sonuç, ND: Veri yok)

| Tür ve tip Suş | % G+C | Ornitin Peptidoglukan | Menaquinon | Büyüme sıcaklığı °C | | |
|---|-------|--------------------------|------------|---------------------|------|------|
| | | | | Opt. | Mak. | Min. |
| <i>T.aquaticus</i> YT1 | 67 | + | + | 70 | 79 | 40 |
| ATCC 25106 | 65 | | | | | |
| DSM 625 | 64 | | | | | |
| <i>T.ruber</i> BKMB1258 (<i>Meiothermus Ruber</i>) | 66 | + | + | 60 | 70 | 37 |
| NCIMB 11269 | 62 | | | | | |
| DSM 1279 | 61 | | | | | |
| <i>T.thermophilus</i> HB8 | 62 | + | + | 73 | 85 | 40 |
| DSM625 | 64 | | | | | |
| ATCC2762 | 69 | | | | | |
| NCIMB 11244 | 62 | | | | | |
| <i>T.filiiformis</i> Wai 33AI ATCC 43280 | 65 | ND | + | 73 | 80 | 37 |
| <i>T.brockianus</i> Ys-36 NCIMB | 60 | + | + | 70 | ND | ND |
| <i>RhodoThermus marinus</i> ATCC43812 | 64 | ND | ND | 70 | 77 | 54 |
| DSM 4252 | 65 | | | | | |

(Williams ve Da Costa 1994).

1.2.1.5. *Meiothermus* cinsinin

Karakteristik Özellikleri

Meiothermus ruber orijinal suşu 1984'te termal kaynaklardan alınan sıcak su örneklerinden, potato-yest-extract-pepton besi ortamında, 1986 yılında yapılan başka bir çalışmada ise, maya fabrikasından alınan atık su örneklerinden üretilmiş, diğer *Meiothermus* izolatları ise *Thermus* besi ortamında geliştirilerek izolasyonları yapılmıştır. *Meiothermus* türleri *Thermus* besi ortamında ve Dgreyse besi yeri 162 katı besi ortamı üzerinde kolayca büyüebilmektedir. *M. ruber*, sıvı *Thermus* besi ortamı üzerinde 60°C'de 2-3 gün ön zenginleştirmeden sonra, katı besi ortamında kırmızı pembe koloniler oluşturur. *Meiothermus* cinsinin ilk suşu Loginova ve Egorova tarafından Kamckhatka Peninsula'dan 1975 yılında izole edilmiş ve *Thermus ruber* olarak isimlendirilmiş fakat, bu tür Approved List of Bacteria Names içinde yer almamıştır. İsim daha sonra 1984 yılında orijinal olarak yayınlanmış ve *Thermus* cinsi içine dahil edilmiştir.

Çizelge 1.6. Thermus cinsinin biyokimyasal özellikleri (+: Pozitif, -: Negatif, ND: Veri yok)

| Karakteristikler | <i>T.aquaticus</i> YT-1 | <i>T.brockianus</i> Ys38 | <i>T.filiformis</i> Wai33A1 | <i>T.oshimai</i> SPS17 | <i>T.scodotus</i> SE-1 | <i>T.igniterrae</i> HN1-8 | <i>T.antraenikiana</i> HN2-7 |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Pigmentasyon | Koyu sarı | Açık sarı | Koyu sarı | Açık sarı | Renksiz | Sarı | Sarı |
| Koloni öz. | Kompak | Yaygın | Kompak | Kompak | Kompak | ND | ND |
| Opt. Sıcaklık | 70 | 70 | 70 | 70 | 65-70 | | |
| 80°C'de Büyüme | - | - | - | - | - | - | - |
| %1NaCl | + | ND | - | - | - | - | + |
| %3NaCl | - | - | - | - | - | - | - |
| NO ₃ anaer büy. | - | + | - | + | + | ND | ND |
| Oksidaz | + | + | + | + | + | ND | ND |
| Katalaz | + | + | + | + | + | ND | ND |
| DNaz | + | ND | - | - | ND | ND | ND |
| α-galaktozidaz | + | + | + | + | ND | - | + |
| β-galaktozidaz | - | + | + | + | ND | + | + |
| Elastin | + | ND | - | + | ND | + | - |
| Fibrin | + | ND | - | + | ND | + | + |
| Kazein | + | - | - | + | ND | + | + |
| Jelatin | + | - | + | + | - | + | + |
| Nişasta | + | - | - | - | - | + | + |
| Arbutin | - | + | + | + | ND | + | + |
| Eskulin | - | + | + | + | ND | + | W |
| D-Glikoz | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Fruktoz | + | + | + | + | + | + | + |
| L-Rahamnoz | - | ND | - | - | ND | ND | ND |
| L-Arabinoz | - | ND | - | - | ND | ND | ND |
| D-Ksiloz | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Galaktoz | + | + | + | + | ND | - | + |
| D-Mannoz | + | ND | - | + | ND | ND | ND |
| D-Sellobioz | + | - | - | - | ND | - | + |
| Laktoz | + | + | + | + | ND | - | - |
| Sakkaroz | + | + | + | + | ND | - | - |
| D-Trehaloz | + | + | + | + | ND | - | - |
| D-Melibioz | + | + | + | + | ND | - | - |
| D-Rafinoz | + | + | + | + | ND | - | - |
| Dekstrin | - | ND | - | - | ND | ND | ND |
| Salisin | - | ND | + | + | ND | ND | ND |
| D-mannitol | - | ND | + | + | ND | ND | ND |
| D-sorbitol | - | ND | - | - | ND | ND | ND |
| myo-inositol | - | ND | - | - | ND | - | - |
| Gliserol | - | ND | - | - | + | - | - |
| Pirüvat | + | + | + | + | + | ND | ND |
| Asetat | + | ND | + | + | - | ND | ND |
| Sitrat | - | ND | - | - | ND | - | W |
| Laktat | - | ND | - | - | ND | ND | ND |
| Malat | + | ND | + | + | ND | - | + |
| Süksinat | + | ND | + | + | - | ND | ND |
| Arjinin | + | ND | + | + | ND | - | + |
| Pirolin | + | + | + | + | + | ND | ND |
| Ornitin | + | ND | + | + | ND | ND | ND |
| Serin | + | ND | - | - | ND | - | + |
| Asetamid | - | ND | - | - | ND | ND | ND |
| %GC | 64 | 63 | 65 | 63 | 65 | | |

(Da Costa ve ark., 2001).

Bu grubun diğer üyelerinin izolasyonundan sonra, düşük sıcaklıkta üremeleri, DNA-DNA homolojileri ve 2-OH yağ asidi seviyeleri dikkate alınarak 1996 yılında Nobre ve arkadaşlarının çalışmaları ile *Meiothermus* olarak

isimlendirilmeleri teklif edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, *M. ruber*, *M. silvanus*, *M. cerberus*, *M. chliarophilus* türlerinin temel biyokimyasal ve fizyolojik karakteristiklerine göre kolayca ayrılabilirdikleri bildirilmiştir (Saharp ve Williams., 1988; Ferreira ve ark., 1999; Da Costa ve ark., 2001).

Sınıflandırma

Meiothermus ruber

Uzunlukları değişken olan hücrelerin çapları 0,5-0,8 µm dir. Koloniler, 1-2 mm çapında ve koyu kırmızı yada pembe renklidir. Bu tür katalaz pozitif özelliği, yüksek büyüme sıcaklığı ve yağ asidi dizilişi ile bu cinsin diğer türlerinden ayrılır, süksinat, malat ve myo-inositol'ü kullanır, % G+C oranı ise, 61-66 olarak bildirilmiştir (Chen ve ark., 2002; Da Costa ve ark., 2001).

Meiothermus cerberus

Bu tür üyeleri kırmızı-turuncu renkli koloniler oluşturur, katalaz negatif, sistein, tiosulfat ve tioglikonat gibi bileşikleri indirgeyen, *Thermus* besi ortamı yada besi yeri 162'de üreme gösterir, pirüvat, glutamat ve pirolini kullanabilirler, 3-OH yağ asitlerinin oranı, 2-OH yağ asitlerinden daha yüksektir, % G+C oranının 60,9 olduğu bildirilmiştir (Çizelge 1.7., 1.8.) (Chung ve ark., 1997; Da Costa ve ark., 2001).

Meiothermus chliarophilus

Hücre ve koloni özellikleri diğer türlerdeki gibi olan bu tür, parlak sarı koloni oluşturan, katalaz negatif, düşük sıcaklıktaki sularda üreme gösterir, 69,9 % G+C oranına sahiptir (Tenreiro ve ark., 1995; Da Costa ve ark., 2001).

Meiothermus silvanus

İzlanda ve Portekiz sıcak sularından izole edilen bu tür, yaklaşık 55⁰C'de gelişen, kırmızı koloni oluşturan, katalaz ve α -glikosidaz negatiftir, pirolini hidroliz edemez ve 2-OH anteiso yağ asidi oranı diğer türlerdekinden daha fazladır. Bu türün glikolipitleri uzun zincirli 1-2 diol ve gliserolipidlerin karışımından oluşur, % G+C oranının ise 63,6 olduğu bildirilmiştir (Çizelge 1.7., 1.8.) (Tenreiro ve ark., 1995; Da Costa ve ark., 2001).

Meiothermus rosaceus

Chen ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise pembemsi kırmızı pigment oluşturan Gr(-) 40-70⁰C'de üreme gösteren, geniş hücresel özellik gösteren, sakkaroz ve maltozu kullanamayan, nişasta ve jelatini hidroliz edemeyen, % G+C oranı 66,4 olan *M. rosaceus*'un Yuan China sıcak su kaynaklarında izole edildiği ve yeni tür olarak önerildiği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2002).

Meiothermus taiwanensis

Taiwan sıcak su kaynaklarında izole edilen bu türün, aerobik spor oluşturmayan, kırmızı pigment oluşturan. 40-70⁰C'de gelişme gösteren heterotrofik uzun filamentli, farklı genişliklere sahip olduğu tespit edilmiş ve yeni tür olarak önerildiği bildirilmiştir (Çizelge 1.7., 1.8.) (Chen ve ark., 2002).

Çizelge 1.7 *Meiothermus* türlerinin biyokimyasal özellikleri (+: Pozitif, -: Negatif, ND: Veri yok)

| | <i>Me. rosaceus</i> RH9901 ^T | <i>Me. ruber</i> DSM1279 ^T | <i>Me. silvanus</i> DSM9946 ^T | <i>Me. chliarop</i> <i>hitus</i> DSM9947 ^T | <i>Me. cerberus</i> DSM11376 | <i>Me. timidus</i> |
|-------------------------|--|--|---|---|---------------------------------|--------------------|
| Büyüklik(µboy/genişlik) | 0,5-0,8x5-10 | 0.5-0,8x3-6 | 0.5-0,8 | 0,5-0,8 | 0.5-0,8 | ND |
| Koloni rengi | Pmb-Krm. | A. Krm. | Trn-Krm. | Sarı | Krm.-Trn. | Sarı |
| Spct. da absorpsiyon | 446,482,520 | 452,474,496 | ND | ND | ND | ND |
| Koloni büyüklüğü(mm) | 2-4 | ND | 0,5-1,2 | 0,8-1,2 | 1-2 | ND |
| Yuvarlak uç | + | + | ND | ND | ND | ND |
| Halka görünüm | + | ND | ND | ND | ND | ND |
| Kahverengi görünüm | + | ND | ND | ND | ND | ND |
| Jelatin hidrolizi | - | + | + | + | + | ND |
| Nişasta hidrolizi | - | - | - | + | - | + |
| Fibrin hidrolizi | ND | + | - | + | + | ND |
| Elastin hidrolizi | ND | + | + | + | + | + |
| Casein hidrolizi | ND | + | + | + | + | + |
| Nitrat indirgenmesi | - | - | + | + | - | + |
| Katalaz | + | + | - | - | - | + |
| Oksidaz | + | + | + | + | + | + |
| DNaz | ND | + | + | + | + | ND |
| A-galaktozidaz | ND | + | - | + | + | ND |
| B-galaktozidaz | ND | + | + | + | + | ND |
| Min.pH | 4.5 | ND | 5 | 5 | 5 | ND |
| Opt.pH | 8.5 | ND | 8 | 8 | 7.5 | 8.3 |
| Max.pH | 10 | ND | 10 | 10 | 10.5 | ND |
| Min.°C | 40 | 35-40 | 40 | 40 | 35 | ND |
| Opt. °C | 55 | 60 | 55 | 50 | 55 | 55-60 |
| Max. °C | 70 | 70 | 65 | 60 | 60 | ND |
| Sakkaroz | - | + | - | + | + | + |
| Maltoz | - | + | + | + | + | + |
| Asetat | + | - | - | - | ND | + |
| Mannitol | + | + | - | + | - | + |
| Sorbitol | + | + | + | + | - | + |
| Sitrat | - | - | - | - | - | - |
| Pirüvat | ND | - | + | + | + | + |
| % G+C | 66,4 | 61 | 63,6 | 69,9 | 60,9 | 65,1 |

(Saharp ve Williams., 1988; Ferreira ve ark., 1999; Da Costa ve ark., 2001)

Çizelge 1.8 *Meiothermus* cinsinine ait bazı türlerin yağ asidi analizleri

| | Me.ruber DSM 1279 ^f | Me.silvanus DSM 9946 ^f | Me. chliarophilus DSM 9947 ^f | Me.cerberus DSM 11376 | Me. taiwanensis | Me. timidus SPS 243 |
|------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|--------------------------|--------------------|------------------------|
| 13:0 Iso | 0,6 | 0,8 | 1,5 | 1,4 | 0,7 | 1,3 |
| 14:Iso | 0,7 | 0,7 | 1,7 | 2,7 | 0,7 | ND |
| 14:0 | 0,6 | 0,3 | 0,7 | - | - | - |
| 13:0 Iso 30H | 0,4 | 0,8 | - | - | 1,1 | 0,5 |
| 15:1 Iso ω9c | 2,7 | - | - | 3,8 | 0,3 | - |
| 15:0 Iso | 33,0 | 25,6 | 42,1 | 34,6 | 38,4 | 46,5 |
| 15:0 Anteiso | 5,5 | 26,5 | 8,1 | 11,1 | 2,9 | 3,0 |
| 15:0 | 1,8 | 0,4 | 2,1 | 1,6 | 2,0 | 0,5 |
| 16:1 Alcohol | 0,8 | - | - | 1,9 | - | - |
| 16:0 Iso | 2,9 | 1,5 | 2,5 | 4,0 | 2,6 | 0,8 |
| 15:0 Iso 2OH | 0,7 | 0,9 | 0,5 | - | 0,7 | 1,1 |
| 16:0 | 7,6 | 6,4 | 9,1 | 4,5 | 6,1 | 6,4 |
| UN | 1,1 | 2,5 | 0,7 | - | 0,4 | - |
| 15:0 Iso 3OH | - | - | 1,0 | - | - | 2,5 |
| 17:1 Iso ω9c | 6,6 | - | - | 4,8 | 1,1 | - |
| 17:1 Anteiso ω9c | 1,0 | - | - | - | - | - |
| 17:0 Iso | 13,3 | 10,0 | 16,4 | 5,8 | 17,4 | 27,6 |
| 17:0 Anteiso | 3,7 | 6,4 | 2,7 | 2,5 | 2,4 | 1,8 |
| 17:1 ω8c | 0,8 | - | - | - | - | - |
| 17:1 ω6c | 0,8 | 1,3 | 0,7 | - | 0,3 | - |
| 17:0 | 0,8 | 0,3 | 1,2 | - | 1,7 | 0,3 |
| 16:0 2OH | 0,6 | 0,5 | 0,4 | - | 1,0 | - |
| 17:0 Iso 2OH | 7,8 | 9,6 | 7,3 | 3,3 | 12,0 | 6,9 |
| 17:0 Anteiso 2OH | 0,4 | 3,0 | 0,6 | - | 0,2 | - |
| 17:0 Iso 3OH | 1,1 | - | - | 4,7 | - | 0,8 |
| 19:0 Iso | - | 2,6 | - | - | - | - |
| 19:0 Anteiso | - | 1,6 | - | - | - | - |
| 17:0 Anteiso 3OH | 0,6 | - | - | 1,4 | - | - |
| 18:0 Iso diol | - | 1,6 | - | - | 4,5 | 1,6 |

(Pires ve ark., 2005; Ferreira ve ark., 1999; Chung ve ark., 1997).

Meiothermus timidus

Sarı pigment oluşturan, 55-60°C'deki sıcaklıklarda ve pH 8.3 de optimum gelişme gösteren, katalaz ve oksidaz pozitif olan, ramnoz, ribitol ve gliserolü karbon kaynağı olarak kullanamayan *M. timidus*, Pires ve arkadaşları tarafından

Portekiz ve Azores sularından izole edilmiş, *Meiothermus* cinsi içinde yeni tür olarak yer alması önerilmiştir (Pires ve ark., 2005).

***Thermus*'ların Habitatları**

Prokaryotlar'da farklı üst sıcaklık limitleri vardır. Fotosentezde bu limit 75°C civarındadır. Yüksek sıcaklıklarda tür çeşitliliği sınırlıdır. Yeryüzünde sıcak alanlar daha çok sıcak su kaynakları tarafından oluşturulur. Sıcak su kaynakları ise iki uç noktada pH değerlerine sahip olabilir. Bunlar pH 2-4 ve pH 8-10 arasında olanlardır. Nötr pH da olan sıcak su kaynakları çok yaygın değildir. Doğal termal çevrelerde sıcaklık 30-100°C, pH 1-11 arasında farklı değerlerde değişebilir (Barros ve Deming 1995).

Thermus cinsinin birincil yayılma alanları öncelikle termal çevrelerdir. Termal çevrelerin kimyasal yapısı ile ilgili yapılmış detaylı çalışmalar bulunmamaktadır. *Thermus* cinsine ait türlerin dağılımında kimyasal yapının yanı sıra ışığın da etkisi vardır. Su sıcaklığının canlıların dağılımı üzerindeki etkisi hakkında bilgiler olmasına rağmen, kimyasal elementlerin biyolojik çevre üzerindeki etkisi hakkında yapılmış çalışmalar sınırlıdır. Nitrojen, fosfor, organik karbon, çözünmüş gazlar, sülfür miktarı canlılar üzerinde önemli etkiye sahiptir. Ayrıca bazen kaynak içi ve dışındaki konsantrasyonlar da değişmektedir. Örneğin kaynak içindeki miktar yüzeyle karşılaştırılırsa, pH düşük, sülfür yüksek oranlarda bulunabilir. Sıcak su kaynaklarının kimyasal yapısının *Thermus*'ların fenotipleri üzerinde de etkili olduğu bildirilmektedir (Alfredson ve Kristjansson 1995).

Denizin 2000 metre derininde bulunan termal kaynaklardan alınan su örnekleri ile yapılmış bir çalışmada, izole edilen *Thermus thermophilus* Gy1211 suşunun optimum 75 °C, pH 8,0, % 2 NaCl'de geliştiği, bu suş ile % 74 DNA-DNA homolojisi gösteren *T.thermophilus* HB-8'in ise bu şartlar altında zayıf büyüme gösterdiği saptanmıştır (Marteinson ve ark.,1999).

İzlanda'da sülfürce zengin nötral sıcak sularda yapılmış bir araştırmada da termofilik, fakültatif, mikсотrofik sülfür oksitleyen bakteri *Thermus scotoductus* izolasyon ve identifikasyonu yapılmış, izole edilen yeni *IT-7254* suşunun elektron vericisi olarak elementel sülfür ve tiosulfatı, elektron alıcısı olarak ta oksijen ve

nitratı kullandığı, karbon kaynağı olarak ta asetat ve diğer organik bileşiklerden yararlandığı ve yeni suşun *T.scotoductus*'a % 84 DNA:DNA homolojisi gösterdiği bildirilmiştir (Skirnisdottir ve ark., 2001).

***Thermus*'ların Besin Kaynakları**

Geçmişten günümüze kadar yapılan araştırmalardan tespit edildiğine göre, *Thermus* türleri zorunlu heteretroftur, büyümeleri için organik besin kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. Bu canlılar 70-75⁰C deki termal kaynaklarda çok yaygın olarak bulunurlar (Beffa ve ark. 1996).

Alg ve bakterilerin kaynak yüzeyinde oluşturduğu tabakanın çürümesi ile *Thermus* için organik besin maddeleri ortaya çıkar. Bu örtü izolator görevi yaptığından düşük hava sıcaklıklarında da büyüme imkanı sağlar. Ayrıca sıcak su kaynağında serbest ve bir yere bağlı olarak yaşayan heteretrofların ölmesi ve çürümeleri sonucunda açığa çıkan organik substratlar da *Thermus* tarafından kullanılır. Yine sıcak su kaynaklarında 73-75⁰C'de gelişen ve fotosentez yapan kemoototroflar da besin kaynağı teşkil ederler. Sıcak su kaynaklarının etrafında bulunan topraktan ve bitki örtüsünden kaynağa akan besin maddeleri de *Thermus* için besin kaynağı olabilir. Bu tür ortamlarda açığa çıkan besin maddelerinin *Thermus*'ların gelişebilmesini ve yayılmasını etkilediği bildirilmektedir (Alfredson ve Kristjonsson 1995).

Ayrıca jeotermal olarak ısınan tesislerden, evsel ve endüstriyel olarak ısınmış sulardan da *Thermus* izolasyonu yapılmıştır (Beffa ve ark., 1996).

Thermus türlerinin beslenme şekilleri üzerine yapılmış kapsamlı araştırmalar yoktur. Ancak çok sınırlı besin maddeleri ile büyüme gösterebilmeleri onların oligotrof olduklarını göstermektedir. *Thermus* türlerinin pH ve sıcaklık ihtiyaçları oldukça değişkendir. pH 5.1-10.5 arasında değişirken, sıcak toleransları 30-90⁰C'ler arasında değişim gösterir. *Thermus* türleri çoğunlukla obligat aerobiktir, ancak çözünmüş oksijenin düşük olduğu sulardan da izolasyon yapılmıştır, diğer taraftan, nitrat ve nitrit indirgeyen türlerin Yeni Zellanda ve Yellowstone parkından izole edildiği bildirilmiştir (Hugenholtz ve ark., 1998).

Ayrıca, düşük ve yüksek sülfid içeren çevrelerden *Thermus* izolasyonu yapılmıştır. *Thermus* türleri üzerinde yapılan tuzluluk toleransı araştırmalarına göre ise nötral, alkali ve düşük tuz konsantrasyonuna sahip alanlarda yaygın büyüme gözlemlendiği, maksimum tuz toleransının % 6 olduğu bildirilmiştir. *Rhodothermus marinus* sığ deniz suyundan izole edilmiş olmasına karşın, *T.aquaticus* YT1'in tuz oranı % 0,5 olsa bile inhibe olduğu, pek çok suşun % 1 'de büyümediği, bazı halotolerant suşların ise % 3-5 oranında büyüebildikleri saptanmıştır (Alfredson ve Kristjonsson 1995).

***Thermus*'ların Enzimleri**

Mikroorganizmalar yaşamlarını sürdürebilmek için çevresel şartlara adaptasyonlarını sağlayan çeşitli enzimlere sahiptirler. Sıcak su kaynakları üzerinde gelişen termofiller ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların çoğu yüksek sıcaklığa direnç gösteren termofil enzimlerin araştırılması üzerinedir. Son yıllarda bakteriyal kaynaklardan 2400'ün üzerinde endonükleaz enzimi tanımlanmış, bu enzimlerin 220'sinin farklı özellik gösterdiği ve bu enzimlerin özellikle *Thermus* ve *Bacillus stearothermophilus* türlerinden izole edildiği bildirilmiştir (Welch ve Williams., 1995).

Yüksek sıcaklıklara adapte olmuş *Thermus* türlerinin sahip olduğu enzimlerde, mezofillerin enzimlerine göre sıcaklığa daha dayanıklıdır. Bilinen enzimler içerisinde en yaygın olanı *T. aquaticus* dan izole edilen Taq DNA Polimerazdır (Madigan ve ark., 2000). Thermal dayanıklılığa sahip enzimler ise şunlardır; Laktat dehidrojenaz, Malat dehidrojenaz, İzositrat dehidrojenaz, 3-izopropanol dehidrojenaz, Ferrodoksin, GALP dehidrojenaz, L-alanin dehidrojenaz, NADH dehidrojenaz, NADH oksidaz, Katalaz, Superoksit dismutaz, Sitokromlar, tRNA metil transferaz, RNA polimeraz, DNA polimeraz, Proteaz, Amilaz, Glikozidaz, Pullulanaz, Alkalın fosfotaz, Ribonükleaz, Asparginaz, İnorganik fosfotaz, ATPaz, DNA endonükleaz, Anthranilat sentetaz, Enolaz, Fumaraz, Tripton sentetaz, D-Ksiloz isomeraz, Aminoasit sentetaz, CoA sentetaz, DNA ligaz (Da Costa 1995; Duffield ve Cossar 1995; Colacino ve Crichton 1997).

Enzimler üzerine yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Thermal kaynaklardan izole edilen *Thermus* cinsine ait 152 restriksiyon endonukleaz enzimi varlığı araştırılmış, 27 izolatta *TaqI* izoşizomerin varlığı ve bunlarda 6 adet suşta bulunan enzimin ise farklı olduğu saptanmıştır (Welch ve ark., 1998). Diğer bir çalışmada da farklı *Thermus* türlerinden izole edilen iki farklı *TaqI* endonukleaz, *E.coli* içine klonlanmış, saflaştırılmış ve özelliklerini belirleme çalışmaları yapılmıştır. İzole edilen *tsp321*'in sığağa daha dirençli olduğu, 90⁰C'de aktivitesini sürdürdüğü bildirilmiştir (Cao ve ark., 1998).

***Thermus*'ların Plazmitleri**

Thermus'larda plazmit yapıları ilk olarak 1978'de tanımlanmıştır. Sekiz suş üzerinde çalışma yapılmış bunlardan dört tanesinde plazmid DNA bulunmuştur. 11 restriksiyon enzimi kullanılarak *pTT1* plazmiti haritası yapılmıştır. Daha sonra yapılan benzer çalışmalar ile de *T. flavus* da *pTF62*, *T. thermophilus* da *pVV8* plazmiti izole edilmiştir. Ayrıca *T. aquaticus* dan yapılan izolasyonda da dört plazmit bulunduğu saptanmıştır (Raven 1991).

***Thermus*'ların Bakteriyofajları**

İlk olarak 1975'de *Thermus* türlerini enfekte eden bakteriyofajların olduğunu bildirmiş, yapılan farklı bir çalışmalarda da iki tabakalı agar plakları üzerinde *T. thermophilus* HB8 üzerinde çeşitli bakteriyofajlar izole edilmiştir. İzole edilen fajların *Thermus* cinsine ait, Japonya orjinli beş farklı türü daha enfekte ettiği ancak, Japonya orjinli olmayan *T. aquaticus* YT1 suşunun bu enfeksiyona direnç gösterdiği bildirilmiştir (Raven 1991).

1.2.1.6. Diğer termofilik basiller

Thermomicrobium

Zorunlu aerobik, Gr(-) ve heteretroftur. Absorbans piki 494 nm olan kırmızı karatenoit pigmenti oluşturmaktadır. İlk olarak % 0,1 yeast extract, % 0,1 tripto içeren Allen's salts besi ortamı plakları üzerinde 70°C'de 5 gün inkübasyon ile izole edilmiştir. 45-80°C ve pH 7,5-8,7 arasında gelişmektedir. Optimum büyümenin 70-75°C ve pH 8,2-8,5 arasında olduğu bildirilmiştir (Çizelge 1.9.) (Perry 1992).

Thermoleophilum

Mineral salt besi ortamında 60°C'de pH 6,5-7,5'de 1 haftada büyüme gösteren Gr(-) çubuklardır. Koloniler küçük yarı şeffaf yada beyazdır. 45-70°C ler arasında büyüme göstermektedir. 50 µg/ml Chlortetracyclin, 50 µg/ml streptomisin, 5 µg/ml kanamicin, 5 µg/ml eritromisin, 5µg/ml neomicin, 10 µg/ml cloramphenicol, 10 µg/ml penicilin, 1 µg/ml novabiocine hassasiyet göstermektedir. Bütün suşların tek tür içinde yer aldığı bildirilmiştir (Çizelge 1.9.) (Perry 1992; Alfredson ve Kristjonsson 1995).

Rhodothermus

Gr(-) çubuk şeklinde flamentsiz ve hareketsiz bakterilerdir. Kırmızı karatenoit içerirler. % 2 NaCl katılmış, % 0,25 yeast extract ve % 0,25 tripton içeren besi ortamı 162 de, optimum 65°C ve pH 7,0 da gelişmekte, 54-77°C ve % 0,5-6 NaCl değerlerine tolerans göstermektedir. 5 µg/ml kanamisin, 30 µg/ml eritromisin, 15 µg/ml neomisin, 30 µg/ml cloramfenikol, 5 µg/ml penisilin G, 10 IU ampisilin, 10 µg/ml tetrasiklin, 15 µg/ml polymiksine hassasiyet gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 1.9.) (Alfredson ve Kristjonsson 1995).

Sacchorococcus

Gr (+) boyanabilen, 50-100 hücrenin bir arada bulunduğu bakterilerdir. Şeker fabrikalarından izole edildikleri, 70 °C'de pH 6,5 de 16-24 saat süren inkübasyon sonunda gelişme gösterdikleri bildirilmiştir (Çizelge 1.10.) (Alfredson ve Kristjonsson 1995).

Acidothermus

Gram reaksiyonları değişebilen 0,4-0,5 µm çaplı, 2-5 µm uzunluğunda ince çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen bakterilerdir. Flamentlere sahiptirler. pH 5,2'de, içine % 0,05 yeast-extrakt, % 0,05 D-sellobioz, ve % 0,5 selülozik substrat ilave edilmiş, düşük fosfat içeren tuzlu besi ortamında 50-65°C'de 1-2 haftada gelişmekte, oksidaz pozitif, katalaz negatif reaksiyon vermektedirler (Çizelge 1.10.) (Alfredson ve Kristjonsson 1995).

Çizelge 1.9 Diğer Termofilik Basillerin Biyokimyasal Özellikleri

| Karakter | <i>Thermomicrobium</i> | <i>Thermoleophilum</i> | <i>Rhodothermus</i> |
|-------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Hücre formu | Pleomorfik çubuk 1,3-1,8x3-6 µm | Kısa çubuk 0,4x 0,7-1,5µm | Çubuk 0,5x 2-2,5µm |
| Büyüme şekli | Tek yada çift hücre | Tek hücre | Tek yada çift hücre |
| Optimum °C | 70-75 °C | 60 °C | 65 °C |
| Büyüme aralığı | 45-80 °C | 45-70 °C | 54-77 °C |
| Hücre duvarı | Protein alt ünitesi | Peptidoglukan içinde oritin | ND |
| G+C | %64 | %69-70 | %64,5 |
| Optimum pH | 8,02-8,5 | 7,0 | 7,0 |
| Karbon kaynakları | | | |
| Glikoz | - | - | + |
| Laktoz | ND | - | + |
| Sakkaroz | + | - | + |
| Maltoz | ND | - | + |
| Glutamat | + | - | + |
| Pruvat | ND | - | + |
| Asetat | - | - | + |
| Gliserol | + | - | - |
| Mannitol | - | - | ND |
| n-Alkaner C12-30 | ND | + | ND |
| Jelatin hidrolizi | ND | ND | - |
| Katalaz | ND | + | + |
| Oksidaz | ND | ND | + |
| Nitrattan Nitrit | ND | ND | - |

(Alfredson ve Kristjonsson 1995).

Scodothermus

Gr(-) 1,5µm uzunluğunda, 0,5 µm genişliğinde bakterilerdir. % 0,25 yeast ekstrakt ve % 0,25 tripton ilave edilmiş besi ortamı 162 de 72⁰C’de 2 günde gelişirler.

Optimum pH 7,5 olmasına rağmen, pH 6-8 arasında da gelişme gösterirler. Sıcaklığı 70-80⁰C olabilen jeotermal kaynaklardan izole edilebilirler. Büyümek için vitamin ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duymazlar. Anaerobik yada çok düşük oksijen konsantrasyonlarında geliştikleri bildirilmiştir (Alfredson ve Kristjonsson 1995)

Çizelge:1.10 Diğer Termofilik Basillerin Biyokimyasal Özellikleri

| Karakter | <i>Sacharrococcus</i> | <i>Acidothermus</i> | <i>Scodothermus</i> |
|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| Hücre formu | Kok | Basil | Basil |
| Büyüme şekli | 1-2 µm | 0,4x 0,2-5µm | 0,5x -1,5µm |
| Optimum °C | Düzensiz yığınlar | Tek hücre | Tek yada çift hücre |
| Büyüme aralığı | 68-70°C | 50-60°C | 60°C |
| Hücre duvarı | 50-78°C | 37-70°C | 42-73°C |
| G+C % | Peptidoglikan-DAP | Peptidoglikan-DAP | ND |
| Optimum pH | %47,8 | %60,7 | %65,5 |
| Maltoz | ND | 5,0 | 7,5 |
| Pirolin | + | + | + |
| Glutamat | ND | ND | + |
| Asetat | ND | - | + |
| Piruvat | ND | ND | + |
| Sakkaroz | - | - | - |
| Glikoz | + | - | - |
| Lactoz | -(değişken) | ND | - |
| Ksiloz | + | ND | ND |
| Mannitol | + | + | ND |
| Seluloz | ND | + | ND |
| Pirolin | ND | ND | + |
| Glutamat | ND | ND | + |
| Nitrat | ND | ND | - |
| Jelatin hidrolizi | - | + | - |
| Katalaz | + | - | + |
| Oksidaz | + | + | + |
| Lipaz | + | ND | ND |
| Nitrattan Nitrit | - | - | + |
| Antibiyotik direnci | Polimixin B | Penicilin G | Polimixin B |

(Jacob and Alfredsson 1995)

1.2.2. Sıcak sulardaki hipertermofiller

Pek çok sıcak kaynak suyun kaynama noktasına yakın değerdedir. Kaynama noktasındaki sıcak sularda hipertermofillerin çeşitli türlerine

rastlanmaktadır. Bu mikroorganizmaların büyümeleri birkaç gün zenginleştirildikten sonra gözlenebilmiş ve büyüyen prokaryot kolonileri mikroskopik olarak incelenmiştir. Yapılan ekolojik çalışmalarda sıcak kaynaklarda bulunan mikroorganizmaların çok hızlı büyüdüğü, bir saatten daha kısa bir sürede bölündükleri kaydedilmiştir. Bu prokaryotların çoğu kültürünün çeşitli morfolojik ve fizyolojik özellikte olduğu saptanmıştır. Ribozomal RNA dizilimleri kullanılarak yapılan çalışmalarda çeşitli bakteri ve özellikle *Archaea* yı içine alan hipertermofiller arasında büyük evrimsel çeşitlilik olduğu gösterilmiştir. Bu hipertermofillerin bazılarının ise 100°C'nin üstünde optimum büyüme gösterdikleri, bundan dolayı da laboratuvarında kaynama noktasına ulaşan sıcaklıkta, basınç altında büyütülebildikleri bildirilmiştir (Brock 1986).

Archaea'lar yüksek tuz, yüksek sıcaklık, düşük pH ve anoksik ortamlar gibi ekstrem çevre şartlarına adapte olabilmiş mikroorganizmalardır. Bu özelliklerinden dolayıdır ki, yaşam ilk defa ortaya çıktığında Dünya üzerinde *Archaealar* dan bir grup var olduğu düşünülmektedir (Madigan ve ark., 2000).

Filogenetik olarak *Archaea* üç büyük gruba ayrılmaktadır. Bunlar *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* ve *Korarchaeota* dır. *Korarchaeota* evrimsel olarak dallanma göstermez. *Crenarchaeota* üyelerinin bilinen tümü son derece sıcak ortamlarda yaşayan hipertermofil türleri içerir. Pek çok hipertermofil kemolitotrofik ototroftur. Bu türlerin yaşadıkları ortamlar fotosenteze uygun olmadığından bu mikroorganizmalar zorlu çevresel şartların tek primer üreticileridir (Brock, 1986).

Hipertermofillerin soğukta yaşayan akrabaları buzlu kutup bölgesi sularından izole edilmiştir. *Euryarchaeota* ise *Archaea* nın fizyolojik çeşitlilikteki gruplarını kapsar. Bunları çoğu *Crenarchaeota*'lar gibi hipertermofil kemolitotrofik ototroftur ve metanı metabolizmalarında kullanırlar.

Archaea aleminin filogenetik farkı, son derece termofilik doğaya sahip mikroorganizmalar olmalarıdır. Bu canlılar sıcak seven prokaryotları temsil ederler. Hipertermofillerin bazılarının suyun kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklarda geliştiği bildirilmektedir (Madigan ve ark., 2000).

Bir çok hipertermofilik *Archaea*, jeotermal ısınmış topraklardan ya da elementel sülfür içeren sulardan izole edilmiştir. Bunlardan bir çok türün sülfürü

çeşitli yollarla metabolize ettiği gösterilmiştir. Hipertermofillerin bir çoğu zorunlu anaeroptur. Enerji üretim mekanizmaları kemoorganotrofik yada kemolitotrofikdir. *Thermococcus* ve *Thermoproteus* organik bileşikleri oksitler ve S'i elektron alıcısı olarak kullanır. Pek çok hipertermofilik *Archaea* kemolitotrofik olarak büyüebilmekte ve H₂'yi enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. Örneğin *Pyrodictium*'un, 110°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda H₂ ve S eklenmiş mineral tuz ortamında anaerobik olarak geliştiği bildirilmiştir (Brock 1979).

Hipertermofilik *Archaea* diğer prokaryotların gelişemediği çok yüksek sıcaklıklarda gelişebilmektedir. Eucaryotlar ve Eubacteriler ile karşılaştırıldığında, *Archaea* zarlarının, Eucaryotlar ve Eubacterilere benzemekle beraber, kimyasal olarak tek katmanlı oldukları görülmektedir. Bu zarlarda lipitlerin birbirinin içine doğru işaret eden hidrofobik kısımları kovalent bağlıdır. Tek katmanlı lipitten oluşan zarlar hipertermofilikler arasında oldukça yaygındır. Ayrıca yağ asitlerince zayıf, eter bağlarıyla gliserole bağlı hidrokarbon yarımları bakımından zengindir.

Hücre duvarı incelemeleri yapılan *Archaea*'lardan *Methanobacterium* türlerinin pseudopeptidoglukan olarak adlandırılan peptidoglukan benzeri bir yapıya sahip oldukları, bu yapının aminoasitlerinin diğerlerinden farklı olarak L formunda olduğu ve içerdiği amino şekerler arasında β ,1-3 bağları bulunmadığı saptanmıştır (Madıgan ve ark., 2000).

Son on yıldır ekstrem sıcaklık, basınç, pH ve iyonik ortamlarda gelişebilen ekstrem mikroorganizmalar araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Ekstrem termofiler sıra dışı durumlarda geliştiği için çeşitli modifikasyonlar gerektiren kültür metotlarının geliştirilmesi oldukça önemli olmuştur.

Sulfolobales

Solfatar alanlar ve yüksek asitliğe sahip sularda bulunurlar. Düşük iyonik değerlere sahip, içine sülfür karıştırılmış ve pH'sı 3'e ayarlanmış çeşitli besi ortamlarında büyürler. İnkübasyon sıcaklığı türe göre değişmekte, ortam asitliği, organik substratların varlığı ve sıcaklık artışı seçici özellik göstermektedir (Çizelge 1.11) (Madıgan ve ark. 2000).

Thermoprotales

Bu grup bakterilerin sıcaklığı 100⁰C ve daha yüksek volkanik biyotoplarda bulunduğu, filamentli çubuklar şeklinde olan hücrelerin uzunluklarının değişen olduğu, içine sülfür ilave edilmiş, düşük tuz konsantrasyonlu besi ortamında, H₂/CO₂ (80:20 v/v) anaerobik gaz ortamında, bir haftada büyüme gösterdikleri bildirilmektedir (Çizelge 1.11) (Huber ve Stetter 1994).

Archaeoglobales

Bu grup içinde yer alan bakteriler sulfat indirgeyen mikroorganizmalardır, deniz altındaki anaerobik hidrotermal alanlarından izole edilir, büyümek için yüksek sıcaklık ve tuza ihtiyaç duyarlar. 85⁰C'de sulfat ve tiosulfat içeren deniz suyunda, ön zenginleştirme yapıldıktan sonra, anaerobik şartlar altında N₂/CO₂ yada H₂/CO₂ (80:20), 3 bar basınç altında, 70⁰C'de, pH 6,9 da, 80 rpm'de, 8 günde 1-2 mm çaplı yeşil-siyah koloniler oluştururlar (Stetter 1994).

Thermococcales

Thermococcaceae adında bir tek familya, *Thermococcus* ve *Pyrococcus* olarak iki cinse sahip bu ordonun üyeleri, deniz solfatar alanları ve alkali jeotermal kaynaklardan izole edilmiştir. Bu ordonun henüz isimlendirilmemiş üçüncü bir cinsi daha olduğu düşünülmektedir. Bilinen bütün türler termofilik ve anaerobiktir. Büyümeleri için 85-110⁰C sıcaklık, N₂/CO₂ yada H₂/CO₂ anaerobik ortam, tripton, maya ekstraktı, glikojen, ve elementel sülfüre ihtiyaç duydukları saptanmıştır (Çizelge 1.11) (Zilling 1994).

Desulfurococcales

Desulfurococcales ordosu üyelerinin bilinen pek çok *Archaea* gibi deniz altındaki volkanik habitatlarda yaşadıkları bildirilmektedir. Bu canlılar ortalama 100⁰C'de gelişirler ancak, *Pyrolobus* optimum 106⁰C'de gelişme göstermektedir.

Pyrodictium üyeleri elemental sülfür ilave edilmiş ortamlarda düzensiz diskler halinde gelişirken, *Pyrolobus fumari* 113⁰C gelişme sıcaklığı ile bilinen en termofilik türdür ve 121⁰C otoklav sıcaklığına 1 saat dayanabilmektedir. *Pyrolobus*'un ototrof olduğundan yanardağ bacaları, hidrotermal kaynakların çıkış alanlarında büyüme gösterdiği bildirilmiştir (Madigan ve ark. 2000).

Japonya'da sıcak kaynaklardan izole edilmiş bir archaea olan *Thermococcus* sp. üzerinde yapılmış bir çalışmada, besin, ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılan cyclomaltodekstrin gulukanotransferaz üretimi gerçekleştirilmiştir (Tachibana ve ark. 1999).

Çizelge:1.11. Hipertermofilik Basillerin Karakteristik Özellikleri

| Cins | Morfoloji | O ₂ İhtiyacı | DNA mol% G+C | Min. | Sıcaklık Mak. | Ort. | Optm pH |
|--------------------------|----------------|-------------------------|--------------|------|---------------|------|---------|
| Sulfolobales | | | | | | | |
| <i>Sulfolobus</i> | Loblu kok | Ae | 37 | 55 | 75 | 87 | 2-3 |
| <i>Acidianus</i> | Kok | Fac | 31 | 60 | 88 | 95 | 2 |
| <i>Metallosphere</i> | Kok | Ae | 45 | 50 | 75 | 80 | 2 |
| Thermoprotales | | | | | | | |
| <i>Stygiolobus</i> | Loblu kok | An | 38 | 57 | 80 | 89 | 3 |
| <i>Thermoproteus</i> | Basil | An | 56 | 60 | 88 | 96 | 6 |
| <i>Thermophilum</i> | Basil | An | 57 | 70 | 88 | 95 | 5,5 |
| <i>Pyrobaculum</i> | Basil | Fac | 46 | 74 | 100 | 102 | 6 |
| Desulfurococcales | | | | | | | |
| <i>Desulfurococcus</i> | Kok | An | 51 | 70 | 85 | 95 | 6 |
| <i>Staphylothermus</i> | Kok-kümesi | An | 35 | 65 | 92 | 98 | 6-7 |
| <i>Pyrodictium</i> | Flamentli disk | An | 62 | 82 | 105 | 110 | 6 |
| <i>Pyrolobus</i> | Kok | Fac | 53 | 90 | 106 | 113 | 5,5 |
| <i>Thermodiscus</i> | Kok | An | 49 | 75 | 90 | 98 | 5,5 |
| <i>Igneococcus</i> | Kok-düzensiz | An | - | 65 | 90 | 103 | 5 |
| <i>Hyperthermus</i> | Kok-düzensiz | An | 56 | 75 | 102 | 108 | 7 |
| Archaeglobales | | | | | | | |
| <i>Archaeglobus</i> | Kok | An | 46 | 64 | 83 | 95 | 7 |
| <i>Ferroglobus</i> | Kok-düzensiz | An | 43 | 65 | 85 | 95 | 7 |
| Thermococcales | | | | | | | |
| <i>Thermococcus</i> | Kok | An | 37-57 | 70 | 88 | 98 | 6-7 |
| <i>Pyrococcus</i> | Kok | An | 38 | 70 | 100 | 106 | 6-8 |

(Martins ve ark. 1996).

Termofilik ve hipertermofilik *Archaea*'nın 12 farklı türü ile yapılan bir çalışmada da, optimum büyüme şartlarında organik solutlerin birikimi araştırılmış, *Pyrobaculum aerophilum*, *Thermoproteus tenax*, *Thermoplasma acidophilum* ve *Sulfolobales* ordosunun üyelerinin trehaloz ürettiği saptanmıştır. *P. furious* di-myo-inositol-1,1'(3,3')-fosfat ve β -mannosilgliserat, *MethanoThermus fervidus*, cyclic-2,3-difosfolgliserat ve β - mannosilgliserat birikimi yaparken *Pyrodictium*

occultum da yalnız di-myo inositol-1,1'(3,3')-fosfat birikimi olduğu bildirilmiştir (Martins ve ark., 1996).

Hipertermofiller ile yapılan bir başka çalışmada da elektron donörü olarak hidrojen, akseptör olarak ise Fe(III)-sitrata bulunan besi yerinde *Picrodictium islandicum* büyütülmüştür. *P. islandicum* hücre sayısı artarken Fe(III) azaldığı bulunmuştur. *P. islandicum*'un hücre süspansiyonunda elektron donörü olarak hidrojen kullanılmasının yanında U(VI), Tc(VII), Cr(VI), Co(III) ve Mn(IV) metalleri de indirgediği görülmüştür. Bu metallerin indirgenmesi hücrelerin ve hidrojenin varlığına bağlıdır. Arsenat ve selenat metalloitleri ise indirgenmemiştir, U(VI), ekstrasellüler ,eriyemez , mineral uranite indirgenmiştir. Tc(III) insoluble, Tc(VI)'e indirgenmiş, Cr(VI), daha az toksik ve daha az çözünebilir Cr(III)'e indirgenmiştir (Kashefi ve Lovley 2000).

Archaea grubu mikroorganizmalar son derece ekstrem şartlara uyum sağlamış canlılardır. Hipertermofiller olarak adlandırılan bu mikroorganizmaların pek çoğu suyun kaynama noktası sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda gelişir. Günümüzde hipertermofiller ve bunlardan izole edilen enzimler, yüksek ısılarda bozulmaya uğramadıklarından dolayı endüstride pek çok reaksiyonun gerçekleşmesinde, atık metallerin toksisitesinin azaltılmasında, biyolojik metal özütlemesinde v.b kullanılmaktadır (Tachibana ve ark., 1999; Martins ve ark., 1996 ;Kashefi ve Lovley 2000). Sonuç olarak biyolojik indirgenme ile hidrotermal alanlarda metallerin çeşitlenmesine katkıda bulunduğu ve hipertermofilik mikroorganizmalar yada onların enzimlerinden toksik metallerin indirgenmesi ve metaller ile kontamine olmuş suların yeniden kullanılabilir hale gelmesinde yararlanılabileceği bildirilmiştir (Kashefi ve Lovley 1999). Janson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise Floresan in situ hibridizasyon tekniği (FISH) ile 16S ve 23S rRNA-hedef propları kullanılarak archaeal 16S rDNA klon primerlerinden yararlanılmış ve boya endüstrisinin anaerobik arıtma tanklarında bulunan ve atık suyun yeniden temizlenmesinde faaliyet gösteren mikrobiyal popülasyonun karakterizasyonu yapılmıştır (Janson ve ark. 2001). Yapılan başka bir çalışmada ise, 100⁰C'de optimum büyüme gösteren zorunlu anaerob archaea türünün *Pyrobaculum* cinsine ait yeni bir tür olduğu bildirilmiştir (Huber ve ark., 1987).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Örneklerin alınması ve laboratuvara taşınması

Afyon (Gazlıgöl, Gecek, Ömerli), Kütahya (Gediz, Simav), Denizli (Kızılsu), Eskişehir (Sarıcakaya) kaplıcalarından su örnekleri alınarak pH aralıkları ve sıcaklığı ölçülüp termos içine konulmuş, 3-5 saat içinde, laboratuvar ortamına taşınmıştır.

2.1.2. Kullanılan besi ortamları ve kimyasal ayıraçlar

2.1.2.1. Besi ortamları

Thermus ve Meiothermus cinsleri için kullanılan besi yeri

Thermus besi yeri (M 74)

Ramley ve Hixon (1970) tarafından hazırlanan Thermus Besi yeri

| | |
|-------------------------------------|---------|
| Trypton(Difco) | 3.0 g |
| Yeast Extract (Difco yada Oxoid) | 1.0 g |
| Castenholz 10x basal salt solusyonu | 100 ml |
| Distile su | 1000 ml |

pH 7,5-7,8'e NaOH ile ayarlanır

Katı besiyeri için % 2,3-3 oranında agar katılmıştır.

131⁰C de 30 dakika otoklavlanır.

% 0,015sodyumazid ve % 0,01 lizozim katılmıştır (Williams ve Milton 1994).

Castenholz 10x basal salt solusyonu

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Nitrilloasetikasit(NTA) | 1.00 g |
| CaSO ₄ .7H ₂ O | 0.60 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1.00 g |
| NaCl | 0.08 g |
| KNO ₃ | 1.03g |
| NaNO ₃ | 6.89 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.11g |
| FeCl ₃ (0.28g/l) | 10 ml |
| Nitsch' trace element solution | 10 ml |

990 ml su ilave edilmiştir 4⁰C de saklanmıştır (Williams ve Milton 1994).

Nitsch'trace element solution

| | |
|---|----------|
| H ₃ BO ₃ | 0.5 mg |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.046 mg |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.01 g |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0.25 g |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0.025 mg |
| H ₂ SO ₄ | 0.5 ml |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0.5 mg |
| Distile su | 990 ml |

(Williams ve Milton 1994).

Bacillus Cinsinin izolsyonu için kullanılan besi yerleri

Nutrient broth

| | |
|---------------|---------|
| Beef Ekstrakt | 5 g |
| Pepton | 3,0 g |
| Distile su | 1000 ml |

Formüle göre hazırlanan besiyerinin pH'sı 7,0'a ayarlanmış, tüplere dağıtılıp 121⁰C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra +4 ⁰C de saklanmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Nutrient agar

| | |
|---------------|---------|
| Beef Ekstrakt | 5.0 g |
| Pepton | 3.0 g |
| Agar | 15 g |
| Distile su | 1000 ml |

Formüle göre hazırlanan besiyerinin pH'sı 7,0'a ayarlanmış 121⁰C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

***Archaea* izolsyonu için kullanılan besi yerleri**

Sulfolobus besi yeri

| | |
|--|--------|
| 1lt distile su | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.30 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.28 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.25 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.07 g |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 0.02 g |
| MnCl ₂ .4H ₂ O (10mg/ml) | 180 µl |
| Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O(10mg/ml) | 450 µl |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O(10mg/ml) | 22 µl |
| CuCl ₂ .H ₂ O(10mg/ml) | 5 µl |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O(10mg/ml) | 3 µl |
| VoSO ₄ .5H ₂ O(10mg/ml) | 3 µl |
| CoSO ₄ .7H ₂ O (10mg/ml) | 1 µl |
| Yeast extract (Bacto Difco) | 0.20 g |

pH: 9,6 (Segerer ve Steter 1994).

***Sulfolobus solfataricus* besi yeri**

| | |
|---|---------|
| Distile su | 1 l |
| KH ₂ PO ₄ | 0.50 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.30 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 3.50 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.25 g |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 0.5 g |
| Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O | 4.50 g |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 0.22 g |
| CuCl ₂ .2H ₂ O | 0.05 g |
| Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O | 0.03 mg |
| VoSO ₄ .5H ₂ O | 0.03 g |
| CoSO ₄ 7H ₂ O. yada CoCl ₂ | 0.1 g |
| pH 9,6 (Segerer ve Steter. 1994/a) | |

Pyrobaculum besi yeri (M:88)

| | |
|--|----------|
| 1lt distile su | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.30 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.28 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.25 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.07 g |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 0.02 g |
| MnCl ₂ .4H ₂ O (10mg/ml) | 180 µl |
| Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O(10mg/ml) | 450 µl |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O(10mg/ml) | 22 µl |
| CuCl ₂ .H ₂ O(10mg/ml) | 5 µl |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O(10mg/ml) | 3 µl |
| VoSO ₄ .5H ₂ O(10mg/ml) | 3 µl |
| CoSO ₄ .7H ₂ O (10mg/ml) | 1 µl |
| Resazurin | 1.0 mg/I |

| | |
|--|---------|
| Pepton | 0.5 g/l |
| Yeast ekstrakt | 0.2 g/l |
| Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O | 2.0 g/l |

Tüm mineraller suda çözülüp 8N NaOH ile pH 6,0-7,7 a ayarlanmıştır. 30 dakika N₂ altında tutulmuş, pepton, yeast ekstrakt ve sodyum sulfid ilave edilmiş, tekrar çözülmüş N₂ altında pH ayarlaması yapılmış, 10 N H₂SO₄ kullanılmıştır. Besi ortamı otoklavlanmamış 90⁰C de 3 gün her gün birer saat olmak üzere bekletilerek sterilizasyonu yapılmıştır (Huber ve Steter 1994).

Pyrococcus besi yeri (M:182)

| | |
|--|----------|
| NaCl | 13.85 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 3.5 g |
| KCl | 0.325 g |
| Na ₂ Br | 0.05 g |
| H ₃ BO ₃ | 0.015 g |
| SrCl 6H ₂ O | 7.5 mg |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 10.0 mg |
| Citrik asit | 5.0 mg |
| KI | 0.05 mg |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 1.0 mg |
| KH ₂ PO ₄ . 3H ₂ O | 0.5 mg |
| NiCl ₂ 6H ₂ O | 2 mg |
| İz element solusyonu | 10 ml |
| Resazurin | 1.0 mg/l |
| Pepton | 5 g/l |
| Yeast ekstrakt | 1 g/l |
| Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O | 0.5 g/l |
| Sülfür | 30 g/l |
| Distile su | 1 l |

(Zillig, 1994).

***Pyrococcus* izolasyonu için kullanılan iz element solüsyonu**

| | |
|--|---------|
| Nitrilloasetikasit(NTA) | 1.5g/l |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 3 g |
| Mn SO ₄ 2H ₂ O | 0.5 g |
| NaCl | 1.0 g |
| Fe SO ₄ 7H ₂ O | 0.1 g |
| CoSO ₄ | 0.1 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.1 g |
| Zn SO ₄ | 0.1 g |
| Cu SO ₄ 2H ₂ O | 0.01 g |
| KAl (SO ₄) ₂ | 01 g |
| H ₃ BO ₃ | 0.01 g |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O. | 0.01 g |
| NiCl ₂ 6H ₂ O | 0.025 g |
| Distile su | 1000 ml |

(Zillig, 1994).

***Acidianus brierleyi* besi yeri (M:150)**

| | |
|---|---------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 3.00 mg |
| KH ₂ PO ₄ 3H ₂ O | 0.50 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 3.50 g |
| KCl | 0.325 g |
| Ca(NO ₃) ₂ | 14 mg |
| Yeast extract | 0.20 g |
| Sulfur | 10.00 g |
| Distile su | 1 l |

pH 9,6 (Segerer ve Steter 1994).

***Acidianus infernus* besi yeri (M:358)**

| | |
|---|-------------------|
| 1 l distile su | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.30 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.28 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.25 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.07 g |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 0.02 g |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 180 µl (10 mg/ml) |
| Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O | 450 µl (10 mg/ml) |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 22 µl (10 mg/ml) |
| CuCl ₂ .H ₂ O | 5µl (10 mg/ml) |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 3 µl (10 mg/ml) |
| VoSo ₄ .5H ₂ O | 3 µl (10 mg/ml) |
| CaSO ₄ .7H ₂ O | 1 µl (10 mg/ml) |
| Yeast extract (Bacto Difco) | 0.20 g |
| Sulfur | 1.0 g |
| pH 9,6 (Segerer ve Steter 1994/b). | |

Karbonhidrat kullanımı testleri için kullanılan besi yerleri**Laktoz broth**

| | |
|-------------|---------|
| Pepton | 2.5 g |
| Laktoz | 2.5 g |
| Et ekstresi | 1.5 g |
| Fenol red | 0.012 g |
| Distile su | 500 ml |

Formüle göre hazırlanan besiyerinin pH'ı 6,9'a ayarlanmış, tüplere 10 ml aktarılıp içlerine durham tüpü atıldıktan sonra 121⁰C de 15 dakika sterilize edilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Karbonhidrat fermentasyon ortamları

Karbonhidrat fermentasyon deneylerinde glukoz, sukroz, mannoz, rahamnoz, galaktoz, ksiloz, laktoz, arabinoz, mannitol, sorbitol, inositol, rafinoz kullanılmıştır. Karbonhidrat solusyonları son konsantrasyonu % 5 olacak şekilde ilave edilmiştir. Ortam olarak Gr(+) için, Nutrient Broth, Gr(-) için Besi ortamı 74 agar kullanılmıştır. Şeker çözeltileri filtreden geçilerek sterilize edilmiştir. Gr(+) için Fenol red (% 0,01) indikatör olarak kullanılmış, Gr(-) de plak kültür üzerinde üreme olup olmadığına bakılmıştır (Sharp ve Williams., 1988; Tamer ve ark., 1989).

MR-VP broth,

| | |
|---------------------------------|---------|
| Tamponlanmış pepton | 7,0 g |
| Glukoz | 5,0 g |
| K ₂ HPO ₄ | 5,0 g |
| Distile su | 1000 ml |

Tüplere dağıtılan besiyeri 121⁰C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra +4⁰C'de saklanmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Tripton broth

| | |
|------------|---------|
| Tripton | 3,0 g/l |
| NaCl | 0,3 g/l |
| Distile su | 1000 ml |

(Tamer ve ark., 1989).

Nitrat broth

| | |
|------------------|-----|
| Nutrient Broth | 8 g |
| KNO ₃ | 5 g |

TSI agar (Triple sugar iron agar)

| | |
|-------------------|-----------|
| Beef Ekstrakt | 3 gr. |
| Yeast Ekstrakt | 3 gr. |
| Pepton | 15 gr. |
| Proteaz pepton | 5 gr. |
| Laktoz | 10 gr. |
| Sakkaroz | 10 gr. |
| Dekstroz | 1 gr. |
| FeSO ₄ | 0.2 gr. |
| NaCl | 5 gr. |
| Sodyum Tiyosülfat | 0.3 gr. |
| Agar | 12 gr. |
| Fenol red | 0.024 gr. |
| Distile su | 1000 ml. |

İyice çözüldürüldükten sonra pH 7.4±0.2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Üre hidrolizi testi

| | |
|---------------------------------|------|
| Pepton | 1 g |
| NaCl | 5 g |
| Glikoz | 1 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2 g |
| %0,2 Fenol Red | 6 ml |
| Agar | 20 g |
| Distile su | 1 l |

Besiyeri 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra petri kaplarına aktarılıp +4°C'de saklanmıştır (Tamer ve ark., 1989).

2.1.2.2. Kimyasal ayıraçlar

Metil kırmızısı indikatör çözeltisi

0,1 gr metil kırmızısı 250 ml etanolde (% 95'lik) çözülüp, üzerine 250 ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra filtre kağıdından süzülerek kullanılmıştır.

KOH çözeltisi (% 40'lık)

40 gr KOH, 75 ml distile suda çözülerek çözelti oda sıcaklığında bir süre bekletilmiştir. Daha sonra 0,3 g kreatin ilave edilerek iyice çözüldükten sonra, distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Tamer ve ark., 1989).

α -Naftol ve sulfanilik asit çözeltisi

5 gr α -naftol, 100 ml etanolde (% 95'lik) çözülerek hazırlanmıştır. 8 gr sulfanilik asit 5N 100ml asetik asit veya 294 ml galsiyel asetik asit içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Kovaks çözeltisi

5 gr para-dimetil amino benzaldehit 75 ml butil alkolde çözülerek su banyosunda hafifçe ısıtılmıştır. Tamamen çözüldükten sonra 25 ml HCl (% 37'lik) dikkatlice ilave edilerek karıştırılmıştır.

İyodür (Lugol) çözeltisi

1 g iyot ve 2 g KI havanda iyice karıştırılarak toz haline getirilmiş ve üzerine yavaş yavaş 300 ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Safranin boyası

0,25 g safranin 10 ml ethanolde (% 95'lik) çözülerek, distile su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve iyice karıştırılarak filtre kağıdından süzümüştür (Tamer ve ark., 1989).

Kristal viyole boyası

20 ml etanolde (% 95'lik) 2 g Kristal viyole çözülmüş ve 80 ml distile suda 0,8 g amonyum oksalat çözülerek, bu çözelti alkolde çözülmüş olan kristal viyole'ye ilave edilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Liziz buffer

Solusyon 1: % 25 sukroz, 10 mM Tris 10 mM EDTA pH 7.5

Salusyon 2: 3 mM NaOH, 0.1 M EDTA2Na, % 4 SDS

Solusyon 3 :% 4'ü yüksek alkol olan alkol kloroform karışımı.
3 M Sodyum asetat, pH 6.0 (Kelvin ve ark., 1993).

Tris-asetat (TAE) tampon pH 8.0 5X/litre

| | |
|----------------------|---------|
| Trizma Base | 242 g |
| Glasiyel asetik asit | 57.1 ml |
| EDTA pH 8.0 (0.5 M) | 100 ml |

(Olgun ve Topal., 1999).

Tris-Borat (TBE) tampon pH 8.0 5X/litre

| | |
|---------------------|--------|
| Trizma Base | 54 g |
| Borik asit | 27.5 g |
| EDTA pH 8.0 (0.5 M) | 20 ml |

(Olgun ve Topal., 1999).

Loading tampon (Bromo phenol blue)

| | |
|------------------|---------|
| Üre | 4 M |
| EDTA | 0.025 M |
| Sukroz | % 60 |
| Bromophenol blue | % 0.025 |
| Ksilen | % 0.025 |

(Olgun ve Topal., 1999).

TE tamponu (pH 8.0)

| | |
|----------------|--------------|
| Tris-HCl | pH 8.0 10 mM |
| EDTA | pH 8.0 1 mM |
| Etidyum bromid | 10 mg/ml |

(Olgun ve Topal., 1999).

Solüsyon I

50 mM glikoz, 25 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0. Otoklavda steril edilip +4°C'de saklanır (Olgun ve Topal., 1999).

Solüsyon II

0,2 N NaOH, % 1 SDS (Taze olarak hazırlanır) (Olgun ve Topal., 1999).

Solüsyon III

60 ml 5 M potasyum asetat (KAc), 11.5 ml galasiyel asetik asit, 28.5 ml H₂O. Etanol:% 100 (absolü) RNaz: 10 mg/ml stok (Olgun ve Topal., 1999).

% 1 lik agaroz jel

Kullanılacak jelin büyüklüğüne göre tartılan agaroz TAE tampon içerisinde kaynatma yoluyla çözdürülerek, elde tutulabilecek sıcaklığa (50-55 °C) düştüğünde 0.5 µg/ml etidyumbromür ilave edilmiştir. DNA fragmenti alınarak üzerine Bromophenol blue (BB) ilave edilmiştir (genellikle 1/6 hacimde). BB ve DNA nın tamamıyla karışması sağlanmış ve 10 saniye mikrosantrifüje konup sıvının tüp dibine toplanması sağlanmıştır. Mikropipet yardımıyla tüm sıvı jele dikkatlice yüklenilmiştir. 5 volt/cm olacak şekilde akım geçirilmiştir. Sürenin sonunda jel transilluminator üzerine alınarak UV ışığı altında fragmentlerin analizi yapılmıştır (Olgun ve Topal., 1999).

Yağ asidi analizi solüsyonları

Ayıraç I (Saponifikasyon ayıracı)

| | |
|-------------------------|--------|
| Sodyum Hidroksit (ACS) | 45 g |
| Metanol (HPLC saflıkta) | 150 ml |
| Deionize distile su | 150 ml |

Ayıraç II (Metilasyon ayıracı)

| | |
|-------------------------|--------|
| 6.00 N Hidroklorik Asit | 325 ml |
| Metanol (HPLC saflıkta) | 275 ml |

Ayıraç III (Ekstraksiyon ayıracı)

| | |
|---------------------------------------|-------|
| Heksan (HPLC saflıkta) | 200ml |
| Metil tert-butyl eter (HPLC saflıkta) | 200ml |

Ayıraç VI (Yıkama)

| | |
|------------------------|--------|
| Sodyum Hidroksit (ACS) | 10.8 g |
| Deionize distile su | 900ml |

NaCl: 40 g ACS NaCl 100ml deionize suda çözülmüş, yeterli çökeltme olmayan durumlarda damlatılmıştır (Ferreira ve ark., 1999).

Comassie brillant blue (Bradford Yöntemi)

25 mg Comassie brilant blue G-250, 125 ml % 95 etanolde çözündürülüp, 25 ml % 85 H₃PO₄ eklendikten sonra 250 ml'ye tamamlanmış, Whatman No.1 filtreden süzölmüştür (Olgun ve Topal., 1999).

0,1X Saline sitrat (SSC) ve sezyum klorid

10 Molar NaCl, 0,015 Molar Salin sitrata ilave edilmiştir.

1 ml DNA için 1mg sezyum klorid ilave edilmiştir.

2.1.2.3. Kullanılan primer dizileri

Archaea SSUrRNA

ASF (3-21) 5' -TCCGGTTGATCCTGCCGG -3'

ASR (UN) (1423-1402) 5'-ACGGNWACCTTGTTACGAGTT -3'

ASF21 5'TCCGGTTGATCCYGCCGG-3'

R (UN) 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

ASF1 (20) 5' -TCYGKTTGATCCYGSCRAG-3'

R1492 (UN) 5' - TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Bacteria SSU rRNA

BSF8 (20) 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3

BSR1541 (20) 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3'

BSF8 (19) 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

BSR1510 (19) 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3'

Bacteria (B.flavothermus) SSU rRNA

UN-F (11-26 *E.coli*); 5'- ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3'

UN-R (1411-1393 *E.coli*); 5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTTGTA-3'

(Beldüz ve ark., 2003; Mcinerney ve ark.,1995).

2.1.2.4. Standart olarak kullanılan bakteriler

B. stearothermophilus NRRL-B 1102

(Ankara Üniversitesi, Prof. Dr. Kadir Halkman'dan sağlanmıştır)

B.flavothermus DSM 2641

(Karadeniz Teknik Üniversitesi, Prof. Dr. A. Osman Beldüz'den sağlanmıştır)

T. thermophilus HB8

T. Thermophilus HB27

T. thermophilus IB21

T. brockianus Ys30

T. brockianus Ys34

T. brockianus Ys38

T. antraknikiani 12462

T. filiformis Tok22

T.filiformis Wai

T. aquaticus Ys48

T. aquaticus Ysq

T oshimai CB-I

T.oshimai SPS8

T. igniferrae 12460

T.ruber

(Londra Üniversitesi, Prof.Dr. Tony Willias'dan sağlanmıştır)

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin analize hazırlanması

Örnekler termos içine konularak 1 saat içinde, laboratuvar ortamına taşınmıştır. Örneklerin bir grubu *Thermus* türlerinin izolasyonu için, 250 ml lik erlenler içine önceden aktarılıp steril edilmiş 100 ml lik besi ortamına ekilerek, 250 rpm çalkalamalı etüvde, ikinci grubu ise, içinde 75ml besi yeri bulunan 100 ml lik vidalı kapaklı duran şişeleri içine konularak, 60 ve 75 °C sıcaklıklarda

aerobik olarak inkübasyona bırakılmış, üçüncü grup ise, anaerobik şartların oluşturulduğu [CO₂-H₂ (80:20, v/v)], anaerobik jar içinde 80°C’de inkübe edilmiştir.

Önceden hazırlanıp steril edilmiş olan Sulfolobus Besi yeri, Sulfolobus solfataricus besi yeri, Acidianus brierleyi besi yeri, Acidianus infernus besi yeri, Thermus besi yeri, Pyrobaculum besi yeri, Pyrococcus besi yeri, Nutrient Brot ortamlarına, 90 ml ye 10 ml örnek olacak şekilde su örneği aktarılarak, gelişme gösteren dilüsyonlar seçilmiş ve gram boyama yapılarak mikroorganizma gelişip gelişmediği tespit edilmiştir.

2.2.2. Mikroskobik inceleme

Gram boyama yapılarak mikroorganizmaların Gr. reaksiyonları saptanmış ve milimetrik lam yardımı ile mikroorganizma boyutları ölçülerek fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.3. Biyokimyasal testlerin uygulanması

Gram boyama

Gram boyama ile bakterilerin Gram reaksiyonu incelenmiştir. Besi ortamı 74 ve Nutrient Brotda geliştirilmiş 24 saatlik kültüre Gram boyama işlemi, yapılmıştır. Katı besiyerindeki kültürden öze ile yaklaşık bir toplu iğne başı büyüklüğünde bir kısım alınarak, lam üzerine konulmuş bir damla su içerisinde seyreltilip yüzeye öze ile yayılmış, lam havada kurutulmuş, sonra bek alevinden 3 kez geçirilerek fiksasyon yapılmış ve soğutulmuştur. Preparat ilk önce kristal violet ile boyanarak 1 dakika beklenmiş ve fazla boya akıtılmıştır. Daha sonra iyot-lügol çözeltisi ile boyanarak 1 dakika beklemeye bırakılmış, fazla boya akıtılarak, alkol ile 6 saniye muamele edilmiş, distile su ile alkol yıkanarak uzaklaştırılmış, preparat safranin ile boyanarak 30 sn bekletilmiş, fazla boya distile su ile yıkandıktan sonra preparat, havada kendi halinde kurumaya bırakılmıştır. Preparata immersiyon yağı damlatıldıktan sonra 100’lük objektifle

incelenmiştir. Mor renkli olan bakteriler Gram (+), pembe renkli olan bakteriler ise Gram (-) olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Katalaz testi

Besi ortamı 74 ve Nutrient Brot da geliştirilmiş 24 saatlik kültüre 70 ve 60 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu aktif kültürler üzerine % 3 hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığı gözlenmiştir. Gaz kabarcığı görülen kültürler için test pozitif, gaz kabarcığı görülmeyen kültürler için ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

% 1, % 2 ve % 3 NaCl toleransı

Besi ortamı 74 ve Nutrient Brotda geliştirilmiş 24 saatlik kültüre % 1, % 2 ve % 3 oranlarında NaCl ayrı ayrı olmak üzere ilave edilmiş, iyice çözüldürüldükten sonra 10 ml olacak şekilde tüplere paylaştırılmış ve 121 °C' de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 24 saatlik aktif kültürler besiyerlerine ekilmiştir. Ardından anaerobik koşullarda 70 ve 60 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bulanıklığın görüldüğü tüplerde test pozitif, bulanıklık olmayan tüplerde ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

28,37, 50, 65, 75, 80°C'de gelişme

Thermus besi ortamı ve Nutrient Brot içeren tüplere inokule edilmiş kültürler 28,37, 50, 65, 75, 80°C'deki sıcaklıklarda aerobik koşullarda 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bulanıklık görülen tüplerde üremenin olduğu kabul edilmiş ve test pozitif, üremenin görülmediği tüplerde ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

pH 4,5,6,7,8’de gelişme

Besi ortamı 74 ve Nutrient Brot içeren tüplere inoküle edilmiş kültürler aerobik koşullarda 70 ve 60 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bulanıklığın görüldüğü tüplerde test pozitif, bulanıklık olmayan tüplerde ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

H₂S üretimi

Yatık TSI besiyeri yüzeyine ve dikine daldırma şeklinde ekim yapılmıştır. Bütün tüpler aerobik koşullarda 70 ve 60 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde bir siyahlaşma görülen tüpler o organizma için test pozitif kabul edilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Voges-proskauer testi

Besi ortamı 74 ve Nutrient Brotda geliştirilmiş 24 saatlik Gr(-) ve Gr(+) kültürlerden, MR-VP broth içeren tüplere ekilerek, aerobik koşullarda 70 ve 60 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüpler üzerine 0.5 ml. α-naftol çözeltisinden ve daha sonra 0.5 ml. % 40’lık KOH çözeltisinden ilave edilerek çalkalanmış, 5-10 dakika sonra kırmızı renge doğru bir pembeleşme görülen tüpler pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Karbonhidrat fermentasyon testleri

Karbonhidrat fermentasyon testleri arabinoz, ksiloz, glikoz, mannitol, galaktoz, sorbitol, sukroz, maltoz, fruktoz, laktoz gibi karbonhidrat kaynakları kullanılmıştır.

Testi yapılacak şeker Gr(+) basiller için, katı besiyerine % 5 oranında ilave edilerek, 110 °C’de 15 dakika otoklavlanarak, Gr(-) basiller için ise 0,2 µm por çaplı filitre kullanılarak steril edilmiştir. Hazırlanan besiyerine aktif kültürlerden % 1 oranında aşılandıktan sonra, aerobik koşullarda 48 saat süre ile inkübasyona

bırakılmıştır. Sonuçta besiyerinde üreme olup olmadığına bakılmış, üreme görülen test pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sharp ve Williams 1988).

İndol üretimi

Tripton broth'lu tüpler'e daha önce besi ortamı 74 ve nutrient brot da geliştirilmiş 24 saatlik kültürlerden ekim yapılmış, bir tüp de kontrol olarak inoküle yapılmadan bırakılmıştır. Tüpler 70 ve 60⁰C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra tüplere birkaç damla kovaks çözeltilisinden damlatılmış ve hafifçe çalkalanmıştır. Kovaks çözeltilisi ile besiyerinin teması neticesinde kırmızı bir renk oluşumu, indol üretimi için pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Sitrat kullanımı testi

Besi ortamı 74 ve nutrient broth'da geliştirilmiş 24 saatlik kültürlerden Simon Sitrat agara ekim yapılmış 24 saat 70 ve 60⁰C'de inkübe edilmiştir. Mavi renk oluşumu gözlenen tüpler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Üre hidrolizi testi

Besi ortamı 74 ve nutrient broth da geliştirilmiş 24 saatlik kültürlerden üre agara ekim yapılmış, 1-7 gün 70 ve 60⁰C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ortamın bazikleşmesi sonucu görülen kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

Nitrat redüksiyonu testi

Besi ortamı 74 ve Nutrient broth da geliştirilmiş 24 saatlik kültürlerden nitrat brota ekim yapılmış 48 saat 70 ve 60⁰C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kültürler üzerine 3 damla sülfanilik asit ve 2 damla α -naftol damlatılmış

pembe-kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

VITEC testi

Gr(+) bakterilere uygulanacak testte bakteriler nutrient agara ekim yapılmış, 60⁰C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Tüp içine 1.8 ml VITEC solüsyonu doldurulmuş, içine steril öze ile plak besi ortamında üreyen kültürden aktarılmıştır. Aktarılan hücre miktarı kolorimetre üzerinde kırmızı bölgeye sınır alınarak ayarlanmış, süspansiyon GPI kartına doldurulmuş, 15 saat sonunda sonuçlar değerlendirilmiştir.

API-ZYM kiti ile enzim içeriklerinin saptanması

Thermus agar besi ortamında 24 saat 70⁰C'de ve nutrient agarda 24 saat 60⁰C'de geliştirilen kültürlerden alınarak 2 ml hacimdeki distile suda sulandırılan örneklerin yoğunluğu 5-6 McFarland'a göre ayarlanmıştır.

İnkübasyon kutusunun peteklerine 5 ml distile su dağıtılmış, bant üzerinde bulunan her küpül içine 2 damla (65µl) örnek inoküle edilmiş, Gr(-) bakteriler için 70⁰C'de Gr(+) bakteriler için 60⁰C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her küpüle 1 damla ZYM A ve 1 damla ZYM B reaktifi damlatılmış, 5 dakika beklenmiş, renk oluşumu pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

2.2.4. Moleküler testler

SDS-PAGE analizi

SDS-PAGE protein analizi için, 250 ml lik erlenlerde Besi ortamı 74 ve nutrient brot içinde 24 saat inkübe edilen kültürler, +4' °C' de 12000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiş, elde edilen peletler üzerine 5 mg lizozim ilave edilip 5 dk beklenmiş, 4 ml tris sitrat ilave edilip 10-15 dk yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra temiz bir şişeye aktarılan kültür içinde buz bulunan bir kap içine konularak

sonikasyona tabi tutulmuştur. Parçalanmış hücrelerden oluşan sıvı ependorf tüplerine aktarılıp 15000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiş, süpernetant temiz bir tüpe aktarılmıştır. Elde edilen protein ekstralarının miktar tayini spektrofotometrede yapılmıştır. Örnekler 10-200k Da Fermentas #SM0661 marker ile birlikte % 12 lik SDS-Poliakrilamid jele yüklenmiştir. Sistem güç kaynağına bağlanmış önce düşük (80 volt) sonra yüksek (120 volt) akımda protein yürütme işlemi tamamlanmıştır.

Bant oluşumu tamamlandıktan sonra jel Coomassie boyama tekniği ile boyanarak görülen bantların protein ağırlıkları UVBand Map programı ile saptanmış, değerlendirmeleri yapılmıştır (Ertan ve Arda, 1999; Sambrook ve ark., 1989).

İzolatlardan DNA ekstraksiyonu

2 litre erlenmayer içine 500 ml besi ortamı aktarılıp, içine 50 ml sıvı kültür aşılanmış, 70°C'de 24 saat çalkalamalı etüvde havalandırma yapılarak üretilmiş, kültürün tamamı +5 °C'de santrifüjlenmiştir.

1- Santrifüjlenen hücreler üzerine 20 ml. Solusyon-1 ilave edilmiş, iyice karıştırılıp, daha sonra solusyon-2 ilave edilmiş, çalkalanmış, 30 ml solusyon-3 ilave edilmiş 5 dakika beklenmiş, 10 ml 3M sodyum asetat ilave edilmiş, 25 % sakkaroz, 10 mM tris, 10 mM EDTA pH 7.5 ilave edilmiş, +5 derecede 15 dakika 7000 rpm de santrifüjlenmiştir.

2-Üst tabaka Pastör pipeti ile alınıp, iki hacim etanol konularak, DNA cam çubuğa sardırılarak alınmış, TE içinde yeniden çözülmüştür.

3- Eşit hacim kloroform ve yüksek alkol ilave edilip aynı şartlarda santrifüjlenerek, üst tabaka Pastör pipeti ile alınmış, temiz tüpe akyarılarak, 2 hacim soğuk izopropanol eklenmiş DNA çöktürülmüş, cam çubuğa sarılarak alınmış ve tris içinde yeniden çözümlenerek + 4 derecede saklanmıştır.

Arazi örneklerinden DNA ekstraksiyonu

Örneklerin toplanması.

200 ml su örneği 5000xg de 4°C de 20 dk santrifüjlenerek, çökelti üstündeki sıvı kısım atılmıştır. Pelet üzerine 100 ml kar soğukluğunda STE dökülüp süspanse edilmiş, 5000xg de 4°C 20 dk santrifüjlenmiş. Pelet üzerine 5 ml (10mM) Tris-HCl pH7,6 ilave edilmiş, 5 dk vortekslenmiş, örnek Whatman filtreden vakum ile süzölmüştür (Hugenholtz ve ark., 1998).

DNA ekstraksiyonu

Filtrata 8 mg ml⁻¹ lizozim karıştırılmış, 30°C de 50 ml santrifüj tüpünde 1 saat bekletilmiş, eşit hacimde liziz buffer ilave edilmiş, 30 dk 55 °C de inkübe edilmiştir. Daha sonra iki hacim etanol eklenmiş (DNA çökeltilmiştir) ve santrifüj edilmiş, 20 dk 5000xg de 4°C'de santrifüjlenmiş, pelet elde edilmiştir. Pelet kurutulmuş, daha sonra 0,5 ml steril su ile süspanse edilmiş, fenol-kloroform ile proteinler ayrıştırılıp etanol ile çöktürölmüştür (Bacer ve ark., 2001; Hugenholtz ve ark., 1998).

Fenol-Kloroform ekstraksiyonu

Pelet üzerine 0,5 ml fenol-kloroform (1:1) ilave edilmiş, fenol tris ile dengelenmiştir. Kloroform/izoamilalkol (24:1) oranında bu ikisi 1:1 oranında karıştırılmış, yatay karıştırıcıda 5 dk çalkalanarak karıştırılmıştır. 2 dk 14000 rpm de santrifüjlenilmiştir. Ağızı geniş plastik pipet ile üst tabaka alınmış, yeni 1,5 ml lik tüpe transfer edilmiştir (Baker ve ark., 2001; Hugenholtz ve ark., 1998).

DNA nın izopropanol ile çökeltilmesi

Elde edilen miktarın 0,6 hacmi miktarında izo-propanol ilave edilerek tüp karıştırılmıştır. 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra, 10 dak 14000 rpm de

santrifüj yapılmıştır süpernetant çöpe atılmıştır. Tüpler hassasça kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek alkol uzaklaştırılmıştır (Bacer ve ark., 2001; Hugenholtz ve ark., 1998).

DNA'nın etanol ile çökeltilmesi

Çökelti üzerine 200 µl 0,3M NaOH (NaOAC) çökelti solüsyon haline getirilmiştir. 100 µl etanol ilave edilmiş, 20⁰C de 30dk yada gece boyunca inkübe edilmiştir. 10 dk 14000 rpm de santrifüjlenilmiş, süpernetant atılmıştır Tüp ters çevrilip kurutma kağıdı üzerinde kurutulmuştur Alkol uzaklaştırılıncaya kadar beklenilmiştir. 15-30 µl TE solustonu tüp içine konularak solüsyon pipet ile yavaşça karıştırılmıştır (Bacer ve ark., 2001; Hugenholtz ve ark., 1998).

DNA'nın saflık derecesinin ve miktarının saptanması

DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen Optik Yoğunluk (kısaca OD olarak kullanılmıştır) değerlerinden hesaplanmıştır. Çift iplikli (çi) DNA için 1 OD 50 µg/ml'e, tek iplikli (ti) DNA veya RNA için 40 µg/ml'e ve oligonükleotidler için 20 µg/ml'e karşılık gelmektedir.

Buna göre çiDNA miktarı $\mu\text{g/ml} = 260 \text{ nm'deki OD} \times \text{seyreltme oranı} \times 50 \mu\text{g/ml}$ tiDNA

RNA miktarı $\mu\text{g/ml} = 260 \text{ nm'deki OD} \times \text{seyreltme oranı} \times 40 \mu\text{g/ml}$
DNA miktarı $\mu\text{g/ml} = 260 \text{ nm'deki OD} \times \text{seyreltme oranı} \times 20 \mu\text{g/ml}$ formülü ile hesaplanmıştır (Olgun ve Topal., 1999).

DNA jel elektroforezi

Agaroz jel konsantrasyonu % 0,8-% 1,5 arasında değiştirilerek jelin ağ açıklığının (por) boyutu ayarlanmıştır. DNA ve PZR ürününün jelde yürümesinin optimum olması sağlanmıştır.

DNA'nın jelde görünür hale gelmesi etidyum bromitin DNA bağları arasına bağlanarak 300 ve 360 nm.de ışığı absorblaması sonucu floresans etki göstermesi ile sağlanmıştır (Olgun ve Topal, 1999).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile DNA nın çoğaltılması

PZR toplam reaksiyon hacmi: 25 µl olacak şekilde aşağıdaki bileşenler sırasıyla PZR tüpüne konulmuştur.

Distile su: 16,5 µl

PZR reaksiyon tamponu: 2,5 µl

MgCl₂: 1,5 µl

dNTP: 1,5 µl

Primer BSF8: 0,5 µl

Primer BSR1541: 0,5 µl

DNA: 1 µl

Taq DNA polimeraz: 1 unit/ µl

PZR tüpüne konan bileşenlerin iyice karıştırılması amacıyla 10 sn 1000 rpm de santrifüj de döndürülmüştür.

PZR Şartları:

Döngü sayısı: 30

Ön ayırma: 95 °C 5 dk.,

Çift sarmali ayırma: 95 °C 1 dk.,

Primer Oturması: 55 °C 1dk. ,

Primer Uzaması:72 °C 2 dk ,

şartları altında PZR ürünleri % 1,5'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir (Beldüz ve ark., 2003; Welch ve ark., 1998).

Agaroz jelden PZR ürününün saflaştırılması

1500 bp PZR ürünü %1,5'lik agaroz jel kuyucuklarına yüklenilmiştir, Ürün varlığı tespit edildikten sonra Bio Rad 'Quantum Prep Freze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns' ile saflaştırması yapılmıştır.

DNA dizi analizi için PZR ürününün çoğaltılması

DTCS Standart kit ile reaksiyon karışımının hazırlanması

100 reaksiyonluk karışım hazırlanmış, her bir seans için 96 µl lik hacimlerde Ependorf tüplerine konulmuştur.

| | |
|---------------------|-----------|
| 10X sequence buffer | 200.0 µl |
| dNTP mix | 100.0 µl |
| ddUTP | 200.0 µl |
| ddGTP | 200.0 µl |
| ddCTP | 200.0 µl |
| ddATP | 200.0 µl |
| DNA Polimeraz | 100.0 µl |
| Toplam: | 1200.0 µl |

DTCS Standart kit ile dizi analizi reaksiyonunun hazırlanması

| | |
|---|------------|
| dH ₂ O (Toplam hacmi 20 µl ye tamamlamak için kullanılmıştır.) | X µl |
| Kalıp DNA | 0,5-0,6 µl |
| Standart Reaksiyon Karışımı (Mix) | 12.0 µl |
| Toplam | 20 µl |

PZR şartları

96°C de 20 sn

50 °C de 20 sn

60 °C de 4dk.

30 döngü +4 °C de bekleme

DNA dizi analizi

DNA dizi analizi Beckman Coulter Ceq 8000 Genetik Analiz Sistemi cihazında cihazın kullanma şartlarına göre her bir kuyucuğa 40 µl ürün konularak, Lfr a programında, 20 sn ejskiyon zamanı ile yapılmıştır.

Yağ asidi analizi

Gr(+) kültürler 60°C'de 24 saat, Gr(-) kültürler 70°C'de 24 saat de, pembe renk oluşturan 101 numaralı Gr(-) şuş 60°C'de 24 saat *Thermus* Agar üzerinde geliştirildikten sonra yağ asidi analizi için hazırlanmıştır. Hazırlanan ve 40 µg olarak tartılan her bir kültür, saponifikasyon, metilasyon ve ekstraksiyon basamaklarından sonra, yağ asitleri elde edilmiş, aynı şartlar altında analizleri laboratuvarımızda yapılan standart suşlar ile kıyaslanarak identifikasyon çalışmaları tamamlanmıştır (Nazina ve ark., 2001; Markosian ve ark., 2000; Ferreira ve ark., 1999).

Yağ asitlerinin eldesi

Her bir suş 40 µg olarak steril cam tüpler içine steril öze ve hassas terazi kullanılarak tartılmıştır. Saponifikasyon: 1ml Ayıraç I den aktarılıp, 5-10 defa vortekste karıştırılarak, 5 dakika 100°C'de beklenmiş, 5-10 defa vortekslenmiş, 100°C'de 25 dakika beklenilmiş ve hemen soğutulmuştur.

Metilasyon: 2 ml ayıraç II ilave edilmiştir, 5-10 defa vortekslenilmiştir, 80°C'de 10 dakika beklenilmiştir, hemen soğutulmuştur.

Ekstraksiyon: 1.25 ml ayıraç III ilave edilmiştir 10 dakika yatay karıştırıcıda karıştırılmıştır, alt faz uzaklaştırılmıştır.

Yıkama: 3 ml ayıraç IV ilave edilmiştir, 5 dakika yatay karıştırıcıda karıştırılmıştır, üst fazın 2/3'ü gaz kromatografisi analizi için kullanılan şişelere elde edilen yağ asitleri aktarılmıştır.

İzolasyon basamaklarından sonra elde edilen yağ asitleri +4 derecede saklanmıştır.

Yağ asidi analizleri, Sherlock Microbial Identification System ile cihaz şartlarına göre yapılmıştır.

Plazmid izolasyonu

250 ml erlen içine konulan 100 ml besiyerine tek koloniden ekim yapılmış, 225 devir/dk da bir gece üremeye bırakılmıştır. Üreyen kültürden 5 ml alınıp 5000 rpm de 4°C'de 10 dk santrifüjlenilmiştir. Süpernetant atılmıştır. Çökelti üzerine 1ml TE konularak süspansiyon edilmiştir. 10000 rpm de 4 °C'de 5dk santrifüjlenilmiştir. Süpernetant atılmıştır. Çökelti üzerine 100 µl solüsyon I eklenilmiştir. Vortekste karıştırılarak süspansiyon haline getirilmiştir. 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üzerine 200 µl solüsyon II eklenilmiştir. Karıştırılmış ve 10 dk buzda bekletilmiştir. 150 µl soğuk solüsyon III eklenilmiştir, karıştırılmış ve 10 dk buzda bekletilmiştir. 10000 rpm de 4 °C'de 5 dk santrifüjlenilmiştir. Süpernetant temiz tüpe alınarak 2 hacim etanol eklenilmiştir 5 dk oda ısısında beklenilmiştir. 15000 rpm de 4°C'de 20 dk santrifüjlenilmiş, süpernetant atılmıştır. Çökelti kuruyuncaya kadar oda ısısında bekletilmiştir. Çökelti üzerine RNaz içeren 50 µl TE eklenip süspansiyon haline getirilmiştir. Jele yüklenmeden önce 4°C'de saklanmıştır (Olgun 1999).

Erime noktası (Tm) değerinin tespiti ile % G+C oranının tespit edilmesi

DNA 0,1X standart salin sitrat içinde çözülmüş, her 100 ml örnek için, 5 mg RNaz ile 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. RNaz ve ortamda bulunabilecek az miktardaki DNaz, 80°C'de 10 dk ısıtılarak inaktive edilmiştir. Daha sonra 1/10 oranında % 2'lik deoxycyholat ile 37°C 1 saat muamele edilmiş ve 1gece 4°C'de bekletilmiştir. DNA saflaştırılması için 45,000 X g 'de 40 saat sezyum klorid saflaştırılması yapılmıştır (1mgSezyum klorid/1ml DNA için, 0.2 mg/ml etidyum bromid). Oluşan DNA tabakası 0.1X SSC bulunan temiz bir tüpe alınmış, butan-2-ol ile etidyum bromür uzaklaştırılmıştır. DNA dializ edildikten sonra, termal spektrofotometre kullanılarak elde edilen verilerden oluşturulan absorbans/sıcaklık grafiğinden erime noktası saptanmış, erime noktası değerlerine

göre baz dizilimindeki % G+C oranı ($2.08 \times T_m - 106.4$) belirlenmiştir (Oven ve Lapage 1972).

Ribo tiplendirme

Örnek solüsyonundan 200 µl alınarak epedorf tüpüne aktarılmıştır. Thermus besi ortamında 70⁰C'de 24 saat geliştirilen kültürlerden solüsyon içine alınarak beş defa karıştırılmış, tüplerin kapakları kapatılmıştır. Örnek tüpleri dikkatlice rak içine yerleştirilmiş, tüpten alınan 30 µl örnek cihazın kuyucklarına aktarılmıştır. Örnekler 25 saniye ısıtılmış, üzerine 5 µl ayıraç A ve 5 µl ayıraç B ilave edilmiş ve daha sonra Ribo Printer sistemi içne yerleştirilerek, analiz yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Termofilik Basillerin Morfolojik Özelliklerine Göre Tanımlanması

Afyon İli, Gazlıgöl, Gecek, Ömerli ve Hüdai, Kütahya İli Eynal ve Gediz, Eskişehir İli Sarıcakaya kaplıcalarından her bir kaynaktan dörder defa ve Denizli İli, Kızıldere kaplıcasından bir defa alınan su örnekleri besi yeri 74 ve nutrient broth Sulfolobus besi yeri, Sulfolobus solfataricus besi yeri, Acidianus brierleyi besi yeri, Acidianus infernus besi yeri, Pyrobaculum besi yeri, Pyrococcus besi yeri, içinde, 28°C, 37°C, 55°C, 65°C, 70°C, 75°C ve 80°C sıcaklıklarda, aerobik ve anaerobik olarak inkübasyona tabi tutulmuş, gelişme gözlenen aerobik kültürlere gram boyama yapılmıştır. Yapılan mikroskopik incelemede 75°C ve altındaki sıcaklıklarda inkübe edilen kültürlerde Gr(+), 75°C'nin üzeri sıcaklıklarda inkübe edilen kültürlerde Gr(-) basillerin çok yoğun üredikleri gözlenmiştir.

Yine, Sulfolobus besi yeri, Sulfolobus solfataricus besi yeri, Acidianus brierleyi besi yeri, Acidianus infernus besi yeri, Pyrobaculum besi yeri, Pyrococcus besi ortamlarına inoküle edilen su örnekleri hem anaerobik jar içinde hem de 30 dakika süre ile CO₂ ve N₂ gazı verilerek bekletildikten sonra, 80°C'de inkübasyona bırakılmış ve 1., 2., 3., 5., 7., gün inkübasyon sonucunda Gr boyama ile incelenmiş ancak, hiçbir kültürde gelişme olmadığı gözlenmiştir. Aynı su örnekleri 80°C'de 5 gün süre ile besi yeri 88'de inkübe edildiğinde Eynal kaplıcasından alınan su örneğinde Gr(-) basillerin geliştiği gözlenmiştir. Bu kültürler kontrol suşu olarak kullandığımız Pyrobaculum islandicum ile morfolojik olarak çok yakın benzerlik göstermiş ancak, sıvı kültürden plak ortamına ekim yapılarak saf koloniler izole edilememiştir. Archaea'ya ait türlerin izolasyonu için yapılan çalışmaların tümünde her bir kaynaktan farklı mevsimlerde dörder örnek alınmış ancak, hiç birinden bakteri izolasyonu yapılamamıştır.

65 ve 75°C'de üreme gözlenen sıvı kültürlerden alınan örnekler, plak kültürlerine çizgi ekim yapılarak tek koloniler elde edilmiştir. İnceleme için seçilen kolonilerden, sekizi Gazlıgöl, yedisi Gecek, on beşi Ömerli, on yedisi Hüdai, altısı

Gediz, dördü Kızıldere, beşi Eynal, ikisi Sarıcakaya kaplıcalarından sağlanmış, saflaştırılan suşlar gram reaksiyonlarına göre pozitif ve negatif olarak ayrılmıştır.

İzolatlardan 57 adeti Gr(+), 6 adeti Gr(-) özellik göstermiştir. İzolatlarımızın plak kültür üzerindeki koloni özellikleri incelenmiş 57 adet Gr(+) suşta dokuz, altı adet Gr(-) suşta altı farklı koloni şekli saptanmıştır.

İzole edilen suşların koloni özellikleri

Gr(-) özellik gösteren suşlar besi ortamı 74 plakları üzerinde geliştirilmiş, 101 numaralı suşun 1-1,5 mm çaplı, turuncu pembe koloni, 331 ve 333 numaralı suşlar 2-3 mm çaplı, açık sarı koloni, 335, 385 suşlarının 2 mm çaplı koyu sarı koloni, 337 numaralı suşun ise 2-3 mm çaplı sarı turuncu koloni oluşturduğu tespit edilmiştir. 101 nolu suş hariç diğer suşlarda çalkalanmadan da üreme gözlenmiştir. 331, 333, 337, 385 numaralı suşlar 70-75⁰C'de 225 rpm çalkalamada 24 saatte optimum gelişme göstermiştir. 385 numaralı suş maksimum 83⁰C'de gelişme göstermiştir. Gazlıgöl den izole edilen 101 suşu optimum 60⁰C'de 225 rpm çalkalamada 24 saatte gelişme göstermiş, 70⁰C'de çok zayıf üreme gözlenmiştir. İzolatlardan bazılarının mikroskopik şekilleri Şekil 3.1-3.24 de verilmiştir.

Gr(+) suşlar ise farklı özellik gösterenler seçilmiş koloni özellikleri incelenmiş, buna göre, Gg04 ve Gd12 ve Gg18'in iç içe geçmiş üç halka ve etrafında şeffaf zon oluşturan krem rengi 1,5-2,5 mm çaplı koloni oluşturdıkları, Gg13, Gg03, E02, E04, E06, Gd01, H05 suşlarının iç içe geçmiş iki halka ve beyaz zon bulunan 2-2,5 mm çaplı koloni, Gg07, H08, H18, H12, H07, H09, Gc02 suşlarının beyaz, iç içe geçmiş üç halkadan oluşmuş, şeffaf zon bulunan koloni, H01, H02, H03, H04, suşlarının, iç içe geçmiş iki halka şeklinde görünen beyaz zon bulunduran koloni, H16, Ö03, Gd07, Gd13 suşlarının sarımsı krem renginde 1-1,5mm çapında koloni, Gc01 ve Gc21 suşlarının ortası beyaz kenarı çok ince şeffaf zonlu koloni, Gc03 ve Gc22 suşları 0,5-1mm çaplı süt kesigi gibi görünen koloni, H20, H21, H22, S01, S02, suşlarının, sarı-krem renginde zonsuz koloni, E09 suşunun küçük, 0,5-1mm şeffaf zonsuz koloni, Ö05, Ö4, Ö02 suşunun mat zonsuz 1-1,5 mm çaplı koloni, Ö06, Ö08, Ö10 suşunun süt kesigi

gibi görünen 5-6 mm çaplı iç içe geçmiş üç halka şeklinde görünen koloniler, K01, K41, K42, K43 suşlarının beyaz, üç halkalı, şeffaf zonlu koloniler, Gd53, Gd58 suşlarının sarımsı krem renginde zonsuz koloniler oluşturduğu gözlenmiştir.

3.2. Biyokimyasal Test Sonuçlarına Göre Termofil Bakterilerin Tanımlanması

Nutrient broth ve Besi yeri 74 içinde üreme gösteren Gr(-) ve Gr(+) suşlara biyokimyasal testler uygulanmış, farklı suşlara ayrılmaya çalışılmıştır. Sonuçlar Gr(+) suşlar için çizelge 3.1, 3.2., 3.4.,3.5., 3.6., Gr(-) suşlar için çizelge 3.7’de verilmiştir.

Test edilen suşların hepsinde indol negatif olduğu saptanmıştır. Metil kırmızısı testinde ise Ö06, Ö10, H01, H03, H14, H16, H18, Gd53, Gd58, Gd11, K41, E02, E06, E09, E10 suşları negatif, H21 suşu değişken, diğer suşlar ise pozitif sonuç vermiştir. Voges-Proskauer testi sonucunda K41 suşu değişken diğer suşlar negatif reaksiyon göstermiştir. İzolatlara uygulanan sitrat testleri sonucunda Gazlıgöl’den izole edilen Gg03, Gg13, Gecek kaplıcası örneklerinden Gc01, Gc02, Gc03, Gc21, Gc22, Gc24, Ömerli kaplıcasından izole edilen, Ö02, Ö04, Ö10, Hüdai kaplıcasından izole edilen H21, H22, Gediz kaplıcasından izole edilen Gd02, Gd10, Gd11,Gd12, Kızıldere kaplıcasından izole edilen K01, Eynal ve Sarıcakaya kaplıcalarından izole edilen örneklerin tümünde, pozitif sonuç elde edilmiş, Gg07 ve K41 suşları ise değişken sonuçlar göstermişlerdir (Çizelge 3.1, 3.2., 3.4.,3.5., 3.6.). Nitrat testinde ise 14 suş pozitif sonuç verirken, Gd58 değişken, Gg03, Gg07, Gg18, Gc02, Ömerli’den izole edilen örneklerin tümü, Hüdai kaplıcasından izole edilen H01, H02, H07, H08, H09, H12, H14, H16, H18, H22, H26, Gd02, Gd10, Gd11, Gd12, K01, K41, K43, E06, E09 suşları ve Sarıcakaya’dan izole edilen örneklerin tümünde negatif sonuç alınmıştır.

İzolatlarda Gg07, Gc02, Ö04, Gd10, K01, K41 suşlarının H₂S oluşturduğu gözlenirken, diğer 41 suşun negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

İzole edilen 57 suşun üre kullanımı araştırılmış, Gazlıgöl Gg12, Ö06, Ö08, Ö12, Ö13, Ö14, H01, H02, H03, H09, H12, H16, H22, H20, Ömerli’den izole

edilen Gd10, Gd11, Gd52, Gd53, K43, E06, S01 suşlarında üre kullanımı olmadığı saptanmıştır.

Nutrient broth ortamından izole edilen 57 Gr(+) suşdan hiçbirisi 28°C'de üreme göstermemiş, 37°C'de yapılan inkübasyon sonucunda ise Gg04, Gg12, Gg13, Gg18, Gg25, H01, H07, H16, H20, Gd02, Gd53, Gd58, suşları yoğun, H03, H04, H09, K42, S01 suşlarında zayıf üreme olduğu saptanmıştır. 55°C ve 65°C'de yapılan inkübasyonlarda bütün suşların ürediği 70°C'de E09, Ö02, Ö04 ve H22 hariç diğer suşların ürediği, 75°C'de Gg04, Gg18, Gc24, Gd12, suşlarının yoğun, Gc01, Gc21, Ö08, H01, H02, H03, H04, H05, H07, H08, H12, H14, H16, H21 suşlarının zayıf ürediği tespit edilmiştir. Gr(+) suşların hiçbirisi 80°C'de üreme göstermemiştir (Çizelge 3.1- 3.2- 3.3- 3.4.).

İzole edilen 57 suşun optimum pH ve sıcaklık değerleri 55 ve 65°C arasında değişmiş olup, sonuçlar çizelge 3.1 de verilmiştir.

İzolatlara uygulanan farklı pH'larda gelişme testleri sonucunda bütün suşlar pH 6 ve pH 7'de üreme gösterirken, Gecek kaplıcasından izole edilen Gc22 ve Hüdai Kaplıcasından izole edilen H05 ve H26, suşları pH 4'den pH 8'e kadar olan farklı pH aralıklarında üreme göstermiş, Gc22, H02, H03, H04, H05, H07, H12, H08, H26, Gd53, Gd58, K42 suşları pH 4 de üreme gösterirken, 57 izolattan 39'unda pH8'de üreme olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.2- 3.3-3.4-3.5.).

İzole edilen suşlara yapılan NaCl'de büyüme testleri sonucunda elli yedi izolattın tamamı % 3 tuz içeren ortamda gelişmemiştir.

İzolatlara uygulanan farklı karbonhidrat kaynaklarını kullanımı testleri sonucunda ise, Gazlıgöl den izole edilen suşlardan hiçbirinin ksiloz, mannitol, sorbitol, ve arabinozu kullanmadığı, ancak, maltoz, fruktoz, ve glikozu hepsinin kullandığı, sakkarozu ise yalnızca Gg04'ün kullanmadığı, Gg07, Gg12, Gg13 suşlarının değişken sonuç verdiği, diğerlerinin pozitif sonuç gösterdiği saptanmıştır. Gecek'den izole edilen yedi adet izolattın tamamının, glukoz ve fruktoz pozitif, mannitol ve sorbitol negatif, Gc22, Gc24, Gc25 suşlarının ise sorbitol ve arabinoz için değişken sonuç verdiği saptanmıştır. Ömerli'den izole edilen on adet izolattan tamamı glikoz, maltoz, fruktoz pozitif, Ö02, Ö04, Ö35 ksiloz pozitif, Ö05 ve Ö08 değişken, diğerleri negatif sonuç göstermiştir. Ö14

suşu sorbitol pozitif diğer bütün suşlarda negatif sonuç saptanmıştır. Hüdei'den izole edilen on yedi adet izolattan tamamı glikoz pozitif, ksiloz negatif, sekizi sakkaroz üçü mannitol, beşi sorbitol, biri arabinoz, on üçü maltoz, pozitif sonuç göstermiş, altı adet suşun fruktozu kullanamadığı saptanmıştır. H01, H02, H16 suşları mannitol testlerine değişken sonuç gösterirken H01 ve H16 suşları sorbitol H14 suşunun da fruktozu zayıf olarak kullandığı tespit edilmiştir. Gediz kaplıcasından izole edilen altı adet suşun tamamında glikoz, maltoz ve fruktoz, dördünde sakkaroz, üçünde mannitol, ikisinde sorbitol, pozitif sonuç saptanmış, Gd02, ksiloz ve sakkarozla değişken sonuç vermiş diğer şekerlerin kullanımında tüm suşlarda negatif sonuç saptanmıştır. Kızıldere den alınan su örneğinden dört adet suş izole edilmiştir. Bu suşlardan tamamı glikoz ve maltoz, üçü sakkaroz, ikisi sorbitol pozitif, K01 fruktoz ve arabinozu, K42 fruktozu kullanma testlerine değişken sonuç göstermiştir. Eynal'dan izole edilen beş adet izolattan tamamı glikoz, mannitol, maltoz ve fruktozu kullanmış, E10 ksiloz pozitif, E02'de ise ksiloz ve sakkaroz pozitif sonuç saptanmış, diğer suşlarda ksiloz, ve sakkaroz negatif olarak tespit edilmiş, sorbitol ve arabinoz kullanımı hiç olmamıştır. Sarıcakaya'dan izole edilen iki adet suş glikoz ve fruktoz pozitif, S02'de maltoz pozitif sonuç saptanmış, diğer suşların tamamında negatif test sonucu saptanmıştır (Çizelge 3.1., 3.2., 3.3., 3.4., 3.5., 3.6,).

Gr(+) basillerin tamamında anaerobik büyüme olmuş ancak, *Archaea* izolasyonu için kullanılan spesifik besi ortamlarında, anaerobik jar içinde yapılan inkübasyonlarda ise büyüme gözlenmemiştir.

Selülaz aktivitesi incelenen suşlardan, Gc01, Gc02, Gc21, Ö04, Ö10, Gd10, K43 örneklerinde pozitif aktivite saptanırken, 50 örnekte selülaz aktivitesi gözlenmemiştir (Çizelge 3.1., 3.2., 3.3., 3.5., 3.6).

Çizelge 3.1. Gram pozitif suşların biyokimyasal test sonuçları. +: %90 yada daha fazla suş pozitif sonuç, -:%10 negatif Negatif sonuç d: %11-89 pozitif sonuç, Z: zayıf üreme.İzole edilen suşlar, izolasyon yerine göre kodlanmıştır. Gazlıgöl Gg, Gecek Gc, Ömerli Ö, Hüdai H, Eynal E, Gediz Gd, Sarıcakaya S, Kızıldere K

| | Gg03 | Gg04 | Gg07 | Gg12 | Gg13 | Gg14 | Gg18 | Gc01 | Gc02 | Gc03 |
|----------------------|-------|----------|----------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|-------|
| Hücre Boyutu | 2-4µm | 2-3µm | - | - | - | - | - | 5 µm | 2-3µm | 3-2µm |
| Gr boyama | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| İndol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MR | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| VP | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sitrat | + | - | d | - | + | + | - | + | + | + |
| Nitrat | - | + | - | + | - | - | + | - | + | - |
| Katalaz | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + |
| H2S üretimi | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - |
| Üre | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| 28°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 37°C | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - |
| 55°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 65°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 70°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 75°C | - | + | - | z | - | - | + | z | - | - |
| 80°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| pH 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| pH-5 | - | Z | - | z | - | - | z | - | - | - |
| pH-6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pH-7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pH-8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| NaCl-%1 | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| NaCl-%2 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| NaCl-%3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glikozdan gaz | - | + | - | - | - | - | + | + | - | + |
| Glikoz | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ksiloz | - | - | - | - | - | - | - | - | d | - |
| Sakkaroz | + | - | d | d | d | + | + | + | - | - |
| Mannitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sorbitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arabinoz | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Maltoz | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fruktoz | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Opt. pH | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| Opt. sıcaklık | 55-60 | 60-65 | 55-60 | 60 | 55-60 | 55-60 | 60-65 | 55-60 | 50-60 | 55-60 |
| Anaerobik by. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Selülaz akt. | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - |

Çizelge 3.2. Gram pozitif suşların biyokimyasal test sonuçları. +: %90 yada daha fazla suş pozitif sonuç, -:%10 negatif Negatif sonuç d: %11-89 pozitif sonuç, Z: zayıf üreme.İzole edilen suşlar, izolasyon yerine göre kodlanmıştır. Gazlıgöl Gg, Gecek Gc, Ömerli Ö, Hüdai H, Eynal E, Gediz Gd, Sarıcakaya S, Kızıldere K

| | Gc21 | Gc22 | Gc24 | Gc25 | Ö02 | Ö04 | Ö05 | Ö06 | Ö08 | Ö10 |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | 2.5µm | 2 µm | 4-2µm | 6µm | 5-6µm | |
| Gr boyama | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| İndol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MR | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - |
| VP | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sitrat | + | - | + | + | + | + | - | - | - | + |
| Nitrat | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Katalaz | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| H₂S üretimi | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Üre | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| 28°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 37°C | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 55°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 65°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 70°C | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| 75°C | z | - | + | - | - | - | - | - | z | - |
| 80°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PH-4 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PH-5 | - | + | z | z | - | - | z | - | - | - |
| PH-6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PH-7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PH-8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| NaCl-%1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| NaCl-%2 | + | z | + | + | - | + | - | - | + | - |
| NaCl-%3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glikozdan gaz | + | - | + | + | + | - | - | - | + | + |
| Glikoz | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ksiloz | - | - | - | - | + | + | d | - | d | - |
| Sakkaroz | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Mannitol | - | d | - | - | d | - | + | - | + | + |
| Sorbitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arabinoz | - | - | d | d | - | - | - | - | - | - |
| Maltoz | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fruktoz | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Opt. pH | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 |
| Opt. sıcaklık | 55-60 | 55-60 | 60-65 | 55-60 | 55-60 | 55-60 | 55-60 | 55-60 | 55-60 | 55-60 |
| Anaerobik by. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Selülaz akt. | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + |

Çizelge 3.5. Gram Negatif Suşların Biyokimyasal test sonuçları. +: %90 yada daha fazla suş pozitif sonuç, -:%10 negatif Negatif sonuç d: %11-89 pozitif sonuç, Z: zayıf üreme. İzole edilen suşlar, izolasyon yerine göre kodlanmıştır. Gazlıgöl Gg, Gecek Gc, Ömerli Ö, Hüdai H, Eynal E, Gediz Gd, Sarıcakaya S, Kızıldere K

| | H26 | Gd02 | Gd10 | Gd12 | Gd53 | Gd58 | Gd11 | K01 | K41 | K42 |
|----------------------|----------|----------|----------|----------|-------|----------|-------|----------|----------|----------|
| | | | 2-3µm | 5 µm | | | | 3-2µm | | |
| Gr boyama | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| İndol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MR | + | + | d | + | - | - | - | + | - | + |
| VP | - | - | - | - | - | - | - | - | d | - |
| Sitrat | - | + | + | + | - | - | + | + | d | - |
| Nitrat | - | - | - | - | + | d | - | - | - | + |
| Katalaz | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| H2S üretimi | - | - | + | - | - | - | - | + | + | - |
| Üre | + | z | - | + | - | - | - | + | + | + |
| 28°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 37°C | - | + | - | - | + | + | - | - | - | z |
| 55°C | z | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 65°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 70°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 75°C | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 80°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PH-4 | + | - | - | - | + | + | - | - | - | + |
| PH-5 | + | - | - | - | + | + | - | - | - | + |
| PH-6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PH-7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PH-8 | z | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| NaCl-%1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| NaCl-%2 | - | + | + | Z | - | - | - | + | + | + |
| NaCl-%3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glikozdan gaz | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glikoz | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ksiloz | - | d | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sakkaroz | + | d | + | + | + | + | - | - | + | + |
| Mannitol | + | - | - | + | - | + | + | - | - | - |
| Arabinoz | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sorbitol | - | - | - | - | + | + | - | d | + | + |
| Maltoz | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fruktoz | + | + | + | + | + | + | + | d | + | d |
| Opt. pH | 6-7 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 6-8 | 6-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 6-8 |
| Opt. sıcaklık | 55-65 | 55-65 | 55-65 | 55-65 | 55-65 | 55-65 | 55-65 | 55-65 | 55-65 | 55-65 |
| Anaerobik by. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Selülaz akt. | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |

Çizelge 3.6. Gram pozitif suşların biyokimyasal test sonuçları. +: %90 yada daha fazla suş pozitif sonuç, -:%10 negatif Negatif sonuç d: %11-89 pozitif sonuç, Z: zayıf üreme. İzole edilen suşlar, izolasyon yerine göre kodlanmıştır. Gazlıgöl Gg, Gecek Gc, Ömerli Ö, Hüdai H, Eynal E, Gediz Gd, Sarıcakaya S, Kızıldere K

| | K43 | E02 | E04 | E06 | E10 | E09 | S01 | S02 |
|-------------------------------|----------|----------|-------|-------|-----|-------|----------|-------|
| Hücre boyutu | - | 4-5µm | 3-4µm | - | - | - | - | 2-3µm |
| Gr boyama | + | + | + | + | + | + | + | + |
| İndol | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MR | + | - | + | - | - | - | + | + |
| VP | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sitrat | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Nitrat | - | + | + | - | - | + | - | - |
| Katalaz | + | + | + | + | + | + | + | + |
| H₂S üretimi | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Üre | - | + | + | - | - | + | - | + |
| 28°C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 37°C | - | - | - | - | - | - | Z | - |
| 55°C | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 65°C | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 70°C | + | + | + | + | + | - | + | + |
| 75°C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 80°C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PH-4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PH-5 | - | - | - | - | - | - | Z | - |
| PH-6 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PH-7 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PH-8 | - | + | + | + | + | + | + | + |
| NaCl-%1 | + | + | + | + | + | - | + | + |
| NaCl-%2 | + | - | - | - | - | - | + | + |
| NaCl-%3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glikozdan gaz | - | + | + | - | - | + | - | - |
| Glikoz | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ksiloz | - | d | - | - | - | + | - | - |
| Sakkaroz | + | d | - | - | - | + | - | - |
| Mannitol | - | + | + | + | + | + | - | - |
| Sorbitol | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arabinoz | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Maltoz | + | + | + | + | + | + | - | + |
| Fruktoz | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Opt. pH | 6-7 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 | 7-8 |
| Opt. sıcaklık | 55-60 | 55-60 | 55-60 | 55-60 | 60 | 55-60 | 55-60 | 55-60 |
| Anaerobik by. | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Selülaz akt. | z | - | - | - | - | - | - | - |

Besi ortamı 74'de 75⁰C'de gelişme gösteren 6 adet Gr(-) suşun biyokimyasal test sonuçları çizelge 3.7. de verilmiştir.

Gram (-) 6 adet izolatin tamamı sitrat, indol, metil-kırmızısı testlerinde negatif reaksiyon göstermişlerdir, bu suşlar pH5'de % 2 ve % 3 NaCl de ürememişler ve sorbitolü karbon kaynağı olarak kullanmamışlardır. Katalaz, H₂S üretimi, glikoz, maltoz, sakkaroz, salisin, galaktozu, karbon kaynağı olarak kullanımı testlerine pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Bu suşların 65, 70, 75⁰C'de geliştiği ve pH6, % 1 NaCl'de üreme gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 3.7.).

Gazlıgöl'den izole edilen 101 suşu optimum 60⁰C'de üreme göstermiş, 70⁰C'de zayıf üremiş, Ömerli'den izole edilen 331 suşu, % 1 NaCl de üreme göstermemiş, 337 suşu ise sorbitol dışında bütün karbon kaynaklarını kullanmıştır, 335 suşu 37 ve 80⁰C arasındaki bütün sıcaklıklarda üreme göstermiş, 385 suşu maksimum 83⁰C'de üremiş, 337 numaralı suşun ise, 70⁰C'de çalkamalı kültürde diğerlerine oranla daha yoğun üreme gösterdiği saptanmıştır.

Bütün suşlara Gram boyama yapılmasına rağmen tamamının hücre ölçümleri ve fotoğraf çekimleri yapılmamıştır. Fotoğraf çekimi ve hücre büyüklüklerinin ölçümü için suşların seçimi, izolatların biyokimyasal test sonuçlarına göre yapılmıştır (Şekil 3.1-24). Buna göre diğerlerinden tamamen farklı özellik gösteren 25 adet bakteri seçilmiş, fotoğraflanmış ve ışık mikroskopunda 100 lük objektif kullanılarak, mikroskobik ölçümleri yapılmıştır.

İzole edilen suşlardan farklılık gösteren 19 adetine VITEC testleri uygulanmış, sonuçlar cihaz içinde mevcut olan standart kültür sonuçları ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda Gg03, Gg04, Gg07, Gc02, Gc03, H22, Gd02, K01, S02 % 99 benzerlik oranı ile *Bacillus stearothermophilus*, Ö05, Ö08, Ö10, Gd12, E02, E04, E04, % 74-95 oranında *Bacillus thermodenitrifikans* olarak saptanmış Ö06, H24, E06, S01 suşları ise herhangi bir standart kültür sonucu ile benzer sonuç vermemiş, identifiye edilememiştir. İzolatlara uygulanan tüm testlerden elde edilen identifikasyon sonuçları çizelge 3.17 de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Gram Negatif Suşların Biyokimyasal Test sTonuçları. +: %90 yada daha fazla suş pozitif sonuç, -:%10 negatif Negatif sonuç d: %11-89 pozitif sonuç, Z: zayıf üreme. İzole edilen suşlar, izolasyon yerine göre kodlanmıştır. Gazlıgöl 101, Ömerli, 331, 333, 335, 337, 385

| | 101 | 331 | 333 | 335 | 337 | 385 |
|------------------------|---------------|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Hücre boyutu µm | 6-7µm | 3-4µm | 2 µm | 2-3µm | 4-5µm | 2-2.5µm |
| Koloni boy. mm | 1-2 | 2-3 | 2-3 | 2 | 2 | 2-3 |
| Koloni özelliği | Turuncu-Pembe | Şeffaf-mat | Açık sarı opak | Koyu sarı opak | Koyu sarı opak | Koyu sarı opak |
| Gr boyama | - | - | - | - | - | - |
| İndol | - | - | - | - | - | - |
| MR | - | - | - | - | - | - |
| Sitrat | - | - | - | - | - | - |
| Nitrat | - | - | + | - | + | + |
| Katalaz | + | + | + | + | + | + |
| H2S üretimi | + | + | + | + | + | + |
| Üre | + | - | - | - | + | + |
| 37°C | - | - | - | + | - | - |
| 50°C | + | - | - | + | - | - |
| 65°C | + | + | + | + | + | + |
| 70°C | + | + | + | + | + | + |
| 75°C | - | + | + | + | + | + |
| 80°C | - | + | + | + | + | 83° |
| PH-5 | - | - | - | - | - | - |
| PH-6 | + | + | + | + | + | + |
| NaCl-%1 | + | - | + | + | + | + |
| NaCl-%2 | - | - | - | - | - | - |
| NaCl-%3 | - | - | - | - | - | - |
| Glikoz | + | + | + | + | + | + |
| Laktoz | + | + | + | - | + | + |
| Maltoz | + | + | + | + | + | + |
| Sakkaroz | + | + | + | + | z | + |
| Fruktoz | - | - | - | - | + | - |
| Arabinoz | - | - | - | - | + | - |
| Salicin | + | + | + | + | z | + |
| | + | - | + | z | z | - |
| Rafinoz | | | | | | |
| Galaktoz | + | z | z | + | + | + |
| Sorbitol | - | - | - | - | - | - |
| Opt. pH | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| Opt. sıcaklık | 60 | 75 | 75 | 75 | 75 | 75 |
| Anaerobik by. | - | z | z | z | z | z |



Şekil 3.1. S02 *Ge. Stearothermophilus*
(VITEC) (Büyütme 100X)



Şekil 3.2. Ö08 (Büyütme 100X)



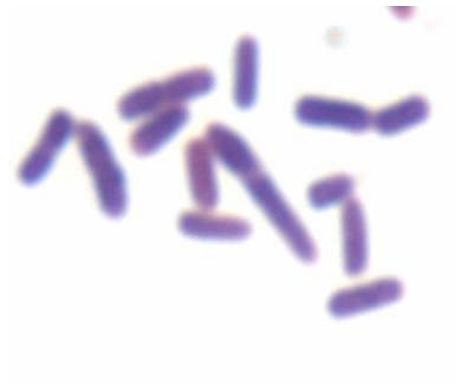
Şekil 3.3. K01 *Ge. Stearothermophilus*
(VITEC) (Büyütme 100X)



Şekil 3.4. E02 *Ge. Thermodenitrificans*
(VITEC) (Büyütme 100X)



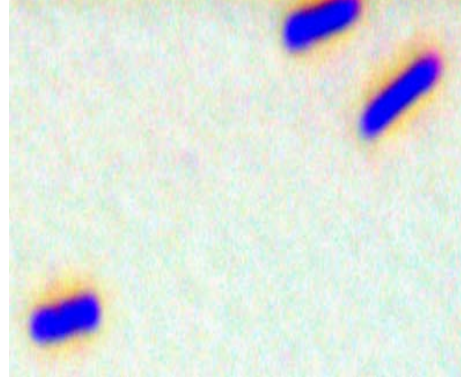
Şekil 3.5. Gg02 (Büyütme 100X)



Şekil 3.6. Gc01 (Büyütme 100X)



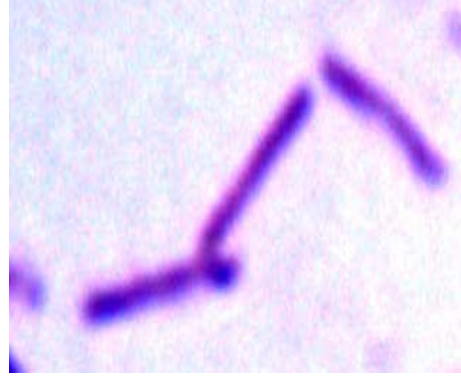
Şekil 3.7. H24 İdentifiye edilememiş suş (VITEC, SDS-PAGE, GC) (Büyütme 100X)



Şekil 3.8. Gg03 *Ge.stearothermophilus* (VITEC) (Büyütme 100X)



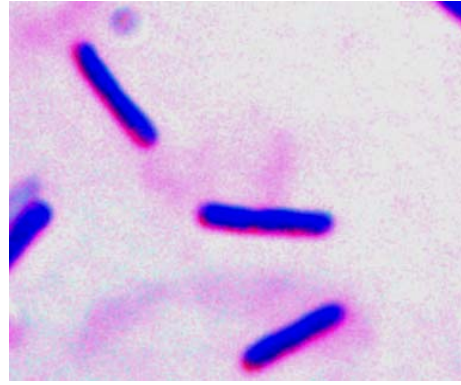
Şekil 3.9. H22 *Ge.stearothermophilus* (VITEC) (Büyütme 100X)



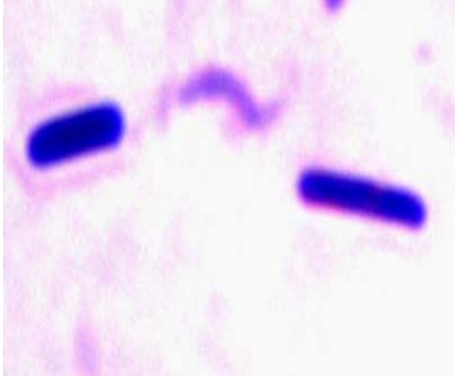
Şekil 3.10. Gd12 *Ge.thermodenitrificans* (VITEC) (Büyütme 100X)



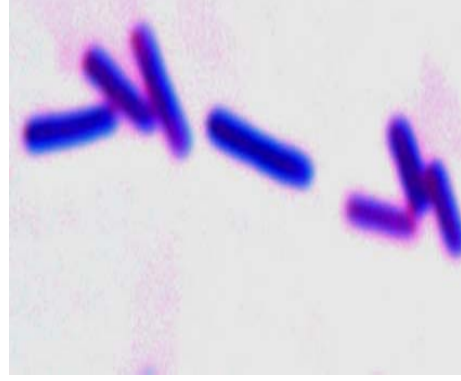
Şekil 3.11. H21 (Büyütme 100X)



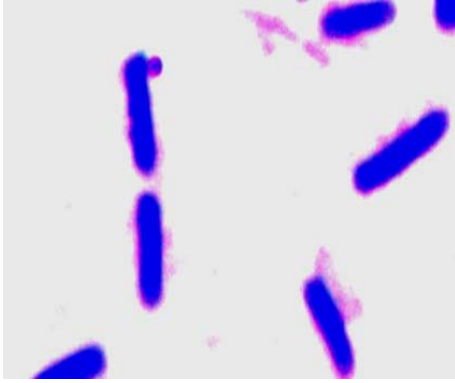
Şekil 3.12. Gd10 (Büyütme 100X)



Şekil 3.13. Gc03 *Ge.stearothermophilus* (VITEC) (Büyütme 100X)



Şekil 3.14 Ö02 (Büyütme 100X)



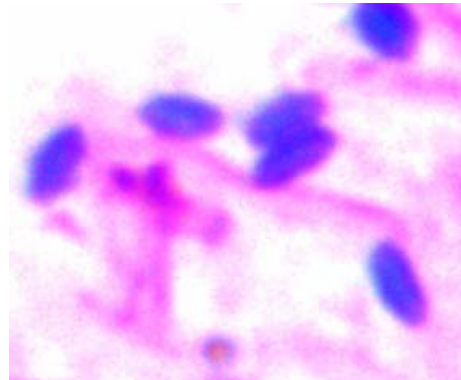
Şekil 3.15 Gc02 *Ge.stearothermophilus* (VITEC) (Büyütme 100X)



Şekil 3.16. Ö04 (Büyütme 100X)



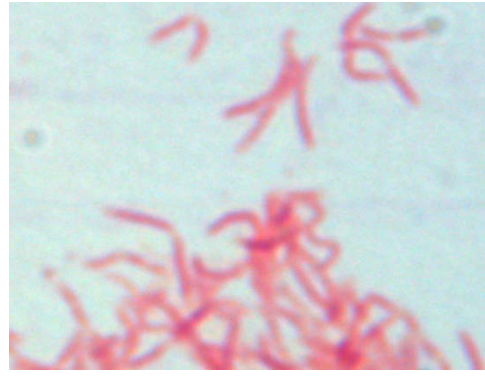
Şekil 3.17. E02 *Ge thermodenitrificans* (Büyütme 100X)



Şekil 3.18. Ö06 İdentifiye edilememiş suş (VITEC) (Büyütme 100X)



Şekil 3.19. 333 (*Thermus* sp.) (Büyütme 100X)



Şekil 3.20. 385 (*Meiothermus* sp.) (Büyütme 100X)



Şekil 3.21. 337 *Thermus* sp. (Büyütme 100X)



Şekil 3.22. 101 *Meiothermus* sp. (Büyütme 100X)



Şekil 3.23. 331 *Thermus* sp. (Büyütme 100X)



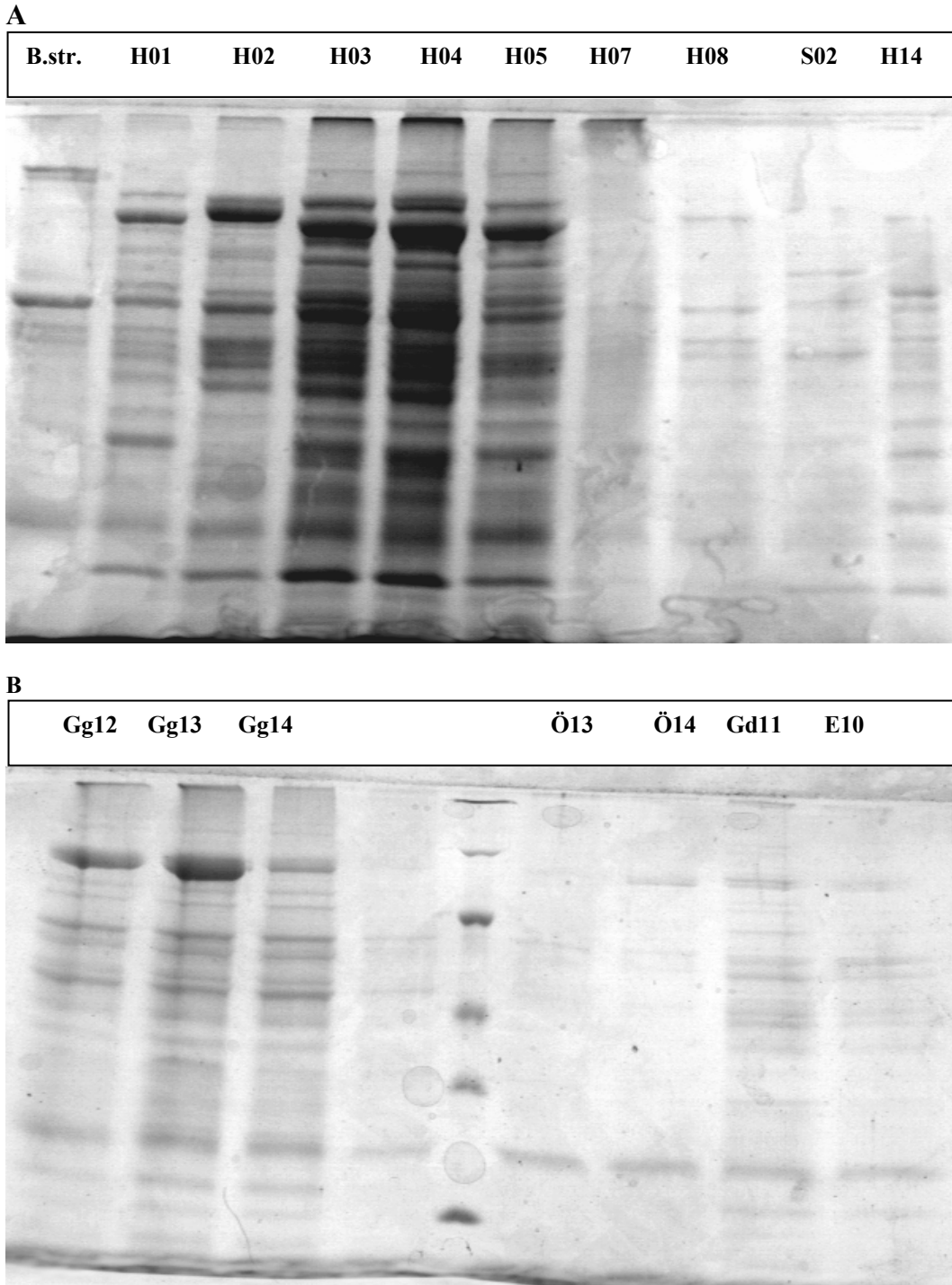
Şekil 3.24. 335 (*Thermus* sp.) (Büyütme 100X)

Biyokimyasal testleri tamamlanan izolatlardan 19 adet Gr(+) suş ve 6 adet Gr(-) suşun boyutları ölçülmüş ve fotoğrafları çekilmiştir. Gr(+) basiller arasında yapılan incelemede H21 suşunun en uzun, Ö04 suşunun en kısa boyutlarda, Gr(-) basillerde ise 101 numaralı suşun en uzun 333 numaralı suşun en kısa hücre boyutlarında olduğu saptanmıştır (Şekil 3.19, 3.22).

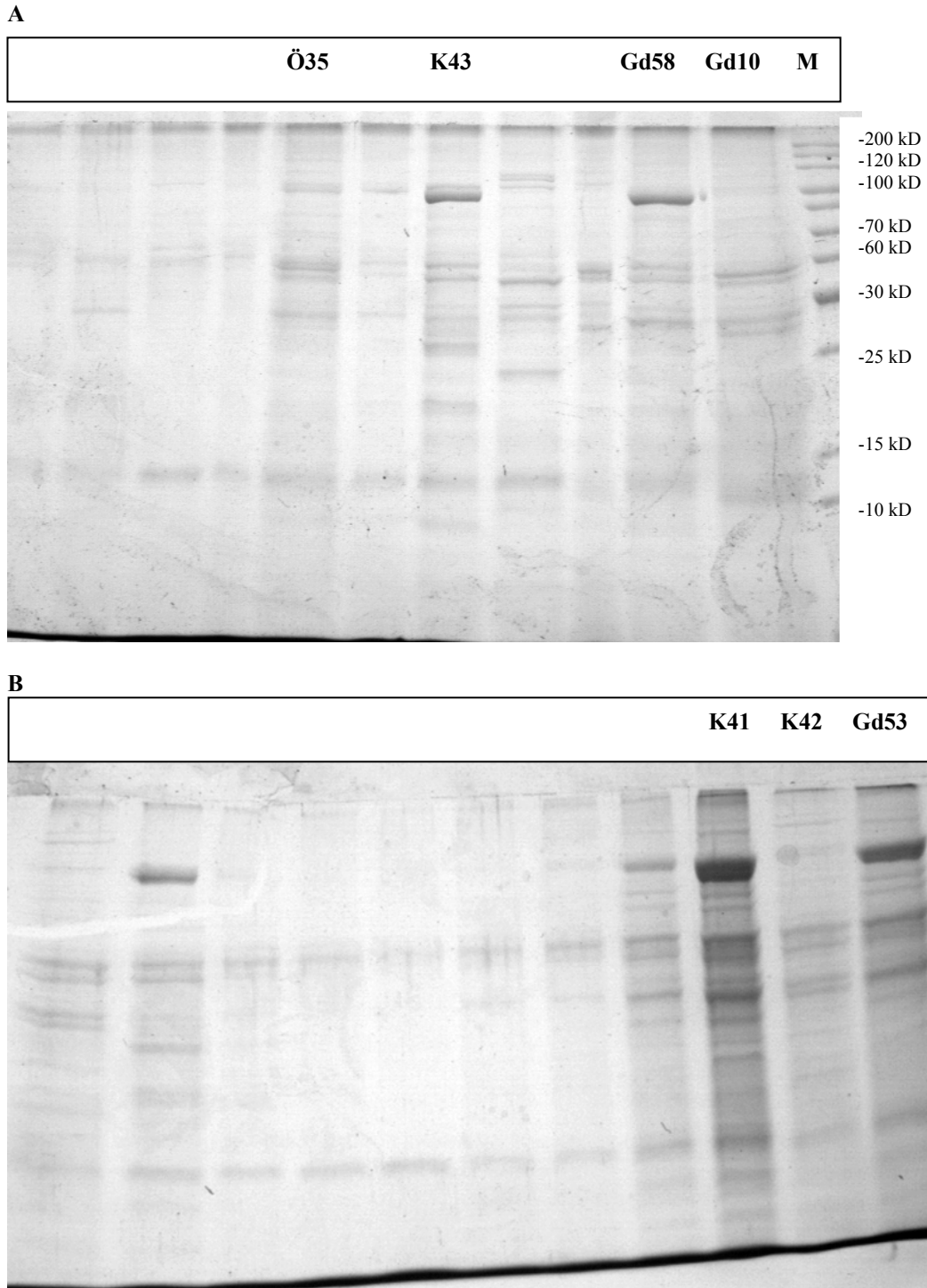
3.3 SDS-PAGE Analizi Sonuçlarına Göre İzolatların Benzerlik Oranlarının Saptanması

İzole edilen Gr(+) suşlardan elde edilen proteinlerin SDS-PAGE analizi sonuçları şekil 3.25., 3.25., 3.27., 3.28., 3.29., 3.30., 3.31., de verilmiştir. Bu sonuçlara göre izolatlarımızın birbirine olan akrabalık oranları tespit edilmeye çalışılmıştır.

Gc02 ve Gc22 suşları birbirine % 90 oranında benzerken *Bacillus stearothermophilus* ile % 85 in üzerinde benzer oldukları gözlenmiş, aynı zamanda bu suşların Gg03 ile % 60 oranında benzediği saptanmıştır. Ö06 ve Ö10 suşlarının birbirlerine benzerlik oranı % 65'in üstünde olmuştur. H14 ve H02 suşları %80 oranında benzerlik gösterirken H08 suşunun da bu suşlara % 70'e yakın değerinde benzediği saptanmıştır. Bu üç örnek ayrıca H07 ve S02 suşları ile de % 60 oranında benzerlik göstermiştir. H03 ve H05 suşları arasındaki benzerlik % 90 iken bu suşların H04 ile olan benzerliği % 85, H01 ile olan benzerliği % 70 oranında saptanmıştır. E09 ve Ö08 suşları arasındaki benzerlik % 50'nin altında olup, diğer suşlarla olan akrabalık oranı ise % 40'ın altında saptanmıştır. Gd12 ve Ö02 suşlarının benzerliği ise, % 75'in üzerinde saptanmış, bu iki suşun Gc03 ile olan benzerliği ise % 60 oranında tespit edilmiştir. *B. cereus*, H18, *B. subtilis*, H12 suşlarının protein değerlerinin % 50'nin altında benzerlik gösterdiği gözlenmiştir, H12 ve H04 suşları da bu suşlara % 40 oranında benzer bulunmuştur.

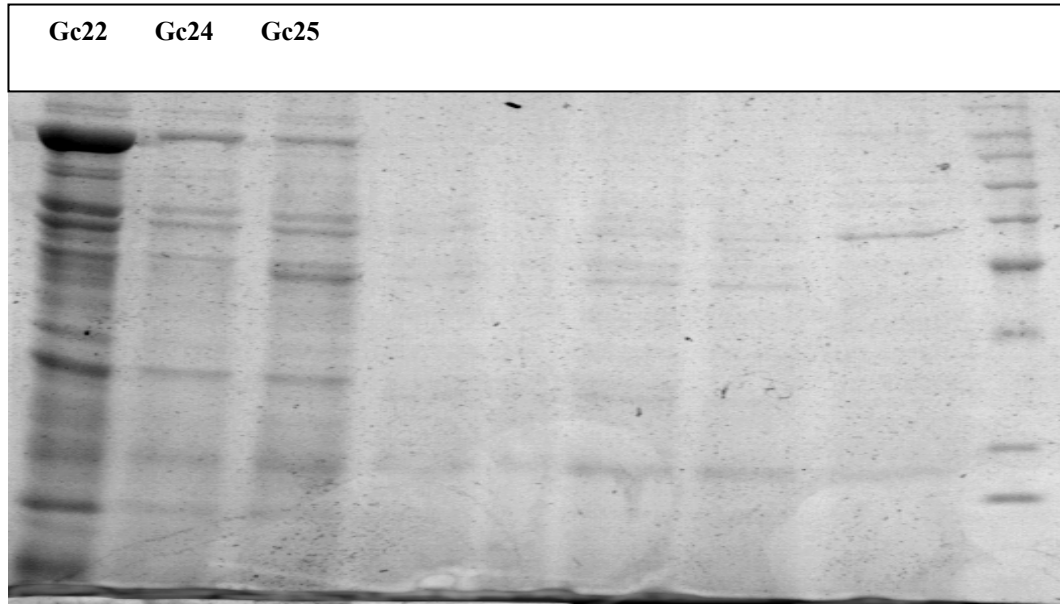


Şekil 3.25. Comassie brillant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları. **A: Jel-1,** *Bacillus stearothermophilus*, Hüdai kaplıcasından izole edilen H.01, H02, H03, H04, H05, H07, H08, H14 ve Sarıcakaya kaplıcasından izole edilen S01 numaralı şuşlar. **B: Jel-2,** Gazlı Göl kaplıcasından izole edilen, Gg 12, Gg13, Gg14, Ömerli'den izole edilen, Ö13, Ö14, Gediz'den izole edilen Gd11 ve Eynal kaplıcasından izole edilen E10 şuşları.

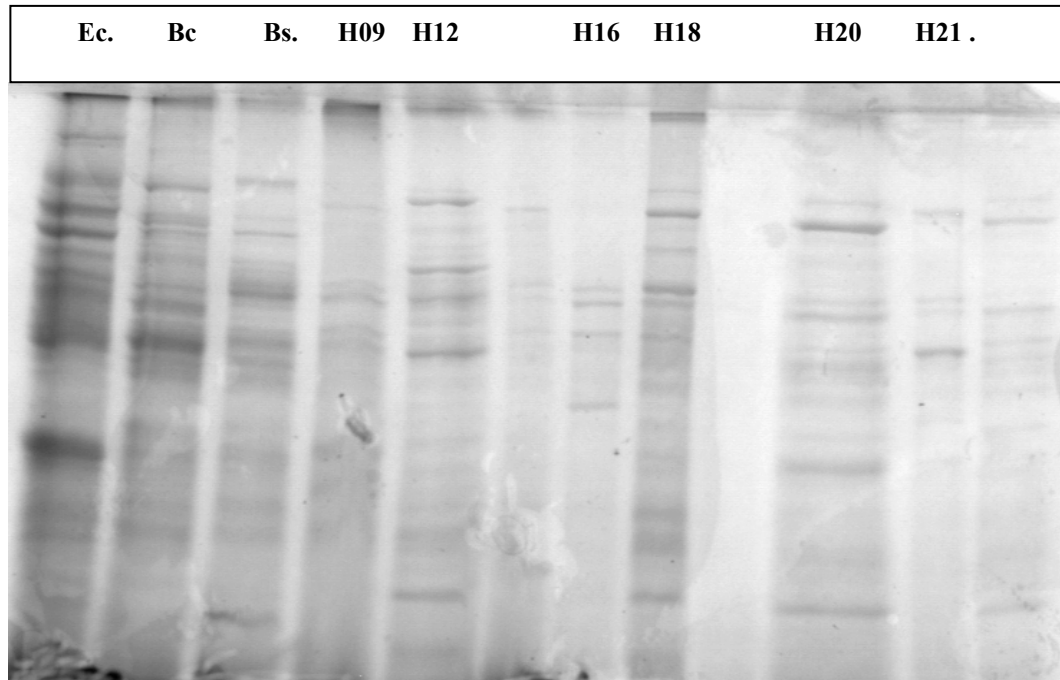


Şekil 3.26. Comassie brilliant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları. A: Jel-3, ,Ömerli'den izole edilen Ö35, Kızıldere'dan izole edilen, K43, Gediz'den izole edilen, Gd58, Gd10 şuşları. B: Jel-4, , Gediz'den izole edilen, Gd53 ve Kızıl Su kaplıcasından izole edilenK41 ve K42 şuşları.

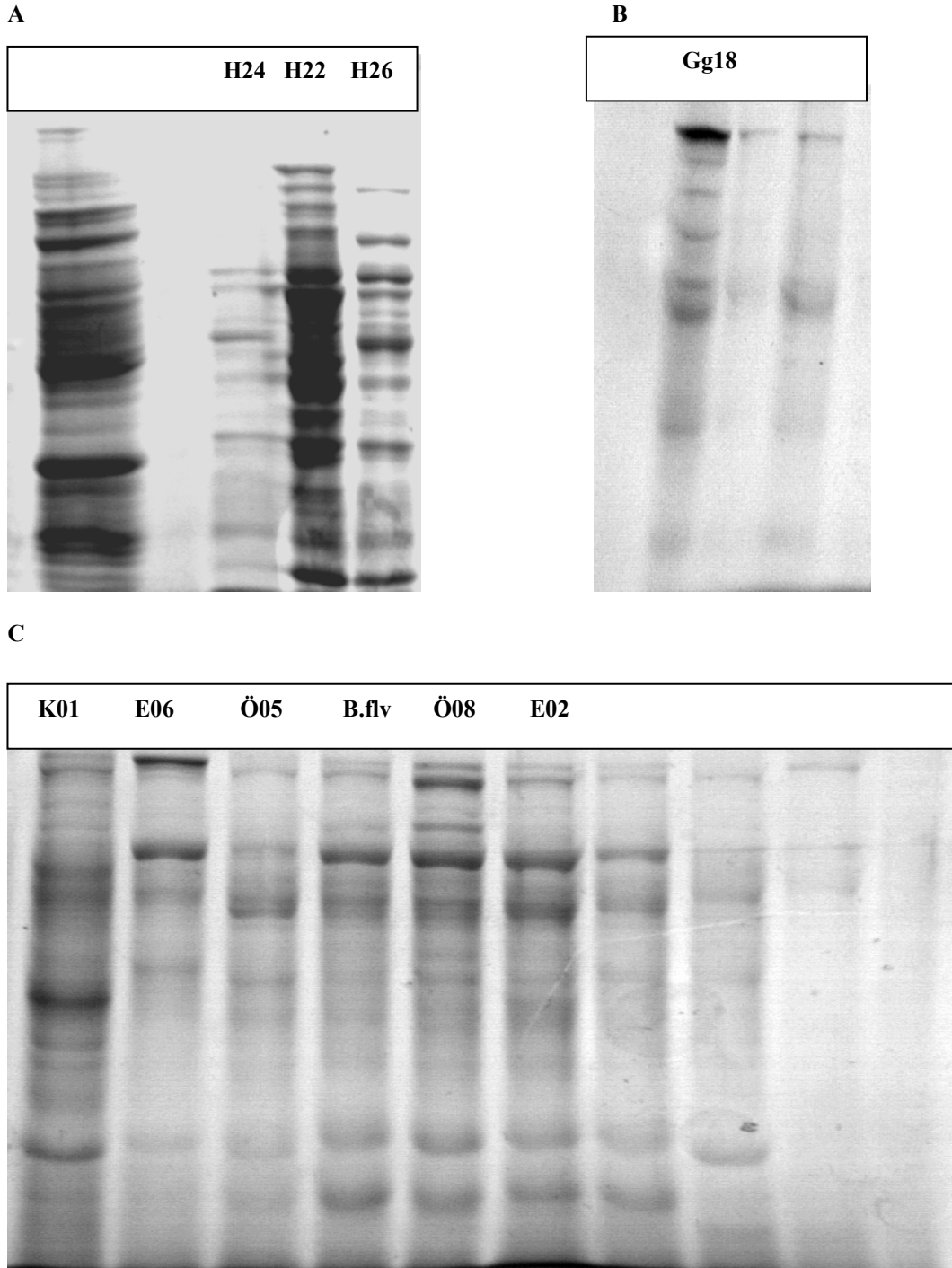
A



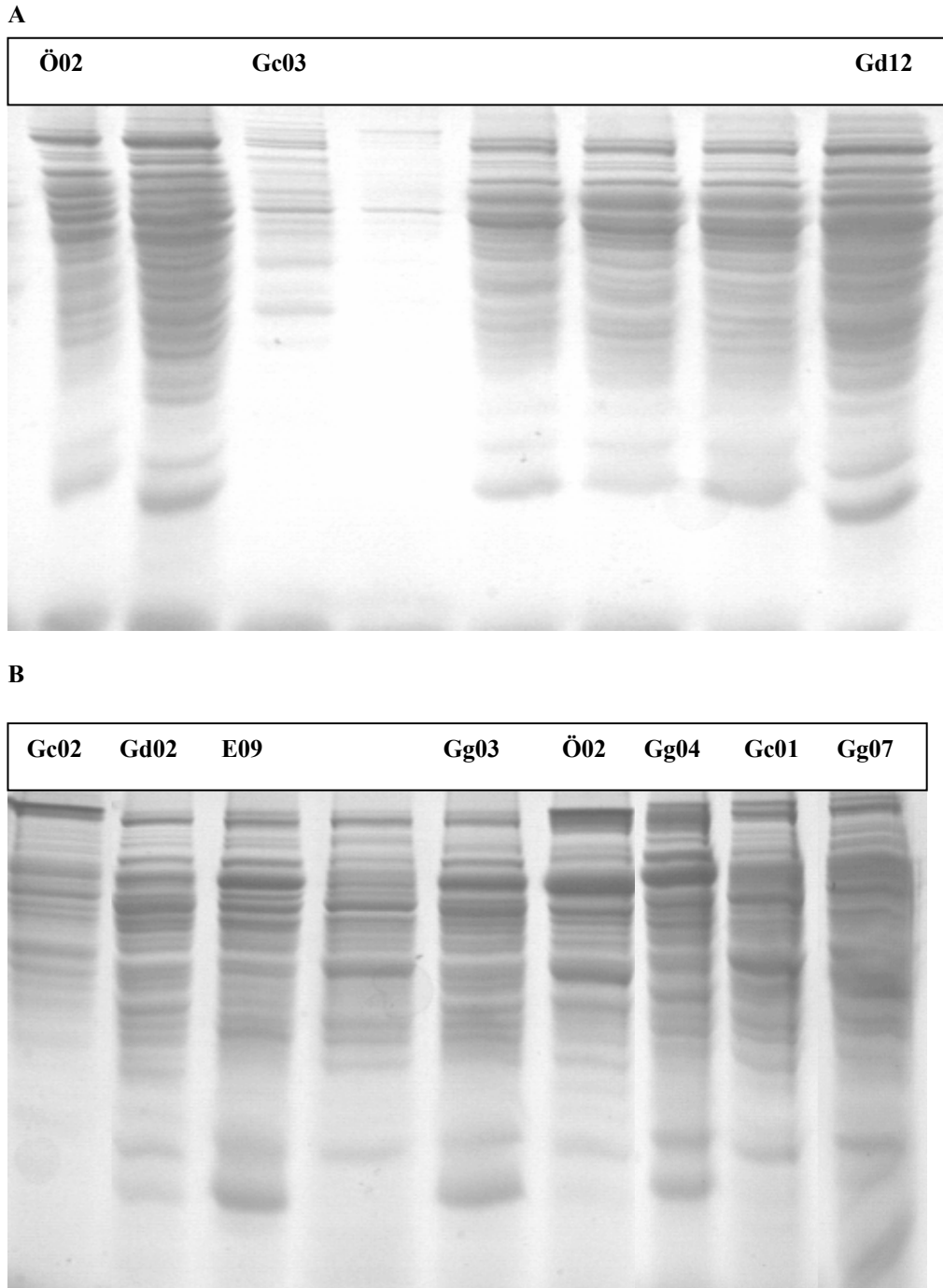
B



Şekil 3.27. Comassie brilliant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları. A: Jel-5, Gecek'ten izole edilen Gc22, Gc24, Gc25, suşları. B: Jel-6, , *E.coli*, *B. Cereus*, *B. Subtilis*, Hüdai'den izole edilen, H10, H12, H16, H18, H20, H21 suşları.

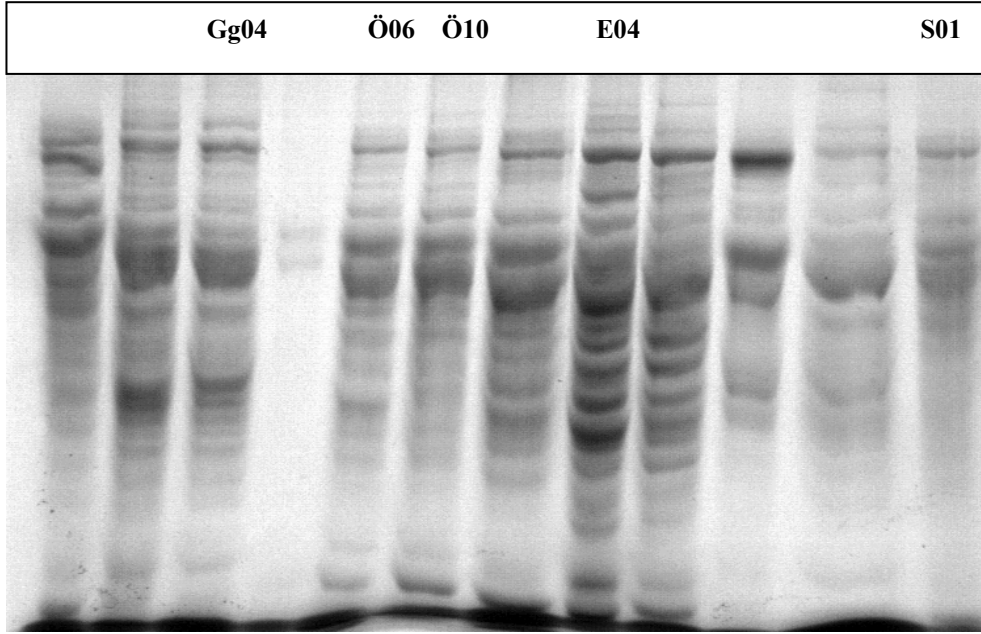


Şekil 3.28 Comassie brilliant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları. A: Jel-7, Hüdai den izole edilen ,H24, H22, H26, suşları. B: Jel-19, Gazlı Göl den izole edilen Gg18 suşu C: Jel-12 Kızıldere dan izole edilen, K01,Eynal dan izole edilen E06, E02 suşuları , Ömerliden izole edilen Ö05, Ö08 ve B.flavothermus suşları.



Şekil 3.29. Comassie brilliant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları. A: Jel-17, Ömerli'den izole edilen Ö02, Gecek'ten izole edilen Gc03, Gediz'den izole edilen, Gd12 suşları. B: Jel-15, Gecek'ten izole edilen Gc02, Gc01, Gediz'den izole edilen, Gd02, Gazlı Göl den izole edilen Gg03, Gg04, Gg07, Ömerliden izole edilen, Ö02 suşu.

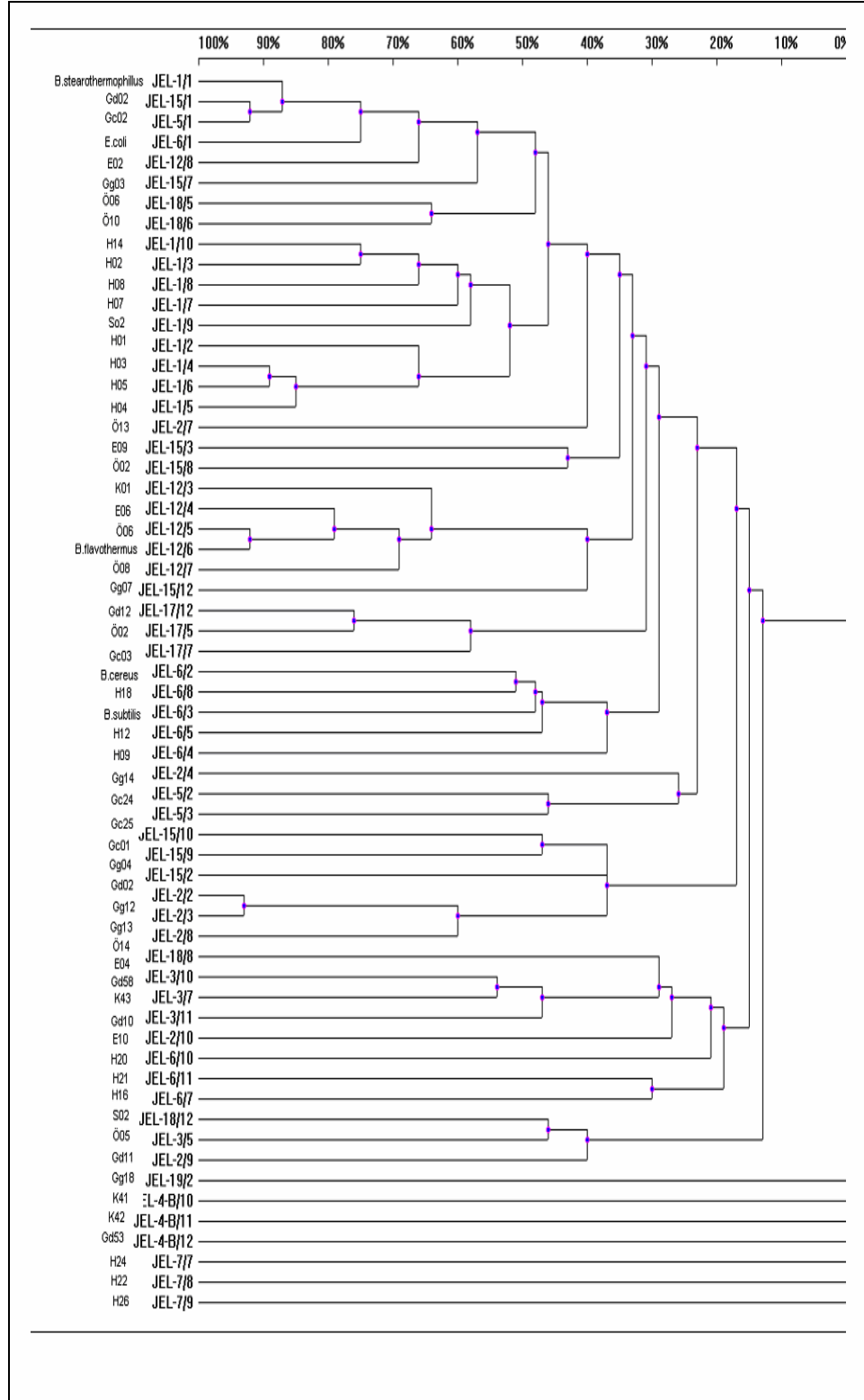
A



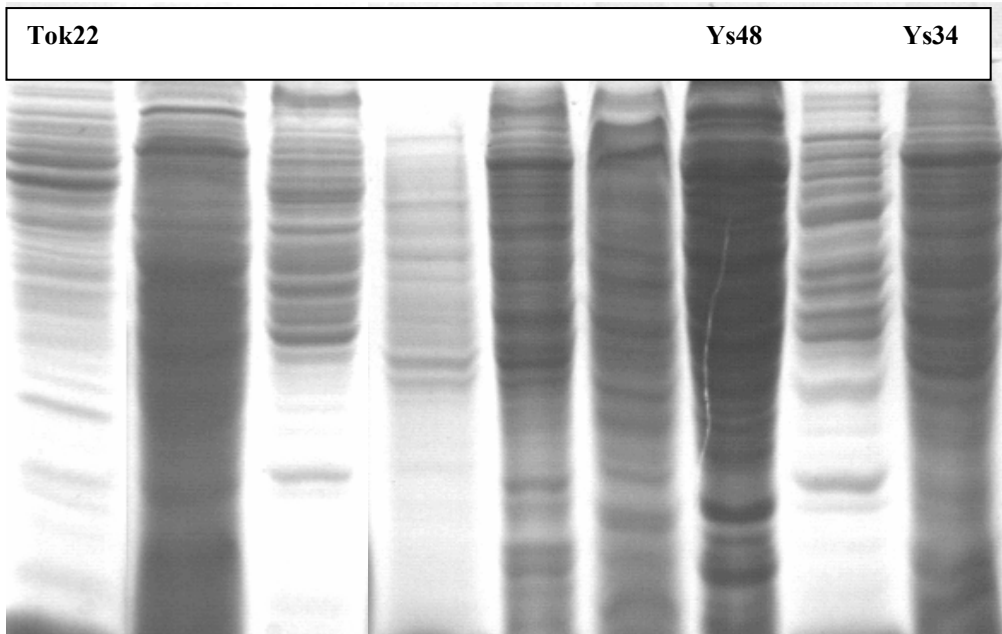
Şekil 3.30 Jel-18, Ömerli'den izole edilen Ö06, Ö10, Eynaldan izole edilen E04, Sarıcakaya'dan izole edilen S01 suşu,.

İzolatlarımızdan Ö05 ve Ö08 suşlarının benzerliği birbirine %90 oranında tespit edilirken, bu suşların, E06 suşuna %80, Ö13 suşuna %70, K01 suşuna %65 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Gg12 ve Gg13 suşları birbirine %95 oranında benzer bulunurken, bu suşların Ö14 suşu ile olan benzerliği %60 oranında olmuştur. Gd53 ve K43 suşlarının benzerlikleri ise %55 oranında tespit edilirken, diğer izolatların benzerlikleri %50'nin altında kalmış, Gg18, K41, K42, Gd53, H24, H22, H26 suşlarının ise herhangi bir izolat ile benzerlik göstermediği tespit edilmiştir.

Şekil 3.31. Gr(+) suşların SDS-PAGE analizine göre homolojisi.

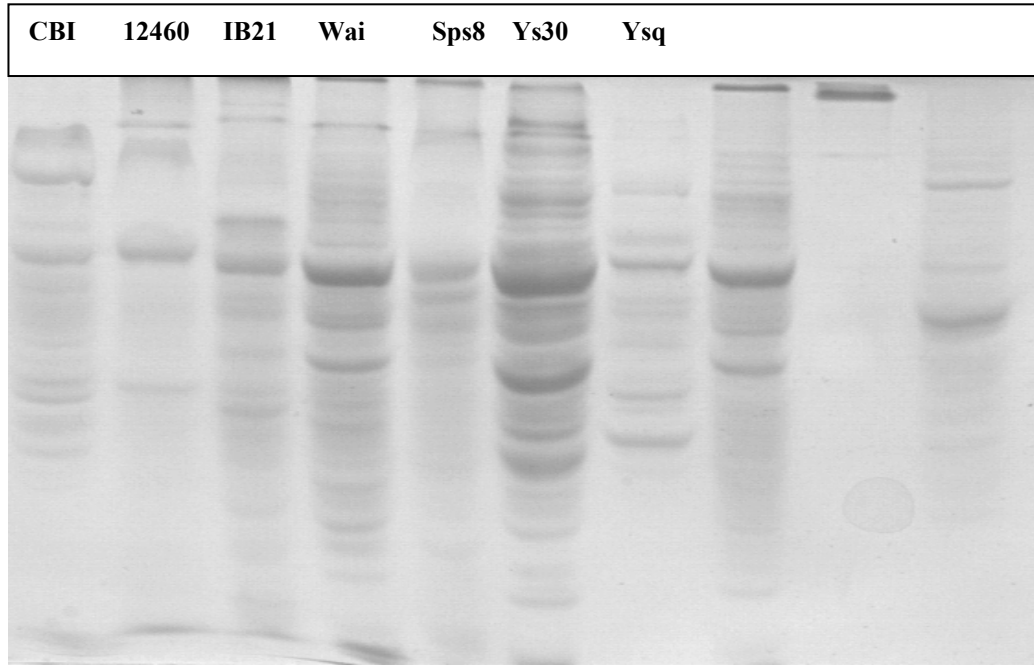


SDS-PAGE analizi ile karşılaştırılan Gr(-) suşların protein benzerlikleri ise şekil 3.33., 3.34, 3.35.,de verilmiştir. Bu izolatlardan 101 numaralı suş HB8 ile % 99 oranında benzer protein yapısı gösterirken, Tok22 ile % 85 oranında benzerlik saptanmıştır. 331 numaralı suşun HB27 ve Ys38 ile % 60, 337 numaralı suşa % 50, oranında benzediği tespit edilmiştir. 331 numaralı suş standart olarak kullandığımız suşlara % 35'in altında benzer bulunmuş, 385 ve 335 numaralı suş ise % 30 oranında benzerlik gösterirken, diğer suşlara % 29'un altında benzedikleri saptanmıştır.

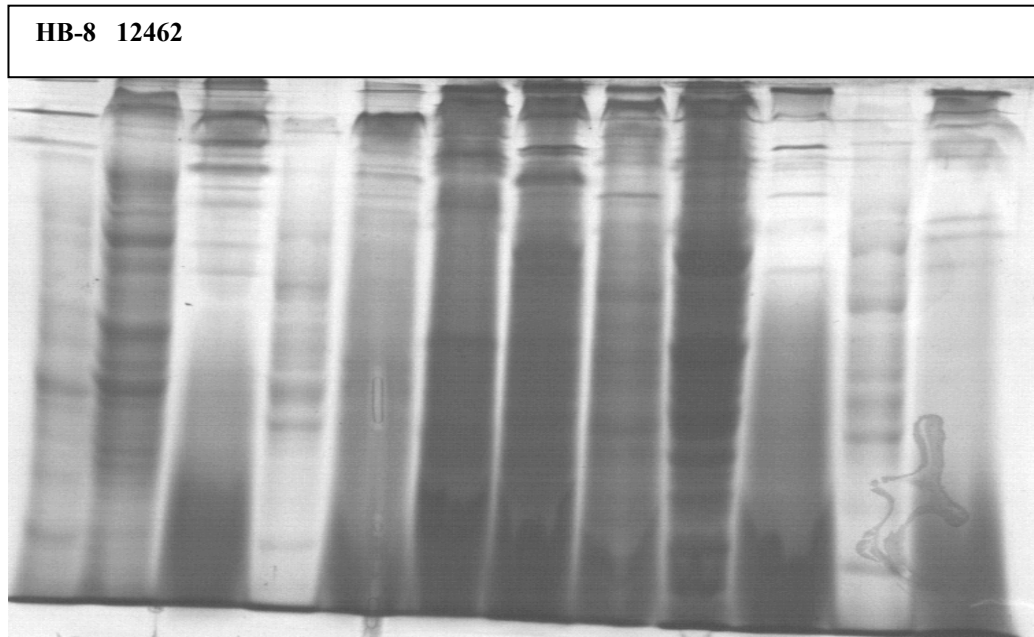


Şekil 3.32. Comassie brilliant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları. Jel-20, *T.filiformis* Tok22, *T.aquaticus* Ys48, *T.brockianus* Ys34.

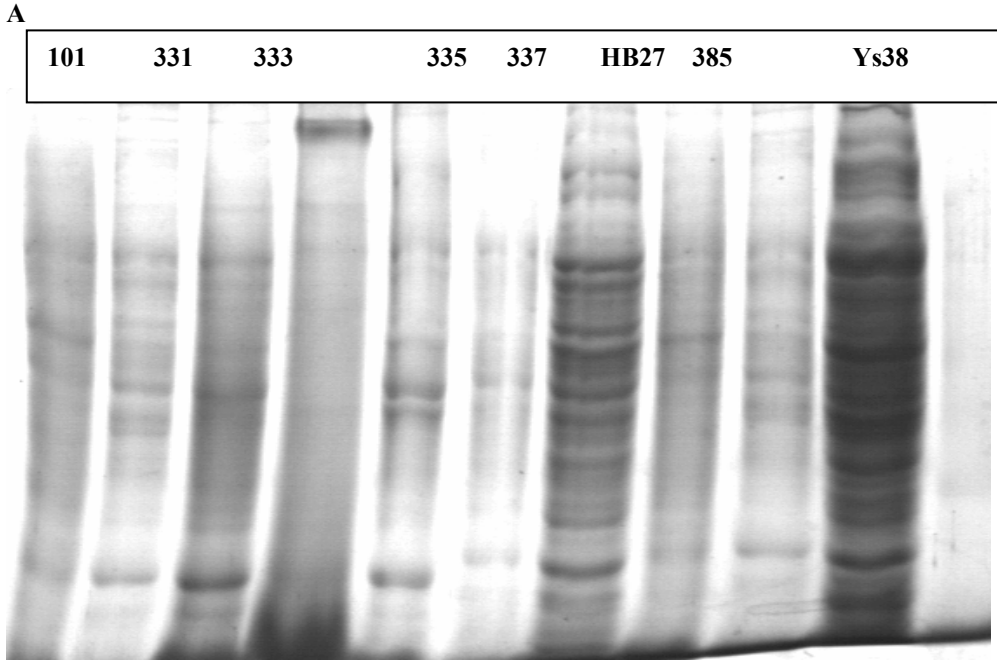
A



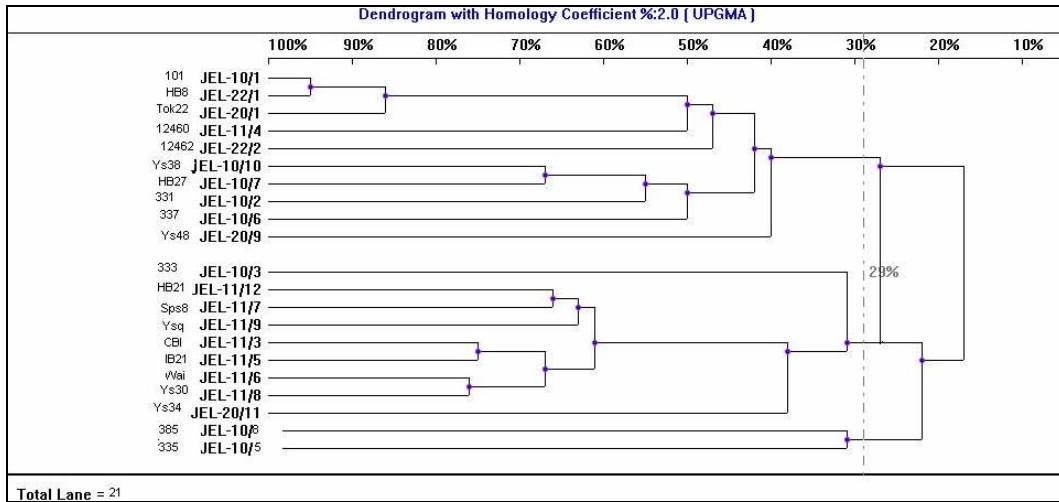
B



Şekil 3.33. Comassie brilliant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları. A: Jel-11, *T. oshimai* CBI, *T.igniferrae* 12460, *T.thermophilus* IB21, *T. filiformis* Wai , *T.oshimai* SPS8, *T.brockianus* Ys30, *T.aquaticus* Ysq, Hüdai H21 suşu.B: Jel-23, *T.thermophilus* HB8, *T.antraknikiani* 12462



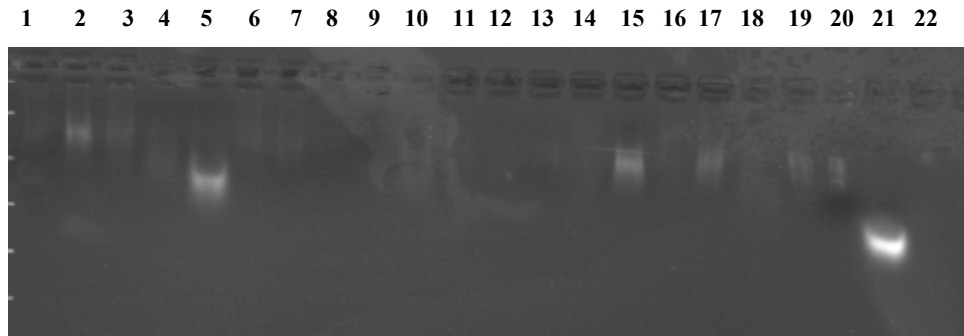
Şekil:3.34 Comassie brillant blue ile boyanmış protein örneklerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak yapılmış, toplam protein analizi sonuçları. A: Jel-10, Gazlı Göl Kaplıcasından izole edilen 101, Ömerli Kaplıcasından izole edilen, 331, 333, 335, 337, 385 numaralı suşlar ve *T. thermophilus* HB27, *T. brockianus* Ys38



Şekil 3.35. Gr(-) suşların SDS-PAGE analizine göre homolojisi

3.4. Plazmid İzolasyonu

Çalışmamızda gelecekteki çalışmalara temel oluşturması amacı ile plazmit izolasyonu için deneme çalışmaları yapılmış, ancak plazmid varlığı tespit edilememiştir (Şekil 3.36.). Bu sonuçlardan suş numarası verilmeyenler testleri daha önce tamamlandığı halde tekrar üretilmeyen bakterilerdir.



Şekil.3.36. Plazmit izolasyonu

3.5. Yağ Asidi Analizi Sonuçlarına Göre İzolatların Benzerlik Oranlarının Saptanması

Seçilen 25 adet Gr(+) izolata gaz kromatografisi ile yağ asidi analizi uygulanmıştır. Sonuçlar çizelge 3.8., 3.9., 3.10.'da gösterilmiştir. Buna göre izolatlarımızdan elde edilen yağ asitlerinden 10:0'ın Gg07'de 1.30 oranında bulunurken diğer suşlarda hiç bulunmadığı tespit edilmiştir. 14:0 yağ asidi ise izolatların 7 adetinde 29,15 ile 44,11 arasındaki oranlarda değişmiş, en yüksek oran Ö04 suşunda saptanmış, diğer izolatlarda ise en çok 1,47 oranıyla H25 suşunda, en az 0,24 oranıyla Ö02 suşunda saptanmıştır.

16:0 anteiso, 16:0 iso, 17: iso ve 17:0 anteiso yağ asitleri incelenen suşlarda en çok rastlanan yağ asitleri olurken, 10:0, 12:0, 11:0 2OH, 13:0 2OH, 15:3OH, 16:1w7c, 16:1w11c, 20:0, 20:4w6c çeşitlerine an az rastlanmıştır. 15:0 iso yağ asidi Gd10 suşunda 50,80 oranıyla en yüksek değere ulaşırken, 0,83 oranıyla en düşük Gc02 suşunda saptanmıştır. 15:0 yağ asidi en yüksek Ö05 suşunda bulunmuştur. 16:0 yağ asidi en yüksek 28,32 oranında olup H25 suşunda,

en düşük 0,35 oranıyla Gg03 suşunda saptanmıştır. Iso 17:01 yağ asidi en az 0,24 oranıyla Gd03 ve Gd12 suşlarında, 28,13 oranıyla en yüksek Gc02 suşunda saptanmıştır (Çizelge 3.8., 3.10.).

Gg03, H13 ve K02 suşlarında identifiye edilememiş yağ asitleri saptanmıştır. Gg04, Ö04, Ö05, Ö10, S01, H21, H24, E02, E04, E06, Gd10, Gd12, K02 suşlarında tam identifikasyon sonucu alınamayan yağ asitlerinin mevcut olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.8., 3.9., 3.10.).

İncelenen izolatlardan Gc02 ile Ö04 suşunun, H25 ile H27 suşunun, H24 ile E02 suşunun, Gd03 ile Gd12 suşunun yağ asidi çeşit ve miktarları birbirine yakın oranlarda saptanmıştır (Çizelge 3.8., 3.9., 3.10.).

İncelenen tüm izolatlarda en fazla rastlanan yağ asitlerinin 14:0 iso ve 17:0 anteiso arasında dağılım gösterdiği diğer çeşitlerin ise daha az miktarlarda ve sıklıkta buldukları tespit edilmiştir (Çizelge 3.8., 3.9., 3.10.).

Değerlendirme, TSBA50 kaynak kütüphanesinden yapılmış, izolatlarımızın termofilik özellikte olan *Geobacillus stearothermophilus*, *G. kaustophilus*, ve *T.aquaticus* türlerine yakın oranlarda olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.8., 3.9., 3.10.). Yağ asidi oranlarına göre yapılan identifikasyon sonuçlarının VITEC ve biyokimyasal testlerden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması çizelge 3.17’de verilmiştir.

Çizelge 3.9. Gr(+) Basillerde Yağ Asidi Analizi Sonuçları

| Yağ asidi | H06 | H13 | H21 | H22 | H24 | H25 | H27 | E02 | E04 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 12:0 | | 0,97 | | | 0,12 | | | | |
| 13:0 2OH | | | | | | | | 0,09 | |
| 13:0 anteiso | | | | | 0,69 | | | 0,50 | |
| 14:0 iso | | 0,17 | | 0,79 | | 0,28 | 0,40 | | 0,91 |
| 14:0 anteiso | | | | | 0,48 | | | 0,28 | |
| 14:0 | 1,22 | 1,05 | 1,28 | | 31,35 | 1,47 | 1,36 | 42,83 | 0,27 |
| 15:0 iso | 12,43 | 5,32 | 42,34 | 56,38 | 1,63 | 10,91 | 8,30 | 1,51 | 35,93 |
| 15:0 anteiso | 4,09 | 2,31 | 0,69 | 1,89 | | 4,71 | 5,21 | | 1,53 |
| 15:0 | | | | | 14,63 | | | 13,46 | |
| 15:0 3OH | | 13,44 | | | | | | | |
| 16:0 iso | 14,11 | 5,04 | 3,72 | 15,97 | 4,17 | 16,71 | 21,07 | 3,31 | 22,32 |
| 16:0 | 18,98 | 7,97 | 11,05 | 4,41 | 0,67 | 28,32 | 22,52 | | 4,17 |
| 16:1w7c | 1,89 | | | | | | | | |
| 16:1w11c | 4,38 | | | | | | | | |
| ISO 17:0 1 | 2,36 | | | | 17,09 | | 0,25 | 28,06 | |
| 17:0 | | | 0,72 | | 0,21 | 0,85 | 0,78 | 0,25 | |
| 17:0 iso | 14,20 | 6,94 | 28,26 | 16,13 | 5,48 | 11,46 | 9,22 | 5,24 | 23,40 |
| 17:0 antesio | 22,29 | 9,76 | 2,12 | 3,21 | | 24,62 | 27,02 | 2,07 | 6,69 |
| Iso 17:1 w5c | | 1,17 | 1,27 | | | | | 0,30 | 1,47 |
| 17:1 w6c | | | | | 3,53 | | | | 0,47 |
| Iso17:1 w10c | 2,36 | | | | | | | | |
| 18:0 | | 10,75 | 5,70 | 1,23 | 16,96 | 0,49 | 0,81 | | |
| 18:0 iso | 1,82 | | | | | | 0,34 | | 0,29 |
| 18:1 iso H | | | 1,79 | | | | | | |
| 18:1w9c | | | 0,54 | | 1,15 | 0,17 | | | |
| UN | | 13,50 | | | | | | | |
| 20:0 | | | | | 0,64 | | | | |
| 20:4 w6c | | | | | 0,28 | | | | |
| Sum Ftr 2 | | | | | | | | 0,21 | 0,39 |
| Sum Ftr.3 | | | 0,53 | | | | | 1,88 | 2,16 |
| Sum Ftr 4 | | | | | 0,70 | | | | |
| Sum Ftr 5 | | | | | 0,22 | | | | |

Çizelge 3.10. Gr(+) Basillerde Yağ Asidi Analizi Sonuçları

| Yağ asidi | E06 | Gd03 | Gd10 | Gd12 | K01 | K02 | Bstr |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 13:0 2OH | | | | | | 0,34 | |
| 14:0 iso | 0,32 | 0,24 | 0,92 | 0,24 | | 0,43 | 0,21 |
| 14:0 anteiso | | | | | | 0,22 | |
| 14:0 | 0,35 | 0,62 | 0,37 | 0,62 | | 1,18 | 0,55 |
| 15:0 iso | 36,46 | 35,45 | 50,80 | 35,45 | 30,92 | 7,31 | 28,21 |
| 15:1 iso G | | | | 0,15 | | | |
| 15:0 anteiso | 4,78 | 1,04 | 4,04 | 1,04 | 2,73 | 5,19 | 4,95 |
| 16:0 iso | 8,11 | 9,94 | 15,33 | 9,94 | 23,92 | 21,65 | 6,13 |
| 16:0 | 3,65 | 7,21 | 4,14 | 7,21 | 7,02 | 20,76 | 19,20 |
| ISO 17:0 1 | | 0,24 | | 0,24 | | | |
| 17:0 | | 1,04 | | 1,04 | | 0,62 | 0,44 |
| 17:0 iso | 20,48 | 32,95 | 15,20 | 32,95 | 23,26 | 8,88 | 19,62 |
| 17:0 antesio | 17,49 | 5,71 | 5,63 | 5,71 | 12,15 | 25,62 | 19,42 |
| Iso 17:1 w5c | 3,71 | | 1,04 | | | | |
| 17:1 anteiso A | 1,31 | | | | | | |
| 18:0 | | | 0,41 | 4,03 | | 1,62 | 0,65 |
| 18:0 iso | 0,38 | | | 0,38 | | 0,40 | 0,21 |
| 18:1 iso H | | | 0,68 | | | | |
| 18:1w9c | | | 0,26 | | | 0,28 | 0,40 |
| 19:0 iso | 0,34 | | | 0,34 | | | |
| 20:0 | 0,30 | | | 0,30 | | | |
| Sum Ftr 2 | 0,38 | | 0,51 | | | | |
| Sum Ftr.3 | 2,95 | | 0,67 | | | | |
| Sum Ftr 5 | | | | 0,33 | | | |
| UN | | | | | | 0,76 | |

İzole edilen altı adet Gram (-) izolatın yağ asidi analizi sonuçları çizelge 3.11 de verilmiştir. İncelenen suşların tümünde 13:0 iso yağ asidi değerleri birbirine yakın oranda saptanmıştır. Bu yağ asidi kontrol olarak kullandığımız on üç adet bakteriden *T. igniferrae* 12460 haricindeki bütün suşlarda birbirine yakın değerlerde saptanmıştır 15:0 iso en yüksek 101, 15:0 anteiso en yüksek 385 numaralı suşta, 16:0 iso en yüksek 333 numaralı suş, 16:0 en yüksek 331 numaralı suşta, 17:0 iso en yüksek 385 numaralı suşta, 17:0 anteiso en yüksek 385 numaralı suşta saptanmıştır. 101 numaralı izolatımızın kontrol olarak kullandığımız

bakterilerimizden, *T. thermophilus* HB27, *T. ruber*, *T. oshima* CB-I, *T. igniferrae* 12460, *T. thermophilus* IB21'e 15: iso yağ asidi oranı bakımından benzer özellikte olduğu tespit edilmiş, 16:0 iso değeri ise, *T. ruber*, *T. thermophilus* HB27, *T. thermophilus* IB21 ile benzer bulunmuştur. 17:0 iso ve anteiso değerleri ise, *T. ruber* ve *T. igniferrae* 12460 ile benzerlik göstermiştir.

331 numaralı izolatımızın 15:0 iso ve anteiso yağ asidi değerleri, *T. thermophilus* HB27, *T. aquaticus* Ysq, *T. brockianus* Ys30, *T. aquaticus* Ys48 ile yakın olmuş, 17:0 iso ve anteiso değerleri ise *T. thermophilus* HB27, *T. aquaticus* Ysq, *T. brockianus* Ys30'a benzer bulunmuştur.

333 numaralı izolatımızın kontrol olarak kullandığımız bakterilerimizin yağ asidi değerlerine benzerliğinin oldukça uzak olduğu buna rağmen izolatın 16:0 iso değerinde *T. thermophilus* HB8 ve *T. oshima* Sps8 ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

335 numaralı izolatımız hiçbir kontrol suşa tam benzememesine rağmen 15:0 iso oranı *T. thermophilus* Hb8, 17:0 iso oranının ise, *T. aquaticus* Ys48 ile benzediği belirlenmiştir.

337 numaralı izolatımız yüksek oranda 15:0 iso yağ asidi içermektedir, bu oranın *T. ruber*, *T. thermophilus* HB27, *T. igniferrae* 12460, *T. oshima* CB-I ile benzer, 1:0 iso yağ asidinin ise *T. thermophilus* HB8, *T. oshima* Sps8, *T. aquaticus* Ysq ile benzer olduğu belirlenmiştir.

385 numaralı izolatımız ise düşük 15:0 iso, yüksek 17:0 iso oranına sahip olarak saptanmış, *T. filiformis* wai, *T. brockianus* Ys34 ve *T. oshima* Sps8' benzer oranda yağ asidi bulundurduğu saptanmıştır (Çizelge 3.11., 3.12.).

Çizelge 3.11. Gr(-) Basillerde Yağ Asidi Analizi Sonuçları

| Yağ asidi | 101 | 331 | 333 | 335 | 337 | 385 | Trb | Hb27 | Ysq | Tok22 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| 11:0 iso | 0,36 | | | | | | 0,21 | 0,17 | | |
| 12:0 | | | 0,18 | | | | | | | |
| 13:0 iso | 0,60 | 0,77 | 0,54 | 0,46 | 0,93 | 0,32 | 0,80 | 0,66 | | 0,25 |
| 13:0 3OH | 1,25 | | | | | | | | | |
| 14:0 iso | | 1,21 | 1,82 | 1,03 | 0,60 | 1,44 | | 0,53 | | |
| 14:0 anteiso | | | | | | | 0,73 | | | |
| 14:0 | | | 0,48 | 0,35 | 0,23 | 0,25 | 0,35 | 0,30 | 1,67 | 0,34 |
| 15:0 iso | 44,43 | 31,82 | 22,77 | 23,28 | 47,16 | 17,87 | 53,57 | 44,48 | 28,6 | 12,86 |
| 15:0 anteiso | 2,36 | 3,07 | 3,15 | 4,08 | 6,11 | 3,89 | 4,76 | 3,57 | 1,95 | 22,88 |
| 15:0iso OH | | | | | 0,77 | | | | | |
| 15:0 2OH | | | | | | | 0,36 | | | |
| 15:1 iso F | 1,11 | | | | | | 1,41 | | | |
| 15:1 w8c | | | | | | | 0,21 | | | |
| 16:1 w7c | | 0,50 | | | | | | | | |
| 16:1 w9c | | | | | | | 0,29 | | | |
| 16:1 w11c | | | | | | | | 0,10 | | |
| 16:0 iso | 2,36 | 5,85 | 24,44 | 8,65 | 3,63 | 16,08 | 2,78 | 2,41 | 7,14 | 1,23 |
| 16:0 | 14,29 | 17,55 | 7,30 | 7,09 | 5,22 | 8,22 | 2,46 | 8,57 | 26,5 | 5,26 |
| Iso17:1w9c | 3,03 | | | | | | 3,60 | | | |
| iso7:1w10c | | 7,99 | 0,38 | 2,66 | | 0,22 | | 3,57 | | 1,41 |
| 17:0 | 1,65 | | 0,69 | | 0,76 | 0,81 | 0,74 | | | 0,65 |
| 17:0 iso | 24,59 | 28,27 | 30,28 | 43,24 | 29,22 | 40,37 | 22,37 | 32,65 | 30,2 | 2,01 |
| 17:0 antesio | 2,82 | 2,53 | 5,14 | 5,65 | 4,97 | 8,38 | 2,69 | 2,60 | 1,48 | 32,08 |
| 17:0iso OH | 1,14 | | | | 0,40 | | 1,54 | | | |
| 17:1 w6c | | | | | | | 0,46 | | | |
| 17:1 w8c | | | | | | | 0,47 | | | |
| 18:0 | | | 1,57 | 2,68 | | 0,30 | | 0,22 | 2,38 | 1,09 |
| 18:0 iso | | | 1,26 | 0,84 | | 1,44 | | | | |
| 19:0 iso | | | | | | 0,43 | | | | |
| 19:0 anteiso | | | | | | | | | | 0,36 |
| Sum mFtr 4 | | 0,44 | | | 0,52 | | | 0,17 | | 1,58 |

Çizelge 3.12. Gr(-) Basillerde Yağ Asidi Analizi Sonuçları

| Yağ asidi | Ys48 | wai | Hb8 | Ys34 | Sps8 | cbı | 12460 | Ib21 | Ys30 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 10:0 iso | | | | 0,15 | | | | | |
| 11:0 iso | | | | 0,22 | | | 0,10 | 0,11 | |
| 12:0 iso | | | | 0,40 | | | | | |
| 13:0 iso | 0,72 | | 0,37 | 0,55 | 0,35 | 0,98 | 2,25 | 0,74 | 0,63 |
| 13:0 3OH | | | | | 2,46 | | | | |
| 14:0 iso | 0,25 | 0,74 | 3,10 | 3,01 | | 0,44 | 0,33 | 0,58 | 1,61 |
| 14:0iso 3OH | | | | | | | 0,13 | 0,20 | |
| 14:0 | 0,39 | | | 0,32 | 0,40 | 0,62 | 0,42 | 0,85 | 1,46 |
| 15:0 iso | 38,65 | 16,92 | 22,11 | 17,92 | 19,20 | 48,12 | 54,76 | 40,20 | 35,61 |
| 15:0 anteiso | 4,85 | 15,25 | 8,84 | 2,46 | 6,36 | 3,24 | 3,47 | 2,32 | 1,93 |
| 15:0 iso 3OH | 0,52 | | | | | | 0,37 | 0,27 | |
| 16:1 w7c | | | | | | | | | 0,45 |
| 16:1 w11c | | | | | | | 0,15 | | |
| 16:0 iso | 1,48 | 5,86 | 21,73 | 46,91 | 20,78 | 1,66 | 1,14 | 2,80 | 10,40 |
| 16:0 | 6,55 | 4,18 | 3,65 | 4,56 | 7,26 | 6,97 | 6,03 | 10,42 | 8,23 |
| iso 17:1w10c | 1,28 | 0,67 | 0,25 | | 0,77 | 0,43 | 2,56 | 0,38 | 2,12 |
| 17:0 | 0,71 | | | 0,29 | 0,39 | 0,90 | 0,40 | 1,36 | |
| 17:0 iso | 39,73 | 30,20 | 29,19 | 19,37 | 30,46 | 33,50 | 23,55 | 32,51 | 35,13 |
| 17:0 antesio | 3,86 | 23,67 | | 2,40 | 9,47 | 2,26 | 1,47 | 1,92 | 2,17 |
| 17:0 iso 3OH | | | | | | | 0,12 | 0,19 | |
| 17:1anteisoA | | | 0,99 | | | | | | |
| 18:0 | 0,75 | 1,51 | 0,59 | | 1,00 | 0,87 | 1,88 | 3,78 | 0,73 |
| 18:0 iso | | | | 1,42 | | | | | 0,53 |
| 18:3 w6c | | | | | | | | 0,39 | |
| 18:1w9c | | | | | | | 0,34 | 0,33 | |
| 20:0 | | | | | | | | 0,31 | |
| Sum in Ftr 4 | | | | | | | 0,14 | | |
| Sum in Ftr 5 | 0,25 | | | | | | 0,32 | 0,34 | |

3.6. Gr(-) örneklerdeki Enzimlerin Saptanması.

İzole edilen altı adet Gr(-) suşun enzim varlıkları API enzim kitleri ile test edilmiş API enzim kiti içinde yer alan enzim substratları ve enzim testi sonuçları çizelge 3.13., 3.14. de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre alkalın fosfotaz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), α -glukozidaz, bütün suşlarda, leusin arilamidaz, 331 ve 385 numaralı izolatlarda, Asid fosfotaz, 101 hariç bütün suşlarda, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, 333 ve 337 numaralı suşlarda, β -galaktozidanidaz 101 ve 337 de, β -glukozidaz 337 numaralı sušta maksimum seviyede saptanmıştır. 337 numaralı izolatomızda dokuz farklı enzim çok yüksek oranda saptanmıştır.

Çizelge 3.13. Gr(-) örneklerde kullanılan API-ZYM Kiti substratına göre enzimler.

| No | Enzim | Substrat | pH |
|----|-----------------------------------|--|-----|
| 1 | Control | | |
| 2 | Alkalın fosfotaz | 2-naphtyl fosfat | 8.5 |
| 3 | Esteraz (C4) | 2-naphtyl butirat | 6.5 |
| 4 | Esteraz lipaz (C8) | 2-naphtyl caprylat | 7.5 |
| 5 | Lipaz (C4) | 2-naphtyl miristat | |
| 6 | Leusin arilamidaz | L-leusil-2-naphtylamid | |
| 7 | Valin arilamidaz | L-valil-2-naphtylamid | |
| 8 | Sistin arilamidaz | L-sistil-2-naphtylamid | |
| 9 | Tripsin | N-benzol-DL-arjinin -2-naphtylamid | 8.5 |
| 10 | α -kimotripsin | N-glutaril-fenilalanin -2-naphtylamid | 7.5 |
| 11 | Asid fosfotaz | 2-naphtyl fosfotaz | 5.4 |
| 12 | Naftol-AS-BI- fosfohidrolaz | Naftol-AS-BI- fosfotaz | |
| 13 | α -galaktozidaz | 6-Br-2-naftil- α D-galaktopironidaz | |
| 14 | β -galaktozidanidaz | 2-naftil- α D-galaktopironidaz | |
| 15 | β -glukronidaz | Naftol-AS-BI- β D-glukuronidaz | |
| 16 | α -glukozidaz | 2-naftil-BD-galaktopironidaz | |
| 17 | β -glukozidaz | 6-Br-2-naftil- β D-galaktopironidaz | |
| 18 | N-asetil- β -glukozaminidaz | 1-naftil-N-asetil- β D-glukozamid | |
| 19 | α -mannozidas | 6-Br-2-naftil- α D-mannopironidaz | |
| 20 | α -fruktozidaz | 2-naftil- α L-fukopironidaz | |

Valin arilamidaz ve α -galaktozidazın ise düşük oranda olduğu gözlenmiştir. Varlığı test edilen sekiz farklı enzim izolatların hiç birinde saptanamamıştır.

Çizelge 3.14. Gr(-) örneklerde tespit edilen enzimler ve yoğunluk düzeyleri. Enzimin miktar değerleri (+-Minimum, +++-Maksimum)

| No | Enzim | 101 | 331 | 333 | 335 | 337 | 385 | Gg03 | Ö05 | E02 |
|----|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| + | Control | | | | | | | | | |
| + | Alkalin fosfotaz | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | + |
| ++ | Esteraz (C4) | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 4 | Esteraz lipaz (C8) | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ |
| 5 | Lipaz (C4) | | | | | | | | | |
| 6 | Leusin arilamidaz | + | +++ | + | ++ | +++ | +++ | +++ | + | +++ |
| 7 | Valin arilamidaz | | + | | | | + | + | | |
| 8 | Sistin arilamidaz | | | | | | | + | | |
| 9 | Tripsin | | | | | | | | | |
| 10 | α -kimotripsin | | | | | | | + | + | +++ |
| 11 | Asid fosfotaz | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | +++ | +++ |
| 12 | Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| 13 | α -galaktozidaz | + | | | | | | | | |
| 14 | β -galaktozidanidaz | +++ | | | | +++ | | | | + |
| 15 | β -glukronidaz | | | | | | | | | |
| 16 | α -glukozidaz | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | +++ |
| 17 | β -glukozidaz | +++ | +++ | | +++ | +++ | +++ | | | +++ |
| 18 | N-asetil- β -glukozaminidaz | | | | | | | | | |
| 19 | α -mannozidas | | | | | | | | | |
| 20 | α -fruktozidaz | | | | | | | | | |

Üç adet Gr(+) suşa uygulanan enzim testleri sonucunda ise Gg03 suşunda alkalin fosfotaz, leusin arilamidaz, α -glukozidaz üretilirken, Ö05 ve E02 suşlarında esteraz ve esteraz lipaz, asid fosfotaz'ın yüksek oranda olduğu, α -glukozidaz'ın ise sadece E02 suşunda yüksek oranda olduğu bulunmuştur. Ayrıca izolatlarımıza selülaz aktivitesi testleri uygulanmış, Gc02, Gc21 Ö10, K43 suşlarında pozitif sonuç saptanmıştır.

3.7. Ribotiplendirme

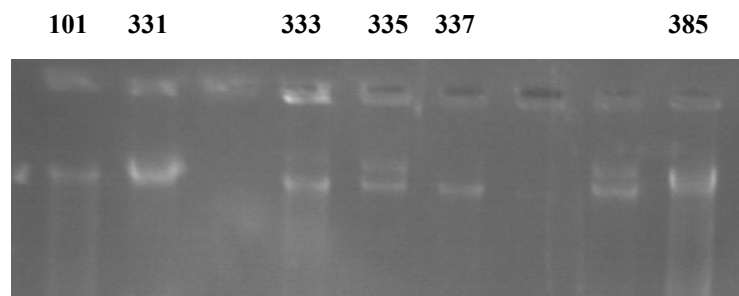
Çizelge 3.15. Ribotiplendirme çalışması

| IB21 | Ys34 | CBI | Ysq | Ys48 | 331 | 337 |
|------|------|-----|-----|------|-----|-----|
| - | - | - | - | - | - | - |

Ribo tiplendirme çalışması yapmak için deneme çalışması yapılmış ancak elimizde mevcut olan enzimlerin bizim çalışmak istediğimiz Gr(-) özellikteki termofilik basilleri kesmeye uygun olmadığı saptanmıştır (Çizelge 3.15).

3.8. DNA İzolasyonu, 16S rRNA Geninin Baz Dizisinin Belirlenmesi

İzole edilen altı adet Gr(-) bakteriden DNA izolasyonu yapılmıştır (Sharp ve Williams 1988). DNA örneklerinden BSF8/20 ve BSR 1541/20 primerleri kullanılarak 1529 bp olan gen parçası çoğaltılmış, agaroz jel üzerinde saflığı ve büyüklüğü kontrol edilmiştir. Kontrol için marker olarak Fermentas #SM1158 (3000-100 bp) kullanılmıştır. Elde edilen 16S rRNA geni Biorad marka Spin Column ile saflaştırılmış, saflaştırılan PCR ürününün miktar tayini agaroz jel üzerinde görsel olarak yapılmıştır. Bunun için ng/0,5µg miktarında DNA içeren marker değerlerine ait bantların jel üzerinde oluşturduğu görüntüden yararlanılmıştır.



Şekil 3.37. DNA izolasyonu

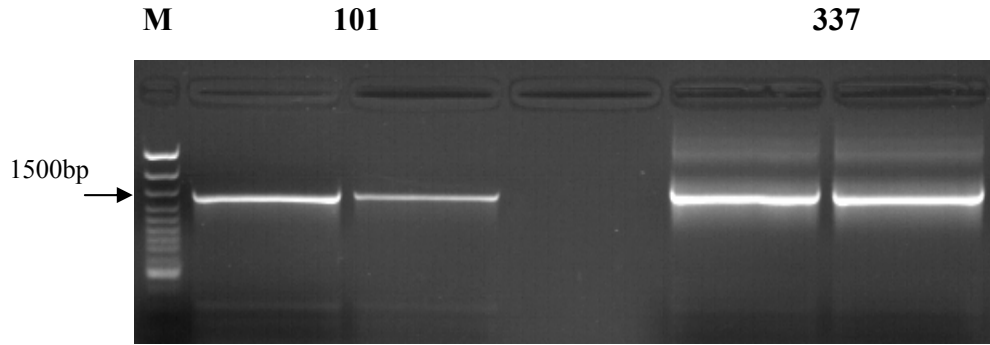
3.9. DNA Erime Noktasına (Tm) Göre % G+C Hesaplanması

DNA Tm değerleri Prof. Dr. Tony Williams tarafından Londra Üniversitesinde Termal spektrofotometre ile laboratuvarımızda hazırladığımız DNA örnekleri kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 3.16.'de gösterilmiştir,

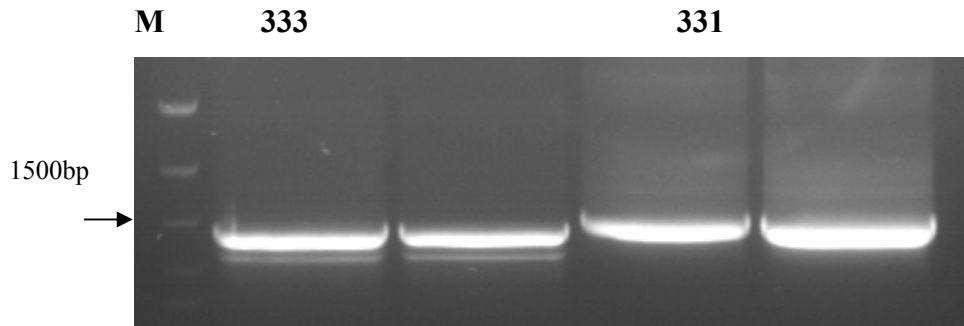
Çizelge 3.16. Gr(-) basillerin %G+C değerleri

| Suş No | 101 | 331 | 333 | 335 | 337 | 385 |
|--------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|
| Tm | 80,75 | 81,50 | ND | 81,80 | 81,10 | 81,70 |
| %G+C | 61,56 | 63,12 | ND | 63,74 | 62,28 | 63,54 |
| | 62 | 63 | ND | 64 | 62 | 64 |

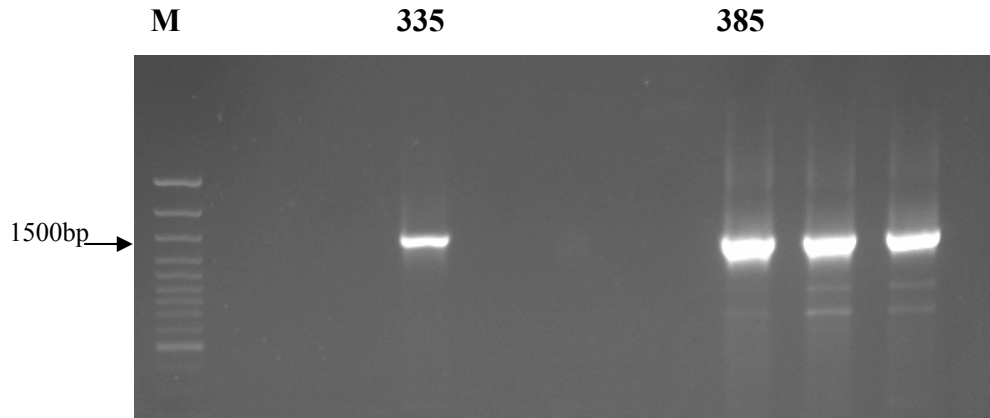
3.10. 16S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltılması



Şekil 3.38. PZR ürünleri (a)



Şekil 3.39. PZR ürünleri (b)



Şekil 3.40. PZR ürünleri (c)

Şekil 3.9-10-11-12 de görülen bantlar 1529 bp olan 16S rRNA geninin PZR da uygun şekilde çoğaldığını marker değerleri ile göstermektedir. Bu bantlardan saflaştırılan PZR ürünlerinden dizi analizi için ikinci PZR yapılmıştır. Oluşan PZR ürünü dizi analizi için Beckman Coulter Ceq 8000 Genetik Analiz Sistemi cihazı kullanılmıştır. Okunan DNA baz dizileri aşağıda gösterilmiştir. İzolatlardan 101 331 ve 337 numaralı suşların dizi analizleri yapılmış, bu suşlardan 101 numaralı örnekte 577, 331 numaralı örnekte 961, 337 numaralı örnekte 897 adet baz okunabilmiştir.

3.11. DNA Dizi Analizi Sonuçları

İzolat 101: 577 baz

```

AGGGAGAAACATTACGTTGGTATGCCTAAGACAATAGCAAGTCAGAA
CGGTCGGTTTATCGCAGCCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGT
GACCTACCCCAAAGTCTGGTGACAACTAGGAGAAATCTTAGCTAATCC
TGGATGTGGACATCTACTTTGGTGGATGTTTAAAGCTTCGGCGCTTTGG
GATGGGCCTGCGGCGCATCAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAA
GCCGACGACGCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACAGGGGTA
CTGAGACACGGACCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTC
CGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGATACCGCCTTGTATTTTGTAC
GAAGCCCCTTTCGGGGGGTGGTTAAACCTTTCTGAAAACCTCCGGGGA
AACGAAATAAATTGGAACGGGGTAACCCGAAGGGTAATTAGCCCACC
GGGGCTAAACTCCCGTGCCAGCAGCCCGCGGTAAATACGGAGGGTG
CCAAGCCGTTAACCCCGGATTTACTTGGGGTGGTAAAAGGGGGCCGT
TGTTANGCCCGGGTCCTCCTTCAAAGTTTCCGAAT

```

101 Numaralı suş için DNA dizi analizi sonuçlarının NCBI de değerlendirilmesi

[gi|15987117|gb|AF418002.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|15987117|gb|AF418002.1) Meiothermus taiwanensis suş WR-220 16S ribosomal RNA

[gi|22595424|gb|AF407750.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|22595424|gb|AF407750.1) Meiothermus sp. R55-11 16S ribosomal RNA %) Strand=Plus/Plus

[gi|22595423|gb|AF407749.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|22595423|gb|AF407749.1) Thermus sp. R55-10 16S ribosomal RNA

[gi|62000029|emb|AJ871173.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|62000029|emb|AJ871173.1) Meiothermus ruber partial 16S rRNA

[gi|2578414|emb|Y13597.1|MRY13597](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|2578414|emb|Y13597.1|MRY13597) Meiothermus ruber 16S rRNA

İzolat 331: 961 baz

CGCTGCTGCGTGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCGGTCCGCGGGG
 CTTTTACTCCGTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTGAC
 CTACCCTGAAGAGGGGGACAACCCGGGAACTCGGGCTAATCCCC
 ATGTGGACCCGCCCTTGGGGTGTGTCCAAGGGCTTTGCCCGCTTCC
 GGATGGGCCCGCGTCCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCACCA
 AGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGGCCGGCCACAGGGGC
 ACTGAGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTT
 CCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAAGAA
 GCCCTTCGGGGTGTAACCTCCTGAACCCGGGACGAAACCCCGACGAG
 GGGACTGACGGTACCGGGTAATAGCGCCGGCCAACCTCCGTGCCAGC
 AGCCGCGGTAATACGGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTCACTGGGC
 GTAAAGGGCGTGTAGGCGGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGACCACG
 GCTCAACCGTGGGGGAGCGTGGGATACGCTCAGGCTAGACGGTGGGA
 GAGGGTGGTGAATTCCCGGAGTAGCGGTGAAATGCGCAGATACCCG
 GAGGAACGCCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTACCCGTGACGCT
 GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTN
 ACGCCCTAACGATGCGCGCTAGGTCCTGGGTCTCTGGGGGCGAGCTAC
 GCGTTAGCGCGCCGCCTGGGAGACGGGCGCAGGCTGAACTCAAGGAA
 TGACGGGGGCCCGCCAGCGGTGACATTGGTATTCGAGCAGCGAGACGT
 ACAGCNGACTCANGAACGGGTAGCTGGGTCCCAGGACCCACAGGGT
 CGATGCCCTTACCTTGCGAGGGTG

331 Numaralı suş için DNA dizi analizi sonuçlarının NCBI de Değerlendirilmesi

[gi|45385854|gb|AY554280.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|45385854|gb|AY554280.1) Thermus thermophilus 16S ribosomal RNA

[gi|6901429|emb|AJ251939.1|TTH251939](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|6901429|emb|AJ251939.1|TTH251939) Thermus thermophilus 16S rRNA

Ízolat 337: 897 baz

CGTAAACAGACTTAGCGTGTTGTGTCTGTTTGGCGCTGAGATGAACAA
TAGACAAACGTNCAGNAGGCCGTGTATCCTATGTGTGTGCGCACAGNC
TATCGTNCTCTGTTTCAGGGATCAGAGCTGTGACGCGAGCCGGGGTACG
AGGGTAGCAGTCGATACGAGCGTGAACGCTCAAACCCTTTGTTACACAC
GTCGATAGGGAGCACGAGAGCAATCACAGCGGGTGAAAGAGCGCACA
AAGCGTCTTACCCGTCCTCACAGTCACTCGGTGAAGTTACAGTGCATC
CTGTNGTGCGGCATGCAGTAGAGGTGGCGCGAAGAGGTGCGCGTCAA
GCTATGGGCTTGGCGGATGGNGTCCTGCGAGCGCATTGAGGCGTAGAT
ATGGGCTGCGGGCGCTNCACGGCGNCACCTAAACCCAGGAGGTGACC
CGCAACCCGGAAATTCGTCCCGGATTAACGCCCGCCAGCAAACGCCCC
TCGAAAGGCAAAGAGGGGTTGGGAACCCCGGGCCCCACCACCTGCG
GGAACCTCCAGAATCACGTGNCCGCAGGACGTCCCTCACGTGGGAAG
GNCATGNACGCTAGCGGGGNAGAGTGTTTTCCCAAGCACACTTGGG
GGNGCCGGAATATCTGTCTTTTTTGTCTTACTTTGCGTGAAAGGGCCA
AACGCGGACCCCGAACCAGGTCTCGCCAAAATCGGAAATGGGGAAAT
GGGGTTCTTNCTCCGCGAAGTAAGGCTAAGAAGGGTGACTGATATGTC
CCAGGGGAACAANGAAAAGGATNAGCGGTTNCGCAAACAGGGGGGC
CGGGTTAACCCCTTTGGAAACCGGGGTTTAACCCCTTTTGGAAACC
ACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCCCCCCCCCCCCGGGGGGGGCCCT
TTA

3.12. İdentifikasyon Sonuçlarının Karşılaştırılması

İzole edilen suşlara uygulanan biyokimyasal testler, VITEC testleri, yağ asidi analizleri ve 16S rRNA dizi analizi verilerine göre identifikasyon sonuçlarının karşılaştırılması çizelge 3.17’de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 17. İzolara uygulanan, biyokimyasal testler, VITEC testleri, yağ asidi analizleri, DNA dizi analizi sonuçlarının karşılaştırılması

| Örnek No | Biyokimyasal test | VITEC analizi | Yağ asidi analizi | DNA dizi analizi |
|----------|--------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Gg03 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge. stearothermophilus</i> | <i>Ge.stearothermophilus</i> | |
| Gg04 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge. stearothermophilus</i> | | |
| Gg07 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge.stearothermophilus</i> | <i>Ge.stearothermophilus</i> | |
| Gc02 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge.stearothermophilus</i> | | |
| Gc03 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge.stearothermophilus</i> | | |
| Ö04 | <i>Geobacillus</i> | | <i>Ge kaustophilus</i> | |
| Ö05 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge. thermodenitrificans</i> | | |
| Ö06 | <i>Geobacillus</i> | İdentifiye edilemedi | | |
| Ö08 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge. thermodenitrificans</i> | | |
| Ö10 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge. thermodenitrificans</i> | <i>Ge.stearothermophilus</i> | |
| H21 | <i>Geobacillus</i> | | <i>Ge.stearothermophilus</i> | |
| H22 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge.stearothermophilus</i> | | |
| H24 | <i>Geobacillus</i> | İdentifiye edilemedi | İdentifiye edilemedi | |
| Gd02 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge.stearothermophilus</i> | | |
| Gd10 | <i>Geobacillus</i> | | <i>Ge.stearothermophilus</i> | |
| Gd12 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge. thermodenitrificans</i> | | |
| Gd53 | <i>Geobacillus</i> | | <i>Ge.stearothermophilus</i> | |
| K01 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge. thermodenitrificans</i> | <i>Ge.stearothermophilus</i> | |
| K42 | <i>Geobacillus</i> | | <i>Ge.stearothermophilus</i> | |
| E02 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge. thermodenitrificans</i> | <i>Ge. kaustophilus</i> | |
| E04 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge. thermodenitrificans</i> | <i>Ge.stearothermophilus</i> | |
| E06 | <i>Geobacillus</i> | İdentifiye edilemedi | <i>Ge.stearothermophilus</i> | |
| S01 | <i>Geobacillus</i> | İdentifiye edilemedi | <i>Ge.stearothermophilus</i> | |
| S02 | <i>Geobacillus</i> | <i>Ge.stearothermophilus</i> | | |
| 101 | <i>Meiothermus</i> | | <i>T. aquaticus</i> | <i>Me. taiwanensis</i> |
| 331 | <i>Thermus</i> | | | <i>T. thermophilus</i> |
| 333 | <i>Thermus</i> | | <i>T. aquaticus</i> | |
| 335 | <i>Thermus</i> | | <i>T. aquaticus</i> | |
| 337 | <i>Thermus</i> | | <i>T. aquaticus</i> | |
| 385 | <i>Thermus</i> | | <i>T. aquaticus</i> | |

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. Suşların İzolasyon, Morfoloji ve Biyokimyasal Karakteristikleri

Bulduğumuz bölge jeolojik yapısı itibarı ile pek çok sıcak su kaynağına sahip olmasına rağmen, bu kaynakların mikrobiyolojik profillerini belirleyen kapsamlı bir çalışmanın olmadığı bilinmektedir. Günümüzde yaşadığımız biyosferin önemli bir parçasını mikroorganizmalar oluşturur, bu canlıların, besin üretiminde kullanılanlar, insan, bitki ve hayvanlarda hastalık oluşturanlar dışında kalanlarının ise hala tanımlanamamış olduğu bildirilmektedir (Whitman ve ark., 1998). Oysaki, termal kaynakların mikrobiyal komitelerini oluşturan heterotrofik mikroorganizmaların biyosferin kimyasal yapısı üzerinde çok önemli katkılarının bulunduğu tespit edilmiş, doğal ortamlarında bulunan bu canlıların yalnızca %1'inin mevcut mikrobiyolojik tekniklerle izole edilebildiği bildirilmiştir (Hugenholtz ve ark., 1998).

Bu çalışmada, yakın çevresel sıcak su kaynaklarından alınan su örnekleri, termofilik bakteri çeşitleri açısından incelenmiş, termofilik *Bacillus*, *Thermus* ve ekstrem termofil *Archaea* profilleri çıkarılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla kaynaklardan toplanan su örnekleri laboratuvara mümkün olan en kısa zamanda taşınmış, bir kısım örnek de kaynaktan alındığında besi ortamına aktarılmıştır.

Örneklerimizin alındığı termal kaynakların sıcaklıkları 71 ile 212⁰C, pH ları ise 6,5-8 arasında değişmektedir. Bu şartlar altında gelişme gösteren *Archaea* türlerinin ise, *Pyrobaculum*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Staphylothermus*, *Pyrodictium*, *Hyperthermus*, *Archaeoglobus* olabileceği bildirilmiştir (Madigan ve ark., 2000). Örnek aldığımız kaynaklardan Ömerli ve Gecek 98⁰C, Eynal 163⁰C, Kızıldere 212⁰C sıcaklığa sahiptir. Buna rağmen *Archaea* izolasyonu yapılamamıştır. Bunun farklı sebeplerinin olduğu düşünülmektedir. Bu sebepler, kaynakların sıcaklığı ve basıncı ile bizim inkübasyon sıcaklıklarımız ve basınç ayarlarımızın denk olmaması, anaerobik şartların tam olarak sağlanamaması, H₂/CO₂ ve N₂/CO₂ oranlarının tam olarak oluşturulamaması olabileceği gibi, kaynaktan alınan su örneklerine kaynağın 100 metre altında korozyonu önlemesi amacı ile karıştırılan ferrofost kimyasal maddesinin bakterilere zarar vermiş

olabileceği de ileri sürülebilir. Bu konu ile ilgili yapılmış benzer izolasyon çalışmalarında inkübasyon sıcaklığının 85°C ile 100°C arasında, H₂, CO₂ ve N₂ oranlarının ise H₂/CO₂ (80/20) ve N₂/CO₂ (80/20) değerlerinde olması gerektiği bildirilmiştir (Huber ve ark., 1987; Huber ve Steter., 1994). Ayrıca bu ortamlarda hiç *Archaea* bulunmuyor da olabilir. Papua Yeni Gine hidrotermal kaynakların alt tabakasından 448.6-99.4 metre kaynak derinliğinden alınan su örneklerinin incelendiği bir çalışmada *Geobacillus* sp. ve *Deinococcus* sp. türlerinin bulunduğu ancak *Archaea* izole edilemediği bildirilmiştir (Kimura ve ark, 2003). Yapılan bir başka çalışmada da kaynaktan alınan su örneklerin vidalı kapaklı şişelere aktarılıp kaynak sıcaklığı sabit tutularak ve bir kısım su örneği ise dakikada 20 litre su örneğini 0.2 µm por çaplı bir filtreden geçiren sistemden 30 dakika boyunca süzerek toplanmış örneklerin inkübasyonu sonucunda termal kaynaklardan *Termococcus*, *Bacillus*, *Thermonema*, *Archaea*, *Desulfurococcus mobilis* izolasyonu yapıldığı bildirilmiştir (Martenson ve ark., 2001; Tachibana ve ark., 1999). Bizim çalışmamızda su sıcaklığını sabit tutmak için vidalı kapaklı duran şişelerini taşıyabileceğimiz genişlikte termoslar kullanılmış ancak kaynak sıcaklığı aynen korunamamış, laboratuvara geldikten sonra yeniden ölçülen sıcaklıkların kaynak sıcaklığından yaklaşık 10-15°C daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Archaea izolasyon için yapılan çalışmalarımızda 80°C'de 5 gün süre ile besi yeri 88'de inkübe edildilen Eynal kaplıcası su örneğinde Gr(-) basillerin geliştiği saptanmış, ancak bu basillerin plak kültürde üretilmeleri sağlanamamış, iki defa sıvı kültüre pasajlandıktan sonra tekrar sıvı kültürde de üretilemedikleri gözlenmiştir. Yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda izole edilen bu kültürün, elimizde standart suşu bulunan *Pyrobaculum islandicum*'a çok benzediği gözlenmiştir. Ancak yaptığımız çalışmalarımızda Almanya Regensburg Üniversitesinden sağlanan *P. islandicum* kültürünün de üretilmesi sağlanamamıştır.

Diğer kaynakların sıcaklıklarının *Archaea* izolasyonu için uygun olmadığı saptanmıştır.

Archaea izolasyonu için yapılan çalışmalarla birlikte termofilik *Bacillus* ve *Thermus* cinslerinin izolasyonu da yapılmıştır. İzolasyonu yapılan bakterilerden

bir kısmı, -80°C’de stoklandıktan sonra tekrar üretilmemiştir. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada da sıvı kültürde dondurularak saklanan termofil bakterilerin yeniden canlandırıldıklarında sayıca azaldıkları bildirilmiştir (Halik., 1999).

Çalışmalarımız 57 adet Gr(+) ve 6 adet Gr(-) bakteri ile yürütülmüştür.

Gr(+) bakteriler nutrient broth, besi ortamı 74 (Thermus besi ortamı), besi ortamı 88, ortamlarında 75⁰C’nin altındaki sıcaklıklarda çok yoğun üreme göstermişlerdir. 70 °C’den sonraki sıcaklıklarda Gr(-) ler daha yoğun üreme göstermiştir. Gr(-) izolatlarımızın tamamı besi ortamı 74 de 225 rpm çalkalamada iyi üreme göstermiştir. Çalkalanmayan *Thermus* besi ortamı kültürlerinde *Thermus*’ların üremediği, yada 5 gün süre ile inkübasyondan sonra çok az üredikleri saptanmıştır. İzole edilen Gr(-) suşlarda 101 numaralı örneğimiz daha önce dört defa su aldığımız Gazlıgöl kaplıcasından alınan su örneklerinde üretilmediği halde, son alınan örneklerde 225 rpm çalkalama şartları sağlandıktan sonra 24 saat sonunda 60°C’de inkübasyondan sonra izole edilmiş, bu da bize bu bakterilerin izolasyonunda küçük ayrıntıların önemli sonuçlar ortaya çıkarabileceğini göstermiştir. Yeterince havalandırma olmayan kültürlerde *Thermus* izolasyonu yapılamamıştır.

57 adet Gr (+) izolatın biyokimyasal testleri incelendiğinde izolatlarımızın tümünün indol testine negatif sonuç verdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda da *B. thermocatenulatus* dışındaki türlerin indol testine negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (Sarp ve ark., 1991).

Uygulanan MR-VP testleri sonucunda K41 suşu hariç diğer bütün suşların Voges Proskauer testine negatif sonuç verdiği, metil kırmızısı testi sonuçları ise Ö06, Ö10, H01, H03, H14, H16, H18, Gd11, Gd53, Gd58, K41, E02, E06, E09, E10, için negatif, H21, Gd10, için değişken diğer suşlar için pozitif olarak saptanmıştır. Standart bakteriler için yapılan çalışmalar sonucunda da MR-VP testi sonuçları *B. stearothermophilus*, *B. kaustophilus*, *B. thermocatenulatus*, *B. thermodenitrificans*, *B. thermoruber*, için negatif, *B. thermoglucosidasius*, *B. caldolyticus*, için zayıf üreme saptandığı bildirilmiştir (Sarp ve ark., 1991).

Gr(+) suşlara uyguladığımız sitrat testleri sonucunda, yirmi dokuz suşun negatif, Gg07, K41 suşlarının değişken, diğer suşların pozitif sonuç gösterdiği saptanmıştır. Yapılan benzer çalışmalarda ise, *B. thermoglucosidasius*, değişken,

B.caldotenx, *B. caldovelox*, *B. caldolyticus*, *B. kaustophilus*, *B. thermocatenulatus*, pozitif, *B.stearothermophilus*, *B.pallidus* 'un ise negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (Nazina ve ark., 2001; Sarp ve ark., 1991).

Katalaz testleri sonucunda, Gg07, Gg12, Ö06, Ö08, suşlarının katalaz enzimi üretmediği, diğer suşların ise ürettiği saptanmıştır. Standart suşlar ile yapılan çalışmalarda da *B. stearothermophilus*, *B. caldotenx*, *B. caldovelox*, *B. caldolyticus*, *B. thermocatenulatus*, *B. thermoruber*'in, katalaz negatif, *B. thermoglucosidasius*, *B. pallidus*, *B. thermocloaceae* *B. thermoleovarans*, *B. kaustophilus*, *B. thermodenitrificans*, *B. flavythermus* türlerinin ise katalaz pozitif özellikte olduğu bildirilmiştir (Nazina ve ark., 2001; Sarp ve ark., 1991).

Bizim çalışmamızda 14 suş nitrat pozitif bir suş değişken özellik göstermiştir. Yapılan benzer bir çalışmada da *B. pallidus*, *B. thermocloaceae*, *B. thermodenitrificans*, *B. thermoruber*, nitrat negatif olarak bildirilmiştir (Sharp ve ark., 1991).

İzolatlarımızdan altısının H_2S ürettiği tespit edilmiştir. Sharp ve arkadaşlarının bildirdiğine göre ise, *B. thermoglucosidasius*, 'un H_2S pozitif *B.caldotenx*, *B. caldovelox*, *B. caldolyticus*, *B. thermocatenulatus*, *B. thermoruber*, *B. flavythermus* 'un, ise negatif sonuç vermektedir (Beldüz ve ark., 2001; Sharp ve ark., 1991).

İzole edilen 57 örnekten yirmi üçü negatif ikisi zayıf üre kullanımı göstermiştir. Yapılan araştırmalarda ise *B. thermoglucosidasius*, *B. thermoruber*, pozitif, *B. thermocatenulatus*, *B. flavythermus* 'un negatif sonuç gösterdiği bildirilmiştir (Beldüz ve ark., 2001; Sarp ve ark., 1991).

Bizim izolatlarımızdan Gg12, Ömerli'den izole edilen beş adet suş, Hüdai'den izole edilen dokuz adet suş, Gediz'den izole edilen dört adet suş, K43, E06, E10 ve S02 suşları üre negatif özellik göstermiş, NaCl'de üreme ve sitrat testlerinde *B. thermocatenulatus* ile benzerlik saptanmıştır. *B. flavythermus* ile benzer sonuçlarımız olmasına rağmen izolatlarımızın koloni özelliklerinin bu bakteriye benzemediği gözlenmiştir.

İzole edilen altı adet Gr(-) suşa *Archaea* identifikasyonu için streptomisin, cloramfenikol, vankomisin ve neomisin antibiyotiklerinde üreme tesleri yapılmış, hiçbir örneğin üreme göstermediği saptanmıştır. Termofilik bir *Archae* türü olan

Pyrobaculum'un izole edildiği bir çalışmada ise izole edilen suşlara antibiyotik dirençliliği testleri uygulanmış, 100 µg/ml antibiyotik içeren besi ortamında üretilen kültürlerin antibiyotik direnci gösterdiği bildirilmiştir (Huber ve ark., 1987).

İzolatlarımıza uygulanan optimum sıcaklık tespiti testleri sonucunda 28⁰C'de üreme olmadığı, 37⁰C'de ise beşi çok zayıf on yedi suşta üreme olduğu, 55 ve 65⁰C'de yapılan inkübasyonlarda suşların tamamının ürediği, 70⁰C'de Ö02 , Ö04 H22, E09 üremediği, 75⁰C'de, on yedisi çok zayıf, yirmi bir suşun ürediği, 80⁰C'de ise hiçbir Gr(+) izolatın üreme göstermediği tespit edilmiştir. Bu konuda yapılmış benzer çalışmalarda ise, 30 ⁰C'nin altındaki sıcaklıklarda üremenin olmadığı, optimum üreme sıcaklıklarının 50-65 ⁰C arasında değiştiği, *B. stearothermophilus*, *B. thermocatenulatus*, *B. thermodenitrificans* dışındaki türlerin maksimum 70 ⁰C'de üreyebildikleri bildirilmiştir (Beldüz ve ark., 2001; Nazina ve ark., 2001; Sharp ve ark., 1991).

Yapılan çalışmalar da standart termofilik *Bacillus* türleri için gelişme gözlenen pH aralığının 5,5-9,0 arasında değiştiği bildirilmiştir (Beldüz ve ark., 2001; Nazina ve ark., 2001; Sarp ve ark., 1991). Bizim çalışmalarımız sonucunda ise izolatların yoğun gelişme gösterdiği optimum pH 6-8 arasında saptanmıştır. pH 4 te ikisi çok zayıf olmak üzere on dört suş, pH 5'te yedisi çok zayıf olmak üzere yirmi dört suşun ürediği tespit edilmiştir. İzolatlarımızdan, Gc22, H05, H26, Gd53, Gd58 4-8 arındaki pH seviyelerinin hepsinde gelişme gösterdiği saptanmıştır.

İzole edilen bakterilerin tümünde % 3 NaCl konsantrasyonunda gelişme olmadığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda *B. thermoglucosidasius*, *B. caldovelox*, *B. caldolyticus* *B. kaustophilus*'un % 3 ve daha yüksek değerlerde hiç gelişmediği, *B. stearothermophilus*, *B. caldotenax*, *B. thermocatenulatus*'un ise en fazla % 3 NaCl konsantrasyonunda geliştiği söylenmiştir (Nazina ve ark., 2001; Sarp ve ark., 1991).

İzolatlarımızın tamamında anaerobik büyüme saptanmıştır. Test edilen diğer termofil *Bacillus* türlerinden *B. stearothermophilus*, *B. caldotenax*, *B. caldovelox*, *B. caldolyticus*, *B. thermocatenulatus*, *B. kaustophilus*, *B.*

thermodenitrificans, *B. flavithermus*'da ise anaerobik büyüme olduğu bildirilmiştir (Beldüz ve ark., 2001; Nazina ve ark., 2001; Sharp ve ark., 1991).

Bizim izolatlarımızdan 14'ü zayıf olmak üzere 18 adeti 75⁰C'de üreme göstermiştir. VITEC testleri sonucunda *B. thermodenitrificans* olarak saptanan Ö05, Ö08, Ö10, Gd12, E02, E04, suşlarından Ö08, Gd12, suşlarının 75⁰C'de büyüebildikleri saptanmıştır.

İzolatlarımızın karbonhidrat kullanım testleri tüpte şekerler ve fenol red indikatörü kullanılarak ve VITEC sistemi ile yapılmıştır. İki yöntemde de sonuçlar birbirini desteklemiştir. Toplam 57 izolattan biyokimyasal testler ve koloni yapıları farklı olanlardan on dokuz adeti seçilmiş bunlar VITEC ile tekrar teste tabi tutulmuş, izolatlarımızın dokuzunun *Geobacillus stearothermophilus*, altısının ise *Geobacillus thermodenitrificans* olabileceği sonuçları elde edilmiştir. Sıcaklık testlerine göre de Ö08 ve Gd12 suşlarının *B. thermodenitrificans* olma olasılığı oldukça yüksektir.

Dört izolatımız da identifiye edilememiştir. İdentifiye edilemeyen izolatlardan olan H24 suşu, biyokimyasal tester, VITEC testleri, SDS-PAGE analizi sonuçları ve yağ asidi analizi sonuçlarına göre herhangi bir gruba dahil edilememiş sınıflandırmada düşük oranda da olsa yeri tespit edilememiştir. Bu izolatın farklı bir suş olduğu ve yeni yapılacak olan çalışmalarımızda identifikasyon testlerinin sürdürülmesi gerektiği düşünülmektedir. Kristjonsson ve Stetter (1991) ise *B. stearothermophilus*'un gelişmek için karbon kaynağı olarak glikoz ve sakkarozu ihtiyaç duyduğunu bildirmiştir.

Gram pozitif suşlara uygulanan bakteriosin üretimi testlerinde *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. fecalis*, test mikroorganizması olarak kullanılmış, pozitif sonuç saptanamamıştır. Yapılan çalışmalarda da termofil bakterilerin bakteriosin ürettiği ancak bunun yüksek sıcaklıklarda yaşayan mikroorganizmalara karşı etkili olduğu, mezofiller üzerinde etkili olmadığı bildirilmiştir (Sharp et. all., 1991).

Gr(-) suşlara uygulanan biyokimyasal test sonuçları çizelge 3.7 de verilmiştir. İzolatlarımızın tamamının Gr(-), indol, metil red, pH 5'de, % 3 ve % 3 NaCl'de üreme ve sorbitolü kullanma testlerine, negatif, sitrat, katalaz, H₂S, 65⁰C, 70⁰C'de ve % 1 NaCl'de üreme, glikoz,maltoz, sakkaroz, salisin ve

galaktozu kullanma testlerine pozitif sonuç verdiği saptanmıştır. 385 numaralı izolat maksimum 83 derecede üreme göstermiştir. İzolatlarımızdan beşi sıvı besi ortamında havalandırma olmadan zayıf üreme göstermiştir. Standart suşlar ile yapılmış benzer çalışmalarda da *Thermus* suşlarının katalaz, glikoz, fruktoz testlerine pozitif, % 3 NaCl'de üreme, ksilozu kullanma, testlerine negatif sonuç verdiği, optimum büyüme sıcaklığının 70 °C olduğu bildirilmiştir (Sharp ve Williams., 1988; Nobre ve Da Costa 2001; Chung ve ark., 2000), Bizim izolatlarımızdan beşinin optimum 75°C'de birinin ise 60°C'de üreme gösterdiği 337 numaralı suş hariç diğerlerinin fruktozu kullanmadığı saptanmıştır.

Thermus besi ortamında 225 rpm çalkalamayla üreyen 331, 333, 335, 337, 385 numaralı kültürlerimizin özellikleri bilinen *Thermus* türlerinin özellikleri ile karşılaştırıldığında, gelişme sıcaklıkları, koloni özellikleri, katalaz pozitif olmaları ve % G+C oranlarının benzer olması sonucu *Thermus* cinsine dahil olduklarını söyleyebiliriz. 101 numaralı izolatımız ise daha düşük sıcaklıkta üremesi, %GC oranının daha düşük olması, koloni rengi, sitrat negatif olması, ile *Meiothermus* cinsine ait olduğunu söylememiz mümkündür. Bu saptamamızı 101 ve 331 numaralı izolatlarımıza uyguladığımız DNA dizi analizi testleride doğrulamaktadır.

4.2. SDS-PAGE Analizleri

Çalışmalarımızda Gr(+) basillere uygulanan SDS-PAGE testleri sonuçları Şekil 3.25, 3.26., 3.27., 3.29., 3.30.,'da gösterilmiş, Gr(+) suşların SDS-PAGE analizine göre homolojisisini gösteren dendogram Şekil.3.31'de verilmiştir. Bu çalışma sonucunda 57 izolatın on beşi birbirine, *B. stearothermophilus*'a ve *E.coli*'ye % 50 ye varan değerlerde benzerlik gösterdiği altı izolatın protein değerlerinin ise tamamı ile diğer suşlardan farklı bir dizilime sahip olduğu saptanmıştır. Gr(-) basillere uygulanan SDS-PAGE testleri sonuçları Şekil 3.6, 7, 8'de gösterilmiş, Gr(-) suşların SDS-PAGE analizine göre homolojisisini gösteren dendogram Çizelge 3.35'de verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda ise izolatlarımızdan 101 numaralı suşun *T. thermophilus* HB8 ile çok yakın benzeştiği gözlenmiştir. Ancak bizim izolatımız optimum 60°C'de gelişirken, *T.*

thermophilus suşlarının optimum 73 °C'de gelişme gösterdiği bildirilmiştir (Williams ve Da Costa., 1994). Diğer izolatlarımız standart suşlar ile benzeşmediği, 331 ve 337 suşunu birbirine % 50 oranda homoloji gösterdiği, 333, 335 ve 385 numaralı suşların diğer izolatlar ve standartlara % 30 oranında homoloji gösterdiği saptanmış olduğundan bu suşların farklı genomik özelliklere sahip izolatlar olduğu ileri sürülebilir Bu konuda yapılmış çalışmalarda SDS-PAGE analizinin numerik taksonomi sonuçları ile yüksek korelasyon gösterdiği, kolay tekrarlanabilir olduğu, DNA-DNA homolojisi çalışmaları ile yakın benzerlik gösterdiği ve jel üzerinde görülen protein bantlarının izoelektrik odaklanmasının 0,2-0,5 mm boyutlarında olmasından dolayı homolok bantlarla örtüşme düzeyinin çok yüksek olduğu, bu sebepten de SDS içeren % 10'luk jelde yapılan bu tür çalışmaların, uygun ve çok pratik bir sistem olduğu bildirilmiştir (Jackman, 1982). Yapılmış başka bir çalışmada da beş adet Gr(-) *Thermus* izolatının *T. thermophilus* ve *T. aquaticus* ile olan yakınlıkları SDS-PAGE ile gösterilmiştir (Beffa, 1996). Yine bu konuda yapılmış diğer bir çalışmada ise Karadeniz Bölgesinden alınan sıcak su örneklerinden izole edilen *B. flavothermus* suşlarının protein yapıları *B. flavothermus* DSM 2641 ile karşılaştırılmış izolatların *B. flavothermus*'a % 40'ın altında homoloji gösterdiği saptanmıştır (Beldüz ve ark., 2001).

4.3. Gaz Kromatografisi İle Yağ Asidi Analizleri

İzole edilen kültürlerden yirmi altı adet Gr(+) altı adet Gr(-) ve on dört adet karşılaştırma materyali olarak kullandığımız bakterilere yağ asidi analizi testleri uygulanmış, sonuçlar Çizelge 3.8., 3.9., 3.10., 3.11., 3.12.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre Gr(+) suşlardaki yağ asitlerinden 15:0 iso, 16:iso ve 17:0 iso yağ asitleri yüksek oranlarda bulunurken anteiso olanlar düşük oranlarda saptanmış, 2-OH grubu üç izolatta saptanırken 3-OH grubuna sadece bir izolatta rastlanmıştır, diğer suşlarda bu gruplar saptanamamıştır. İzolatlarımız arasında birbirine tamamıyla uyan örnek gözlenememiştir, diğer taraftan major gruplar incelendiğinde, Gg04, Gg07, Ö02, Ö06, Ö10, H06, H21, H22, H25, E04, E06, Gd03, Gd10, Gd12, K01 ve *B. stearothermophilus* örneklerinde 15:0 iso oranları

yüksek değerlerde, anteiso oranları düşük değerlerde saptanmıştır. Gd03 ve Gd12 suşlarının sonuçları incelendiğinde sadece % 5.38 oranında fark ile birbirinin aynısı değerlere sahip oldukları tespit edilmiştir. Gg03, Gc02, Ö04, Ö05, S01, H24, E02, suşlarında ise 14:0 yağ asidi diğer örneklerden daha yüksek oranlarda saptanmıştır. 15:0 yağ asidi bizim izolatlarımızda % 28.42 ile 13.46 değerlerinde saptanırken Nazina ve arkadaşlarının (2001) yapmış oldukları çalışmada bildirdiklerine göre % 0.5 ile 6 arasında değişen değerlerde saptanmıştır. 16:0 iso yağ asidi izolatlarımızdan on iki tanesinde % 10'un oldukça üstündeki değerlerde olduğu tespit edilirken, diğer Gr(+) suşlarda % 10'un altında olduğu saptanmıştır. 17:0 anteiso yağ asidinin ise dokuz suşta % 10'un üstünde değere sahip olduğu tespit edilmiş, diğer suşlarda düşük oranlarda olduğu görülmüştür. 18:0 yağ asidinin 12 suşta bulunduğu saptanmıştır Yapılan VITEC çalışmalarımız sonucunda izolatlarımızın *Ge. stearothermophilus* ve *Ge. thermodenitrificans* olduğu saptanmıştır. Yağ asidi analizi sonuçlarımızı yapılmış standart çalışmalar ve laboratuvarımızda analizini yaptığımız *Ge.stearothermophilus* yağ asidi oranları ile karşılaştırdığımızda ise VITEC sonuçlarına göre *Ge. stearothermophilus* olarak saptanan Gg07 ve K01 suşlarının yağ asidi analizi sonuçlarında standart olarak kullandığımız *Ge. stearothermophilus* sonuçlarına benzer oranda saptanmıştır. VITEC analizi ile identifiye edilemeyen Ö06, S01, H24, E06 suşlarının yağ asidi analizleri ise diğer suşların oranlarından farklı olarak tespit edilmiştir. Daha önce yapılmış benzer bir çalışmanın sonuçları ile karşılaştırdığımızda ise (Nazina ve ark., 2001) VITEC sonuçlarına göre *B. thermodenitrificans* olarak tespit edilen suşlardan Ö05, E02, izolatlarımız yağ asidi özellikleri bakımından benzer bulunmamış, Gd12 ve Ö10 ve E04'ün 15:0 yağ asidi sonuçlarında ise çok az benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmamız sonucu saptanan oran, ortam, kişi ve deney farkından dolayı oluşmuş olabileceğinden çalışma yeni deneyler ile desteklenmelidir.

Yapılan benzer bir çalışmada da 16:0 iso yağ asidinin *B. thermodenitrificans* 466, *B. thermoleovorans* 155366^T, *B. thermocatenuatus* B 1259, *B. stearothermophilus*, *B. caldotenax* DSM 406, *B. caldolicus* DSM 405, *B. caldovelox* DSM 411, *B. thermoglukosidasius*, *B. licheniformis*, *B. simithii* DSM 459, *B. thermosphaericus* P11^T, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* DSM

10154^T, türlerinin hepsinde bulunduğu ve miktarlarının 2,0 ile 37,0 arasında değiştiği, 17:0 iso yağ asidinin, standart olarak kullanılan bütün türlerde 3,0 ile 13,0 arasındaki değerlerde bulunduğu, 17:0 anteiso yağ asidinin de bütün standartlarda bulunduğu ve oranlarının 7,1 ile 42,0 arasında değiştiği, 18:0 yağ asidinin ise *B. thermodenitrificans* 466, *B. thermoleovorans* 155366^T, *B. thermocatenulatus* B1259, *B. licheniformis* ve *Aneurinibacillus thermoaerophilus* DSM 10154^T 'de bulunduğu ancak miktarının % 0.3 ile 3.4 arasında değiştiği bildirilmiştir (Nazina ve ark., 2001). 10:0 yağ asidinin yalnızca *B. thermoleovorans* 155366^T 'da 2,7 oranında bulunduğu bildirilirken (Nazina ve ark., 2001) bizim izolatlarımızdan yalnızca Gg04 suşunda 1.30 oranında bu yağ asidinin olduğu saptanmıştır. Bir başka çalışmada da lipit parçalanması yapabilen *B. thermoleovorans* IH I91 suşunda yağ asidi analizi yapılmış, 15:0 iso yağ asidinin % 45.88, 17:0 iso yağ asidinin % 31,79 16:0 iso yağ asidinin ise % 8,81 oranında bulunduğu, bu oranların ise toplamım % 86,48'ini oluşturduğunu, 15:0 iso oranının çok yüksek bir oran olduğu ve toplam membran yağ asitlerinin *B. caldotenax* DSM 406, *B. caldoliticus* DSM 405, *B. caldovelox* DSM 411, *B. thermoclocae* suşlarında da yaklaşık % 80 olduğu bildirilmiştir (Markosian ve ark., 2000).

Yaptığımız çalışmalarımız sonucu Gazlıgöl ve Ömerli kaplıcalarından izole edilen altı adet Gr(-) suşun yağ asidi analizleri incelendiğinde, 101 ve 337 numaralı suşlarda 3-OH taşıyan yağ asitlerinin bulunduğu, 2-OH taşıyan yağ asidi içermedikleri, 15:0 iso ve 17:0 iso yağ asidi yüzde oranlarının toplam miktarın, 101'de 69.02, 331'de 60.9, 333'de 53.03, 335'de 66.52, 337'de 76.38, 385'de 58.24 olduğu, 385 numaralı suşta ayrıca 16:0 iso yağ asidinin de 16.08 oranında bulunduğu, saptanmıştır.

Gazlıgöl kaplıcasından izole edilen 101 numaralı suş biyokimyasal ve morfolojik özellikleri bakımından *T. ruber* ile benzerlik göstermiştir. 60°C'de *Thermus* besi ortamında 225 rpm çalkalama ile üretildiğinde turuncu-kırmızı renk oluşturan bu izolat diğer suşlardan daha düşük sıcaklıkta üremektedir ve yağ asitleri çeşit ve miktarları bakımından da *T. ruber* ile benzeşmektedir. 11:0 iso yağ asidi izolatlarımız içinde yalnızca 101 numaralı suşta saptanmış, aynı yağ asidinin *T. ruber*, *T. thermophilus* HB27, *T. Brockianus* Ys34, *T. igniferrae* 1260, *T.*

thermophilus IB21 suşlarında da bulunduğu saptanmıştır. Bu izolatin 15:0 iso ve 17:0 iso yağ asidi değerleri konu ile ilgili yapılmış benzer sonuçlar ile karşılaştırıldığında ise bizim sonuçlarımızın *Me .timidus* SPS 243 ile, morfolojik özellik olarak ise *M. rosaseus* ile, benzeştiği tespit edilmiştir. (Sharp ve Williams., 1988; Ferreira ve ark., 1999; Nobre ve Da Costa 2001; Pires ve ark., 2005). Suş olarak Gazlıgöl kaplıcasından izole edilen bu suş mevcut standart veriler ile karşılaştırılmış, tespit edilen veriler ile tamamen örtüşen bir sonuç saptanamamıştır. Bu durumda izolatomuzun *Meiothermus* cinsi içinde farklı bir suş olabileceği düşünülmektedir.

Ömerli kaplıcasından izole edilen 331 numaralı suşun yağ asidi sonuçları karşılaştırıldığında bu izolata ait değerlerin *T. aquaticus* Ys48 ve *T. brockianus* Ys30 ile yakın değerler olduğu tespit edilmiştir (Nobre ve Da Costa 2001). 333 numaralı izolatin yağ asidi oranlarının *T. thermophilus* HB8 ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak bu izolatin sonuçları da tamamıyla standart suş sonuçları ile örtüşmemektedir. Ayrıca 333 numaralı izolatomuzun sonuçlarının 335 ve 385 numaralı izolatlara ile benzer değerlerde olduğu da belirlenmiştir. 335 ve 385 numaralı izolatomuzun sonuçları birbirine yakın değerlerde saptanmıştır. Bu iki izolatomuzun morfolojik ve biyokimyasal test sonuçlarının da birbirine yakın değerlerde olduğu belirlenmiştir. Ancak bu izolatomuzun sonuçları ile bire bir örtüşen standart suş yağ asidi oranı olmamıştır. 337 numaralı izolatomuzun da bire bir örtüştüğü standart değer saptanamamıştır. Bu izolatomuzun iso yağ asidi yüzdesi % 76.38 ile en yüksek değerde saptanmıştır.

Bu konuda yapılmış benzer bir çalışmada da, yüksek erime noktasına sahip iso yağ asitlerinin miktarının fazla, düşük erime noktasına sahip anteiso yağ asitlerinin miktarının az olmasının, yüksek sıcaklık seviyelerinde yaşama adaptasyonun getirdiği bu özellik sayesinde membran akışkanlığının sürdürülebildiği bildirilmiştir (Markossian ve ark., 2000). Bizim izolatomuzun tamamında yüksek erime noktasına sahip iso yağ asitlerinin oranının anteiso olanlara oranla yüksek olduğu saptanmıştır.

T. silvanus ve *T. chliarophilusm* ile yapılan benzer bir çalışmada da bu iki türün *T. ruber*'e akraba türler olduğu , yağ asidi oranlarının *T. ruber* ile benzerlik gösterdiği, 15:0 iso ve 17:0 iso yağ asitlerinin yüksek oranda bulunduğu

bildirilmiştir (Tenreiro ve ark., 1995). Bizim altı adet izolatomuzun tamamında 15:0 iso ve 17:0 iso yağ asitleri yüksek miktarda saptanmış, düşük erime sıcaklığına sahip anteiso yağ asitlerinin oranının ise az miktarda olduğu tespit edilmiştir. Bu özellik ilede izolatomuzun yüksek ısılara direncinin arttığını söyleyebiliriz.

Başka bir çalışmada da *T. igniterrae* ve *T. antranikiani* yağ asidi oranları araştırılmış, % 50 oranında 15:0 iso ve % 31 oranında 17:0 iso olduğunu ve diğer *Thermus* türlerindeki yağ asitlerinden 17:0 (% 40-50) yüksek oranda, 15:0 iso (% 10-15) yağ asidinin ise düşük oranda bulunduğunu, tip suş olarak kullanılan *T. filiformis* ve *T. thermophilus*'un yağ asitlerinden 15:0 iso'nun (% 4-6) düşük oranda bulunduğunu ancak anteiso yağ asitlerinin yüksek oranlarda bulunduğu bildirilmiştir (Chung ve ark., 2000).

Taiwan'dan izole edilen yeni bir tür olan *Me. taiwanensis* ile yapılan benzer bir çalışmada da, 2-OH iso ve anteiso yağ asitleri araştırılmış, oranların tip suşlara çok yakın olmasına rağmen 15:0 iso, 17:0 iso, yağ asidi oranları anteiso oranlarından daha yüksek seviyede bulunmuş, benzer suşlar arasındaki diğer önemli bir farkın da 18:0 iso diol yağ asidinin yeni izolatta % 4,5 ve 3,1 oranında bulunurken tip suşlarda çok düşük miktarda olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2002). Bizim izolatomuzdan 101 numaralı suşumuz *Meiothermus* türlerine benzerlik göstermekte, ancak 18:0 iso diol yağ asidi içermemektedir. Bu izolatomuzun DNA dizi analizi sonuçları *Me. taiwanensis* ile benzerlik göstermiş, ancak biyokimyasal özelliklerin tam olarak benzeşmediği. izolatomuzun koloni özelliklerinin ise kırmızı-turuncu renkte olduğu saptanmıştır

Deniz hidrotermal kaynaklarından izole edilen, optimum 67,5°C'de büyüyen beyaz renkli koloni oluşturan *Marinithermus hydrothermalis* gen.nov.,sp.nov. ile yapılmış bir çalışmada da, yağ asidi analizleri sonucunda majör yağ asitleri olarak, 15:0 iso (% 40.4), 17:0 iso (% 28.5), 16:0 (% 12.9), 15:0 anteiso (% 6), 17:0 anteiso (% 5.4), 16:0 iso (% 2.8) ve 11:0 iso 3-OH (% 1) saptanmış, bu yağ asidi kompozisyonunun daha önce tanımlanan *Thermus* cinsine benzediği ancak, 11:0 iso 3-OH yağ asidinin *Thermus* cinsinden farklı olduğu bildirilmiştir (Sako ve ark., 2003).

4.4. 16s rDNA Gen Dizi Analizi

Dizi analizi sonuçlarımız NCBI web sitesinde de değerlendirilmiştir.

Bu verilere göre 16S rDNA analizi uygulanan 101, 331 ve 337 suşlarımızdan 101 *Meiothermus*, 331 ve 337 *Thermus* cinslerine ait olduğu saptanmıştır. PCR ile klonladığımız 1500 bazlık DNA parçasından, 101 numaralı örnekte 577, 331 numaralı örnekte 961, 337 numaralı örnekte 897 baz okunabilmiştir. Türlerin tam sınıflandırmasının yapılması için analiz edilmesi gereken 1500 bazı 534R, 517F 1099F 1114R primerleri ile okuma çalışmalarımız sürdürülecektir.

4.5. Gr(-) izolatların % G+C Değerleri

Gazlıgöl ve Ömerli’de izole edilen beş adet Gr(-) izolatın DNA ları izole edilmiş, ve bu DNA örnekleri, termal spektrofotometre kullanılarak % G+C analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 3.16.). İzolatlarımızdan 335 ve 385’in % 63,74 ve % 63,54 G+C oranına sahip olduğu saptanmıştır. Bu iki suşun biyokimyasal test sonuçları da birbirine yakın değerlerde saptanmıştır. Ancak DNA’nın erime sıcaklıkları arasında 0.02 oranında bir fark vardır, diğer taraftan yağ asidi değerlerinde de çok düşük oranda fark olduğu belirlenmiştir. 101 ve 337 numaralı suşların %G+C değerleri birbiri ile aynı olmuştur ancak, bu iki izolatın koloni rengi, üreme sıcaklığı ve yağ asidi analizi sonuçları bakımından tamamıyla farklı sonuçlara sahip olduğu tespit edilmiştir. Standart suşların % G+C oranlarının verildiği çalışmalara göre ise, *T.aquaticus* YT-1 % 64, *T. brockianus* Ys38 %63, *T. filiformis* wai33A1 % 65, *T.oshima* SPS17 % 63, *T.scodotuctus* SE-1 %65, *T.igniterrae* % 70,3 *T. antranikiani* % 65,4 (Saharp ve Williams., 1988; Nobre ve Da Costa 2001; Chung ve ark., 2000), *Me. rosaseus* RH9901 % 66,4, *Me. ruber* DSM1279 % 61, *Me. silvanus* DSM 9946 % 63,6, *Me. cliarophilus* DSM 9947 % 69,9, *Me.cerberus* DSM 11376 % 60,9, *Me. timidus* % 65,1, *Me. taiwanensis* % 61,5 olarak bildirilmiştir (Pires ve ark., 2005; Chen ve ark., 2002;Chung ve ark., 1997; Tenreiro ve ark., 1995).

Bizim 101 numaralı izolatımızın biyokimyasal ve moleküler özellikleri *Meiothermus* cinsine benzemektedir ancak % 100 akraba olduğu bir tür saptanamamıştır. Diğer izolatlarımız *Thermus* cinsinin özelliklerini taşımaktadır, tür düzeyinde identifikasyon için 517F , 534R, 1099F ve 1114R primerleri ile yeni çalışmaların yapılması sürdürülecektir.

4.6. İzolatların Enzim Özellikleri

Sıcak su kaynaklarından izole ettiğimiz suşlardan altı adet Gr(-), üç adet Gr(+) suşa enzim varlığı etkinliği testi uygulanmış, bunun sonucunda, lipaz, tripsin , β -glukronidaz, N-asetil- β -glukozaminidaz, α -mannozidas, α -fruktozidaz enzimlerinin izolatlarımızın hiçbirinde bulunmadığı, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, α -galaktozidaz'ın ise çok düşük oranda olduğu saptanmıştır. Altı adet Gr(-) suşun enzim varlıkları çizelge 3.14. da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre alkalın fosfotaz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), α -glukozidaz, leusin arilamidaz, asid fosfotaz, naftol-AS-BI- fosfohidrolaz, β -galaktozidanidaz, β -glukozidaz maksimum seviyede saptanmıştır. 337 numaralı izolatımızda dokuz farklı enzim çok yüksek oranda tespit edilirken, alkalın fosfotaz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), asid fosfotaz, Naftol-AS-BI- fosfohidrolaz, α -glukozidaz, β -glukozidaz izolatlarımızda en yüksek değerlerde saptanmıştır.

Üç adet Gr(+) suşa uygulanan enzim testleri sonucunda ise alkalın fosfotaz, leusin arilamidaz, α -glukozidaz, esteraz ve esteraz lipaz, asid fosfotaz maksimum α -glukozidaz enzimlerinin maksimum oranda üretildiği saptanmıştır.ün izolatlarımıza uyguladığımız selülaz aktivitesi testleri sonucunda ise, Gc02, Gc21 Ö10, K43 örneklerinde selülaz pozitif aktivite olduğu gözlenmiştir.

Enzim özellikleri ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Çünkü termofilik enzimlerden günümüzde pek çok alanda yararlanılmaktadır.

Welch ve Williams 1995'te yaptıkları bir çalışmada İzlanda dan izole ettikleri *Thermus* türünden iki yeni termostabil restriksiyon endonükleaz enzim olan, Tsp4C I (ACN/GT) ve Tsp8E I enzimlerini üretmişler ve bu enzimlerin mezofilik Bgl I enziminin izoşizomeri olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada ise, *Thermus* sp. den 70°C’de 20 saat aktivite gösterebilen, termostabil β -galaktozidaz enziminin saflaştırılıp karakterizasyonunun yapıldığı bildirilmiştir (Ohtsu ve ark., 1998). Yapılmış bir başka çalışmada da nişasta endüstrisinde çok yoğun olarak kullanılan α -amilaz’ı termofilik *Bacillus* türlerinden pH 5-6 da 55°C’de inkübasyon ile maksimum miktarda üretildiği bildirilmiştir (Mamo ve Gessesse., 1999).

Alkalifilik *Bacillus* izolatının kullanıldığı bir çalışmada da, nişasta endüstrisinde çok önemli yeri olan 55-60°C’de katalitik aktivite gösterebilen yeni bir α -amilaz izole edildiği bildirilmiştir (Hagihara ve ark., 2001).

Bizim izolatlarımızın da sahip oldukları enzim içerikleri nedeni ile oldukça zengin oldukları saptanmıştır. Bu sonuçlar daha sonra yapılacak olan enzim elde edilmesi ve biyoteknolojide kullanılması çalışmalarına öncülük etmesi açısından önemli bir başlangıç olacaktır.

Sonuç olarak, izole edilen elliyedi adet Gr(+) ve altı adet Gr(-) bakteriye biyokimyasal ve moleküler testler uygulanmış sıcaqsu kaynaklarının mikrobiyel florası özellikleri ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Sekiz farklı sıcak su kaynağından izole edilen Gr(+) izolatlarımızın tamamının *Geobacillus* cinsine, iki farklı kaynaktan izole edilen Gr(-) izolatlarımızın ise *Thermus* ve *Meiothermus* cinslerine ait türler olduğunu söylememiz mümkün olmuştur. DNA dizi analizleri tamamlanan 101 ve 331 numaralı izolatlarımız ise NCBI’de yaptığımız değerlendirmeler sonucunda *Meiothermus taiwanensis* ve *Thermus thermophilus* türlerine yakın moleküler yapıya sahip olarak bulunmuş ancak, tür tayinin yapılmış hiçbir bakteri ile tamamıyla benzerlik göstermediği tespit edilmiştir.

Çalışmalarımız DNA dizi analizlerinin yeni primerler ile desteklenmesi ve izole edilen termofilik yapıya sahip enzimlerin izolasyonu üzerine yapılacak olan yeni çalışmalar ile sürdürülecek, mikrobiyal açıdan eldeymemiş zenginliklerimiz olan bu alanların içerdiği keşfedilmemiş mikrobiyal hayat bilim dünyasına tanıtılmaya devam edilecektir.

KAYNAKLAR

- ALFREDSSON, G.A. ve KRISTJONSSON J.K., *Ecology, distribution, and isolation of Thermus Thermus Species*, (Ed: Sharp,R., ve.Williams, R.A.D.) Plenum Press, New York, 43-66 (1995).
- BAKER. G.C., GAFFER. S., COWAN. A.D. ve SUHARTO. A.R., *Bacterial Community Analysis of Indonesian Hot Springs*, Fems Microbiology Letters, **200**, 103-109 (2001).
- BAROSS, J.A. ve DEMING J., *Growth at high temperatures: isolations and taxonomy, physiology, and ecology*.The microbiology of deep-sea hydrothermal vents. (Ed: Karl, D.M.) CRC Pres, London, 169-208 (1995).
- BEFFA, T., BLANC, M., LYON,P. F., VOGT, G., MARCHAIANI,M., FISCHER, J.L., ve ARAGNO, M., *Isolation of Thermus Suşs from Hot Composts (60 to 80°C)*, Applied and Environmental Microbiology, **62**, 1723-1727 (1996).
- BELDÜZ. A.O., DÜLGER. S., DEMİRBAĞ. Z., *Anoxibacillus gonensis sp. nov., thermophilic, xylose-utilising, endospore-forming bacterium*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **53**, 1315-1320 (2003).
- BOOMER, S.M., LODGE, D.P., DUTTON, B.E. ve PIERSON, B., *Molecular Characterization of Novel Red Green Nonsulfur Bacteria from Five Distinct Hot Spring Communities in Yellowstone National Park*, Applied and Environmental Microbiology, **68**. 346-335 (2002).
- BROCK, T.D., *Thermophilles*, (Ed: Brock T.D.) A Willey-Interscience Publication, New York, 1-336 (1986).
- CAO, W., LU. J., WELCH, S., WILIAMS, R.A.D. ve BRANY, F., *Cloning and thermostability of TaqI endonuclease isoschizomers from Thermus species SM32 and Thermus filliformis Tok6A1*, Biochem. J., **333**, 425-431 (1998).
- CHEN, C., LIN, L, PENG, Q., BEN, K. ve ZHOU, Z., *Meiothermus rosaceus sp. nov., isolated from tenghong hot sprint in Yunan, Chin*, FEMS Microbiology Letters, **216**, 263-268 (2002).

- CHEN, M.Y., LIN, G. H., LIN, Y. T. ve TSAY, S. S., *Meiothermus Taiwanensis sp. nov., a novel filamentous, thermophilic species isolated in Taiwan*, IJSEM., **52**, 1647-1654 (2002).
- CHUNG, A.P., RAINEY, F., NOBRE, M. F., BURGHART, J. ve DA COSTA, M.S., *Meiothermus cerbereus sp. nov., new slightly thermophilic species with high level of 3-hydroxy fatt acids*, IJSB., **47**, 1225-1230 (1997).
- CHUNG, A.P., RAINEY, F., VALENT, M., NOBRE, M. F. ve DA COSTA, M.S., *Thermus igniterrae sp. nov. and Thermus antranikianii sp. nov.i two new species from Iceland*. IJSEM., **50**, 209-217. (2000).
- COLACINO, F. ve CRICHTON R.R., *Enzyme thermostabilization: the state of the art*. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, **14**, 211-271 (1997).
- COWAN, A. ve SUHARTO, R., *Bacterial community analysis of Indonesian hot springs*, FEMS Microbiology Letters, **200**, 103-109 (2001).
- 145-150 (1993).
- DA COSTA, M. S., NOBRE, M.F. ve RAINEY, F., *Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*, Bergeys Manuel of Systematic Bacteriology. (Ed: Bone D.R., Castenholz R.W.) Pres Second Edition, **1**. 395-420 (2001).
- DABROWSKI, S., OLSZEWSKI, M., PIATEK, R. ve KUR, J., *Novel thermostable ssDNA-binding proteins from Thermus thermophilus and T. aquaticus-expression and purification*, Protein Expression and Purification, **26**, 131-138 (2002).
- EDVARDS, C., *Thermophilles*, Microbiology of Extreme Environments (Ed: Edwards C.), Open University Press, England, **1**, 1-33 (1990).
- ERTAN, H. ve ARDA, N., *DNA Analizi Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler* (Ed: Temizkan G., Arda N.) Nobel Tıp Kitap Evi. İstanbul. Türkiye, 115-202 (1999).
- FERREIRA, A. M., WAIT, R., NOBRE, M. F. ve DA COSTA M. S. *Charecterization of Glycolipids from Meiothernus spp.* Microbiology., **145**, 1191-1199 (1999).

FRIDJONSON, O. ve MATTES, R., *Production and recombinant α -galactosidases in *Thermus thermophilus**. AEM., **67**, 4192-4198. (2001).

GEORGANTA, G. SIMITH, K. E. ve WILLIAMS, R. A. D., *DNA:DNA Homology and cellular components of *Thermus filiformis* and other suşs of *Thermus* from New Zeland hot springs*, FEMS Microbiology Letters, **107**, 145-150 (1993).

GILLES, R., BERNARD,O., MARIEOLAURE, F., BHARAT K. C., KATHY, A. T., MICHEL, M. ve JEANLOUIS, G., *Alanine production from glucose fermentation by hyperthermophilic members of the domains Bacteria and Archaea: a remnant of an ancestral metabolism*, Applied and Environmental Microbiology, **62**, 2657-2659 (1996).

GUPTA, R.S., *Protei Phlogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, **62.**, 1435-1491 (1998).

HAGIHARA, H., IGARASHI, K., HAYASHI, Y., ENDO, K., IKARAWA-KIYATAMA, K., OZAKI, K., KAWAI, S. ve ITO, S., *Novel α -amilase that is highly resistant to chelating reagent and chemical oxidatio from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38*. AEM., **67**, 1744-1750. (2001).

HALIK, K.A., *Preservation of some extremely thermophillic chemolithoautrophic bacteria by deep-freezing and liquid-drying methods*, Journal of Microbiological Methods, **35**, 177-182 (1999).

HOLTOM, G.J., SHAP,. R.J. ve WILLIAMS,. R.A.D., *Sodium-simulated transport of glutamate by *Thermus thermophilus* suş B*. Journal of General Microbiology., **139**, 2245-2250 (1993).

HUBER, R., KRISTJONSON, K. ve STETER, K.O., *Ptyobaculum gen. Nov.,a new genus of neutrophilic, rod shaped archaeobacteria from continental solfatars growing optimally at 100°C* , Arch Microbiol, **149**, 95-101 (1987).

HUBER R, ve STETER K.O., *The Order Thermoprotales*. Prokaryotes. Prokaryotes (Ed: Balows A., Türüper H.G., Dworskin M., Harder W., Schleifer K.H.), Springer-Verlag New York., 677-683 (1992).

HUGENHOLTZ, P., PITULLE, C., HERSBERGER, K. ve PACE, N.R., *Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone Hot Spring*. Journal of Bacteriology, **180**, 366-376 (1998).

ILLER BANKASI., *Kaplıcaya Sahip Balediyeler Birliđi* (2001).

JACKMAN, P.J.H., *Classification of Corynebacterium species from axillary skin by numerical analysis of electrophoretic protein patterns*. Journal of Medical Microbiology, **15**, 485-492. (1982).

KAMASAKA, H., SUGIMOTO, K., NISHIMURA, T. ve KURUKI, T., *Bacillus stearothermophilus neopullulanase selective hydrolysis of amylose to maltose in the presence of amylopectin*. AEM., **68**, 1658-1664 (2002).

KASHEFI, K., HOLMES, D.E., REYSENBACH, A.L.,ve LOVLEY, D.R., *Use of Fe(III) as an electron acceptor to recover previously uncultured hyperthermophilers: isolation and characterization of Geothermobacterium ferrireducens gen.nov.,sp.nov*. Applied and Environmental Microbiology, **66**, 1735-1742 (2002).

KASHEFI, K. ve LOVLEY, D.R., *Reduction of Fe(III), Mn (IV), and Toxic Metals at 100⁰ C by Pyrobaculum islandicum*. Applied and Environmental Microbiology, **66**, 1050-1056 (2000).

KRISTJONSSON J. K. ve STETER K.O., *Thermophilic Bacteria* Thermophilic Bacteria (Ed:Kristjonsson J.K) CRC Pres, Inc. London, 1-13 (1991).

MAMO, G., GESSESSE, A., *Effect of cultivation conditions on growth and α -amilase production by a thermophilic Bacillus sp*. Lwtters in Applied Microbiology, **29**. 61-65. (1999).

MADIGAN, M.T., MARTINCO, J.M. ve PARKER, J., *Prokaryotic diversity the Archaea*. Brock Biology of Microorganisms, (Ed: Corey, P.F.) 546-571 (2000).

MARTINS, L.O., HUBER, R., HUBER, H., STETTER, K.O., DA COSTA, M.S. ve SANTOS, H., *Organic Solutes in Hyperthermophilic Archaea*. Applied Environmental Microbiology, **63**, 896-902 (1997).

MARTENSSON, V.T., KRISTJANSSON, J.K., MARIA, H.K., EMUNDSSON, D. K. S., HANNINGTON, M., PETURSDOTTIR, S. K., GEPTNER, A., ve STOFFERS, P., *Discovery and Description of Giant Submarina Smectite Cones on the Seafloor in Eyjafjordur, Northern Iceland, and a Novel Thermal Microbial Habitat*. Applied and Environmental Microbiology, **67**, 827-833 (2001).

MARTENSSON, V.T., BIRRIEN, J.L., RAGUENES, G., DA COSTA, M. ve PRIEUR, D., *Isolation and characterization of Thermus thermophilus Gt1211 from deep-sea hydrothermal vent*. Extremophiles, **3**, 247-251 (1999).

MARTENSSON, V.T., HAUGSDOTTIR, S., HOBEL, C.F.V., KRISTMANNDOTTIR, H., HREGGVISSON, G.O. ve KRISTJANSSON, J., *Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland*. AEM., **67**, 4242-4248 (2001).

MARKOSIAN, S., BECKER, P., MARKL, H. ve ANTRANIKIAN, G., *Isolation and characterization of lipid-degrading Bacillus thermoleoverans IHI-91 from an Icelandic hot spring*, Extremophiles, **4**, 365-371 (2000).

MCINERNEY, J.O., WILKINSON, M.W., PATCHINS, J.W., EMBLEY, T.M. ve POWEL R., *Recovery and Phylogenetic Analysis of Novel Archaeal rRNA Sequences from a Deep-Sea Deposit Feeder*. Applied Environmental Microbiology. **61**, 1645-1648. (1995).

NAZINA, T.N., TOUROVA, T.P., POLTARAUS, A.B., NOVIKOVA, E.V., GRIGORYAN, A.A., IVANOVA, A.E., LYSENKO, A.M., PETRUNKAYA, V.V., OPISOV, G.A., BELYAEV, S.S. ve IVANOV M.V., *Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: description of Geobacillus subterraneus gen. Nov., sp. nov. and G. Uzenensis sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of Bacillus stearothermophilus, B. thermocatenulatus, B. thermoleoverans, B. kaustophilus, B.*

thermoglukosidasius and *B. thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovarans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglukosidasius* and *G. Thermodenitrificans*. IJSEM., **51**, 433-446. (2001).

OHSTSU, N., MATOSHIMA, H., GOTO, K., TSUKASAKI, F. ve MATSUZAWA, H., *Thermostabile β -Galaktosidase from an Extreme Thermostable, Thermus ps. A4 Enzyme Prufication and Charecterization, and Gene Clonning and Squencing*. Biosci. Biotechnol. Biockem., **62**(8), 1539-1545 (1998).

OLGUN, A. ve TOPAL, A., *DNA Analizi*. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler (Ed: Temizkan G., Arda N.) Nobel Tıp Kitap Evi. İstanbul. Türkiye, 33-56 (1999).

OLLIVER, G. R., FARDEAU, M. L., PATEL, B. K. C., ANDREWS, K. T., MAGOT, M. ve GARCIAJ, L., *L-Alanine production from glucose fermantation by hyperthermophilic members of the domains Bacteria and Archaea: a remmant of an ancestral metabolism*. AEM., **62**, 2657-2659 (1996).

OWEN R.J. ve LAPAGE. S.P., *The thermal denaturation of partly purified bacterial deoxyribonucleic acidand its tacsonomic application* Journal of Applied Bacteriology, **41**,335-340 (1976).

PERRY J.J., *The Genus Thermoleophilum*, Prokartotes, (Ed: Balows A., Türüper H.G., Dworskin M., Harder W., Schleifer K.H.) Springer-Verlag, New York, 3780-3784 (1992).

PIRES, A. L., ALBUQUEQUE, L., TIAGO, I., NOBRE, M.F., EMPADINHAS, N., VERSSIMIO, A. ve DA COSTA, M. S., *Meiothermus timidus sp. nov., a new slightly thermophilic yellow-pigmented species*. FEMS Microbiology Letters, **245**, 39-45.(2005).

PLUMP, J.J., BELL, J., ve STUCKEY. D.C., *Microbial Populations Associated with Treatment of an Industrial Dye Effluent in an Anaerobic Baffled Reactor*, Applied and Environmental Microbiology, **67**,3226-3235 (2001).

- RAWEN, N.D.H., *Genetica of Thermus Thermus Species*, (Ed: Sharp R., Williams R.), Plenum Press, New York., 157-184 (1995).
- REYSENBACH, A. L., LONGNECKER, K. ve KIRSHTEN, J., *Novel bacteria and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent*, Applied Environmental Microbiology, **66**, 3798-3806. (2000).
- REYSENBACH, A. L., GÖTZ, D. ve YERNOOL, D., *Biodiversity of Microbial Life*, (Ed: Stanley, J.T., ve Reysenbach.A.L.), John Willy&Sons, Handbuch/Nachschlagewerk, 345-421. (2002).
- SAKO, Y., NAKAGAVA. S., TAKAI. K. ve HORIKOSI. K., *Marinithermus hydrothermalis gen nov., sp. nov., a strictly aerobic thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney*. IJSEM., **53**, 59-65.(2003).
- SEGERER, A. H. ve STETER K. O., *The Order Sulfolobales*, Prokaryotes, (Ed: Balows A., Türüper H.G., Dworskin M., Harder W., Schleifer K.H.) Springer-Verlag, New York., 685-701 (1994)/a
- SEGERER, A. H. ve STETER K. O., *The Genus Thermoplasma*, Prokaryotes, (Ed: Balows A., Trper H.G., Dworskin M., Harder W., Schleifer K.H.) Springer-Verlag New York 713-717 (1994)/b
- SHARP, R. J., RILEY, P.W. ve WHITE, D., *Heterotrophic Thermophilic Bacilli*, (Ed: Kristjansson, J.K), CRC Press, London, **2**, 19-50 (1991).
- SHARP, R., ve WILLIAMS. R.A.D., *Properties of Thermus Strains Isolated from Icelandic Hot Springs and DNA:DNA Homology of Thermus ruber and Thermus aquaticus*. AEM, **54**, 2049-2053 (1988).
- SKIRNISDOTTIR, S., HEREGGVIHDDON, G.O., HOLTS, O. ve KRISTJANSSON, J.K., *Isolation and characterization of a mixotrophic sulfur-oxidizing Thermus scodoductus*, Extremofiles, **5**, 45-51. (2001).
- SNEATH, P.H.A., *Endospore-forming gram positive rods and cocci*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (Ed: Noel, R.K.) 1104-1135 (1984).
- SONNLEITHNER, B., *Biotechnology of thermophilic bacteria- growth, products, and application*, Microbial activities, (Ed: Fischer, A.)

Biochemical engineering/ biotechnology, Springer-Verlag, USA., 70-129 (1983).

SU KIM, J., KOH, S., SHIN, H., LEE, D. ve LEE, S.Y., *Biochemical charecterization of UDP-sugar pyrophosphorylase from Thermus caldophilus GK24*, Biotechnol, Appl. Biochem, **29**, 11-17. (1999).

SUZUKI, Y., KISHIGAMI, T., INOUE, K., MIZOGUCHI, Y., ETO, N., TAGAGI, M., ve ABE, S., *Bacillus thermoglukosidasius sp. nov., a new species of obligately thermophillic Bacill.*, Syst. App. Microbiol., **4**, 487, (1983).

STETER, K.O., *The Genus Archaeoglobus*, Prokartotes, (Ed: Balows A., Trper H.G., Dworskin M., Harder W., Schleifer K.H.) Springer-Verlag New York, 707-711 (1994).

TACHIBANA, Y., KURAMURA, A., SHIRASAKA, N., SUZUKI, Y., YAMAMOTO, T., FUJIWAEA, S., TAKAGI, M., ve IMANAKA, T., *Purification and Characterization of an Extremely Thermostable Cyclomaltodextrin Glucanotransferase from a Newly Isolated Hyperthermophilic Archaeon, a Thermococcus sp.*, AEM, **65**, 1991-1997 (1999).

TAKAO, M., AKIYAMA, K., ve SAKAI., *Purification and charecterization of thermostable endo-1,5- α -L-arabinase from a suş of Bacillus thermodenitrificans*, AEM., **68**, 1639-1649 (2002).

TAMER, A.Ü., UÇAR, F., ÜNVER, E., KARABOZ, İ., BURSALIOĞLI. M. ve OĞULTEKİN. R., 3-4 Sınıf Laboratuvar Klavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 81-90 (1989).

TENREIRO, S., NOBRE, M.F. ve DA COSTA, M.S., *Thermus silvanus sp.nov. and T. chliarophilus sp. nov., two new species related to Thermus ruber but with lower growt theperature*, IJSB., **45**, 633-639 (1995).

WELCH, S.G., ve WILLIAMS, R.A.D., *Taq52 I, a novel and thermostable type II restriction endonuclease from the genus Thermus, recognising the pentanucleotide sequence GV(A or T)GC and cleaving DNA between the first and second bases of the recognition sequence: G \surd C(A or T)GC*, Nucleic Acid Research, **23**, 4573-4575 (1995).

WELCH, S.G., AL-AWADHI, S. ve WILLIAMS, R.A.D., *Isoschizomers of the restriction endonuclease TaqI (T/CGA) requiring different metal ion concentrations and having a range of thermal stabilities from Thermus species from different continents*, Microbiology, **144**, 167-175 (1998).

WILLIAMS, R.A.D., ve DA COSTA, M.S., *The Genus Thermus and Related Microorganisms*, Prokaryotes, (Ed:Ballows A., Türüper H.G., Dworkin M., Harder W., Shleifer K.-H.), New York: Springer-Verlag, New York, 3745-3750 (1994).

WILLIAMS, R.A.D., SIMITH, K.E., WELCH, S.G., MICALLEF, J., ve SHARP, R.J., *DNA relatednes of Thermus suşs, description of Thermus brockianus sp. nov., and proposal to reestablish Thermus thermophilus (Oshima and İmahori)*, IJSB., **45**, 495-499 (1995).

WILLIAMS, R.A.D., SIMITH, K.E., WELCH, S.G., ve MICALLEF, J., *Thermus Oshimai Sp. Nov., Isolated from Hot Spring in Portugal, Iceland, and Azores, and Comment on The Concept of A Limited Geographical Distribution of Thermus Sprcies*, IJSB., **46**, 403-408.(1996).

WOSSE, C.R., KANDLER, O. ve WHEELIS, M.L., *Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, an Eucarya*. Poc. Natl. Acad. Sci. USA., **87**, 4576-4579 (1990).

ZILLIG, W., *The Order Thermococcales*, Prokaryotes, (Ed: Balows A., Türüper H.G., Dworskin M., Harder W., Schleifer K.H.) Springer-Verlag New York., 702-706. (1994).

EKLER

EK-1, İzolat 331'e Ait DNA Dizi Analizi Sonuçlarının *Thermus* Cinsine Ait Türlerin Baz Dizileri ile Karşılaştırılması.

gcytaag

1111 222

| | | |
|--|------|---|
| T.fil | | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG | | |
| GGC | | |
| Tok20A1 | | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG | | |
| GGC | | |
| OK6A1 | | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG | | |
| GGC | | |
| RT41A | | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG | | |
| GGC | | |
| T351 | | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG | | |
| GGC | | |
| Tok8A1 | | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG | | |
| GGC | | |
| 331 | | |
| CGCTGCTGCGTGGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCGGTC | | |
| T.br | YS38 | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGGGCG | | |
| GGC | | |
| ZHGIA1 | | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGGGCG | | |
| GGC | | |
| T.scot | Vi7 | 1 |
| NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTAAGACATGCAAGTCGAGC | | |
| GGGG | | |
| NMX2A1 | | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGAGCG | | |
| GGG | | |
| T.aq | YT1 | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG | | |
| GGC | | |
| YS025 | | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG | | |
| GGCC | | |
| YS052 | | 1 |
| GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG | | |
| GGCC | | |

HSA1 1
GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG
GGC

T.th HB8 1
GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG
GGC

T.th HB27 1
GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG
GGC

T.flavus 1
GCTCAGGGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAAGACATGCAAGTCGTGCG
GGC

T.osh SPS14 1
NNCTAAGACATGCAAGTCGTGC
GGGG

HELIX 6 REGION

2222222 22222222222 1111

T.fil 51 TGCGGGG-
TTTTACTCCGTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

Tok20A1 51 CGCGGGG-
TTTTACTTCGCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

OK6A1 51 TGCGGGG-
TTTTACTTCGCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

RT41A 51 TGCGGGG-
TTTTACTTCGCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

T351 51 TGCGGGG-
TTTTACTTCGCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

Tok8A1 51
CGCGGGG-
TTTTACTTCGCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

331
CGCGGGGCTTTTACTCCGTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGG

T.br YS38 51 CATGGGG-
TTTTACTCCGTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

ZHGIA1 51 CATGGGG-
TTTTACTCCGTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

Vi7 51 CA---GG--
TTTATGCCGTGTCCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

NMX2A1 51 CA---GG--TTTATACC-
TGTTACGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

T.aq YT1 51 CGTGGGG----
TATCTCACGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

YS025 51 CGTGGGG----
TATCTCACGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG
YS052 51 CGTGGGG----
TATCTCACGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

HSA1 51 CGCGGGG-
TTTTACTCTGCGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG
T.th HB8 51 CGCGGGG-
TTTTACTCCGTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG
T.th HB27 51 CGCGGGG-
TTTTACTCCGTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG
T.flavus 51 CGCGGGG-
TTTTACTCCGTGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

SPS14 51 --TGG----TT--CGCCAC--
CCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG

HELIX8 111111--
-222222----222222----11111

T.fil 101
TGACCTACCTGGAAGAGGGGGACAACCTGGGGAAACTCGGGCTAATC
CCC
Tok20A1 101
TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACCTGGGGAAACTCGGGCTAATC
CCC
OK6A1 101
TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACCTGGGGAAACTCGGGCTAATC
CCC
RT41A 101
TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACCTGGGGAAACTCGGGCTAATC
CCC
T351 101
TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACCTGGGGAAACTCGGGCTAATC
CCC
Tok8A1 101
TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACCTGGGGAAACTCGGGCTAATC
CCC
331
TGACCTACCCTGAAGAGGGGGACAACCCGGGGAAACTCGGGCTAATC
CCC
T.br YS38 101
TGACCTACCCGGAAGTGTGGGACAACCCGGGGAAACTCGGGCTAATC
CCG

| | | |
|--|------|-----|
| ZHGIA1 | | 101 |
| TGACCTACCCGGAAGTGTGGGACAACCCGGGGAAACTCGGGCTAATC | | |
| CCG | | |
| Vi7 | | 101 |
| TGACCTACCCGGAAGAGGGCGGACAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATC | | |
| CGC | | |
| NMX2A1 | | 101 |
| TGACCTACCCGGAAGAGGGCGGACAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATC | | |
| CGC | | |
| T.aq | YT1 | 101 |
| TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACATGGGGAAACCCAGGCTAATC | | |
| CCC | | |
| YS025 | | 101 |
| TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATC | | |
| CCC | | |
| YS052 | | 101 |
| TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATC | | |
| CCC | | |
| HSA1 | | 101 |
| TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACCCGGGGAAACTCGGGCTAATC | | |
| CCC | | |
| T.th | HB8 | 101 |
| TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACCCGGGGAAACTCGGGCTAATC | | |
| CCC | | |
| T.th | HB27 | 101 |
| TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACCCGGGGAAACTCGGGCTAATC | | |
| CCC | | |
| T.flavus | | 101 |
| TGACCTACCCGGAAGAGGGGGACAACCCGGGGAAACTCGGGCTAATC | | |
| CCC | | |
| SPS14 | | 101 |
| TGACCTGCCCCGGAAGTGGGGGACAACCCGGGGAAACCCGGGCTAATC | | |
| CCC | | |

HELIX 10 POSSIBLE SPECIES PROBE REGION

11111111----11111111

| | | |
|---|--|-----|
| T.fil | | 151 |
| CATGTG GTCGTGCCCTTTGGGGT GCGATTAAAGGGTGAAGAGCCCGCT | | |
| TC | | |
| Tok20A1 | | 151 |
| CATGTGGTCGTGCCCTTTGGGGTGCGATTAAAGGGTGAAGAGCCCGCT | | |
| TC | | |

OK6A1 151
CATGTGGTCGTGCCCTTTGGGGTGCGATTAAAGGGTGAAGAGCCCGCT
TC

RT41A 151
CATGTGGTCGTGCCCTTTGGGGTGCGATTAAAGGGTGAAGAGCCCGCT
TC

T351 151
CATGTGGTCGTGCCCTTTGGGGTGCGATTAAAGGGTGAAGAGCCCGCT
TC

Tok8A1 151
CATGTGGTCGTGCCCTTTGGGGTGCGATTAAAGGGTGAAGAGCCCGCT
TC

331
CATGTGGACCCGCCCTTGGGGTGTGTCCAAAGGGCTTTGCCCGCTTC

T.br YS38 151
CATGTGGTCATGTCCTGTGGGGCATGATTAAAGGGCGAG-
AGTCCGCTTC

ZHGIA1 151
CATGTGGTCATGTCCTGTGGGGCATGATTAAAGGGCGAG-
AGTCCGCTTC

Vi7 151
CATGTGGTCCTGTCCTGTGGGGTAGGACTAAAGGGTGAATAGCCCGCT
TC

NMX2A1 151
CATGTGGTCCTGTCCTGTGGGGCAGGACTAAAGGGTGGATAGCCCGCT
TC

T.aq YT1 151 CATGTGGACACATCCTGTGGGGTGTGTTTAAAGGGTTTT-
-GCCCGCTTC

YS025 151 CATGTGGACACATCCTGTGGGGTGTGTTTAAAGGGTTTT-
GCCCGCTTC

YS052 151 CATGTGGACACATCCTGTGGGGTGTGTTTAAAGGGTTTT-
GCCCGCTTC

HSA1 151 CATGTGGACCCGCCCTTGGGGCGTGTCCAAAGGGCTTT-
-GCCCGCTTC

T.th HB8 151 CATGTGGACCCGCCCTTGGGGTGTGTCCAAAGGGCTTT-
-GCCCGCTTC

T.th HB27 151
CATGTGGACCCGCCCTTGGGGTGTGTCCAAAGGGCTTT-
GCCCGCTTC

T.flavus 151 CATGTGGACCCGCCCTTGGGGTGTGTCCAAAGGGCTTT-
GCCCGCTTC

SPS14 151 CATGTGGTCCGGCCCC-TGGGCCGTGACTAAAG-
GCCAAAAGCC-GCTTC

| | OPPOSITE | HELIX 12 | |
|-------------|----------|-----------------------------------|-----|
| | STEM 8 | 11111111111122222222-----22222222 | |
| T.fil | | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACC | |
| AA | | | |
| Tok20A1 | | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCCAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACC | |
| AA | | | |
| OK6A1 | | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCCAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACC | |
| AA | | | |
| RT41A | | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCCAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACC | |
| AA | | | |
| T351 | | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCCAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACC | |
| AA | | | |
| Tok8A | | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACC | |
| AA | | | |
| 331 | | | |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACC | |
| AA | | | |
| T.br | YS38 | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACC | |
| AA | | | |
| ZHGIA1 | | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACC | |
| AA | | | |
| Vi7 | | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACC | |
| AA | | | |
| NMX2A1 | | | 201 |
| CCCATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACC | |
| AA | | | |
| T.aq | YT1 | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGGCCACC | |
| AA | | | |
| YSO25 | | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGGCCACC | |
| AA | | | |
| YSO52 | | | 201 |
| CGGATGGGCCC | CGTCCC | ATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGGCCACC | |
| AA | | | |

HSA1 201
 CGGATGGGCCC GCGTCCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACC
 AA

T.th HB8 201
 CGGATGGGCCC GCGTCCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACC
 AA

T.th HB27 201
 CGGATGGGCCC GCGTCCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACC
 AA

T.flavus 201
 CGGATGGGCCC GCGTCCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACC
 AA

SPS14 201
 CGGATGGGCCC GCGTCCCATCAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCCACC
 AA

| | HELIX 12 | HELIX 13 | HELIX 14 |
|--|--------------|---------------------|-----------|
| | 111111111111 | 1111111-----1111111 | 1111111-- |

T.fil 251
 GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA
 CTG

Tok20A1 251
 GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA
 CTG

OK6A1 251
 GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA
 CTG

RT41A 251
 GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA
 CTG

T351 251
 GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA
 CTG

Tok8A1 251
 GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA
 CTG

331
GGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGGCCGGCCACAGGGGCA
CTG

T.br YS38 251
 GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA
 CTG

| | | |
|---|------|-----|
| ZHGIA1 | | 251 |
| GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGACGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |
| Vi7 | | 251 |
| GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |
| NMX2A1 | | 251 |
| GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |
| T.aq | YT1 | 251 |
| GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGACGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |
| YS025 | | 251 |
| GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGACGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |
| YS052 | | 251 |
| GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGACGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |
| HSA1 | | 251 |
| GGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |
| T.th | HB8* | 251 |
| GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |
| T.th | HB8 | 251 |
| GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |
| T.th | HB27 | 251 |
| GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |
| T.flavus | | 251 |
| GGCGACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |
| SPS14 | | 251 |
| GGCAACGACGGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGCCGGCCACAGGGGCA | | |
| CTG | | |

HELIX 15

atgccytccgtcgtc5'

| | | |
|--------------|------------------|----------|
| HELIX 14 | 357R primer | HELIX 16 |
| -----1111111 | atgcctccgtcgtc5' | 1111--- |

11111-----11111

T.fil 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

Tok20A1 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

OK6A1 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGAAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

RT41A 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

T351 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

Tok8A1 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

331
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

T.br YS38 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

ZHGIA1 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

Vi7 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

NMX2A1 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

T.aq YT1 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

YS025 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

YS052 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

HSA1 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

T.th HB8 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

T.th HB27 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

T.flavus 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

SPS14 301
AGACACGGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTCCGC
AA

HELIX 16 HELIX 17
--222----222---1111 1111-----2222----2
|-----V3-

T.fil 351
TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

Tok20A1 351
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

OK6A1 351
TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

RT41A 351
TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

T351 351
TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

Tok8A1 351
TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

331
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAAGAAGCCCTT
CGG

T.br YS38 351
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

ZHGIA1 351
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

ZFIA2 351
TGGACGGAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

Vi7 351
TGGACGGAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

NMX2A1 351
TGGACGGAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

T.aq YT1 351
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

YS025 351
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

YS052 351
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAGGAAGCCCTT
CGG

HSA1 351
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAAGAAGCCCTT
CGG

T.th HB8 351
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAAGAAGCCCTT
CGG

T.th HB27 351
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAAGAAGCCCTT
CGG

T.flavus 351
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGGAGGAAGAAGCCCTT
CGG

SPS14 351
TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCTTGC GGGACGAAGCCCTT
CGG

—

HELIX 17 HELIX 18
222-----1111 1111-----2222-----2222-----
-----| |-----V4-----

T.fil 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCAGGACGAAATCCCTGATGAGGGGGATGA
CGG

Tok20A1 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCAGGACGAAATCCCTGATGAGGGGGATGA
CGG

OK6A1 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCAGGACGAAATCCCTGATGAGGGGGATGA
CGG

RT41A 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCAGGACGAAATCCCTGATGAGGGGGATGA
CGG

T351 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCAGGACGAAATCCCTGATGAGGGGGATGA
CGG

Tok8A1 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCAGGACGAAATCCCTGATGAGGGGGATGA
CGG

331
GGTGTAAACTCCTGAACCCGGGACGAAACCCCGACGAGGGGGACTGA
CGG

T.br YS38 401
GGTGTAAACTCCTGAACTGGGGACGAAAGCCCCGATGAGGGGGATGA
CGG

ZHGIA1 401
GGTGTAAACTCCTGAACTGGGGACGAAAGCCCCGATGAGGGGGATGA
CGG

ZFIA2 401
GGTGTAAACTCCTGAACTGGGGACGAAAGCCCTGATGAGGGGGATGA
CGG

Vi7 401
GGTGTAAACTCCTGAACWGGGGACGAAAGCCCCGTATAGGGGGATGA
CGG

NMX2A1 401
GGTGTAAACTCCTGAACTGGGGACGAAAGCCCCGTGTAGGGGGATGA
CGG

T.aq YT1 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCGGGACGAAACCCCGATGAGGGGGACTGA
CGG

YS025 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCGGGACGAAACCCCGATGAGGGGGACTGA
CGG

YS052 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCGGGACGAAACCCCGATGAGGGGGACTGA
CGG

HSA1 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCGGGACGAAACCCCGATGAGGGGACTGA
CGG

T.th HB8 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCGGGACGAAACCCCGACGAGGGGACTGA
CGG

T.th HB27 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCGGGACGAAACCCCGAGGAGGGGACTGA
CGG

T.flavus 401
GGTGTAAACTCCTGAACCCGGGACGAAACCCCGAGGAGGGGACTGA
CGG

SPS14 401
GGTGTA AACCGCTGAACCTGGGACGAAAACCCCAAGGGGACTGA
CGG

HELIX 18

--11111

gtcgtcggegccattatg5' 530rev

5'gcagccgcgtaatacgg 530f

cggtcgtcggegccatta5' 534rev

5'gccagcagcccggttaa3' 517f

T.fil 451
TACTGGGGTAATAGCGCCGGCCAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
AC

Tok20A1 451
TACTGGGGTAATAGCGCCGGCCAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
AC

OK6A1 451
TACTGGGGTAATAGCGCCGGCCAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
AC

RT41A 451
TACTGGGGTAATAGCGCCGGCCAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
AC

T351 451
TACTGGGGTAATAGCGCCGGCCAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
AC

Tok8A1 451
TACTGGGGTAATAGCGCCGGCCAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
AC

331
TACCGGGGTAATAGCGCCGGCCAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
AC

T.fil 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

Tok20A1 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

OK6A1 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

RT41A 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

T351 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

Tok8A1 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

331
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTC ACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

T.br YS38 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

ZHGIA1 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

ZFIA2 501
GGAGGGTGCAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

Vi7 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

NMX2A1 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

T.aq YT1 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

YS025 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

YS052 501
GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
GGC

HSA1 501
 GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTCACCTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
 GGC

T.th HB8 501
 GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTCACCTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
 GGC

T.th HB27 501
 GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTCACCTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
 GGC

T.flavus 501
 GGAGGGCGCGAGCGTTACCCGGATTCACCTGGGCGTAAAGGGCGTGTA
 GGC

SPS14 501
 NNN
 NNNNN

—
 HELIX

22222222-----111111-----111111----2222

—
 T.fil 551
 GGCCTGGTGCCTCTGGCGTTAAAGACCGCGGCTCAACCGCGGGGGTGC
 GC

Tok20A1 551
 GGCCTGGTGCCTCTGGCGTTAAAGACCGCGGCTCAACCGCGGGGGTGC
 GC

OK6A1 551
 GGCCTGGTGCCTCTGGCGTTAAAGACCGCGGCTCAACCGCGGGGGTGC
 GC

RT41A 551
 GGCCTGGTGCCTCTGGCGTTAAAGACCGCGGCTCAACCGCGGGGGTGC
 GC

T351 551
 GGCCTGGTGCCTCTGGCGTTAAAGACCGCGGCTCAACCGCGGGGGTGC
 GC

Tok8A1 551
 GGCCTGGTGCCTCTGGCGTTAAAGACCGCGGCTCAACCGCGGGGGTGC
 GC

331
 GGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGGGAG
 CGT

T.br YS38 551
 GGCTTGGGGCGTCCCATGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGGGAG
 CGT

ZHGIA1 551
GGCTTGGGGCGTCCCATGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGGGAG
CGT

ZFIA2 551
GGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGGGAG
CGT

Vi7 551
GGCTTGGGGCGTCCCATGTGAAAGGCCACGGCTCAACCGTGGAGGAG
CGT

NMX2A1 551
GGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGGCCACGGCTCAACCGTGGAGGAG
CGT

T.aq YT1 551
GGCTTGGGGCGTCCCATGTGAAAGGCCACGGCTCAACCGTGGAGGAG
CGT

YS025 551
GGCTTGGGGCGTCCCATGTGAAAGGCCACGGCTCAACCGTGGAGGAG
CGT

YS052 551
GGCTTGGGGCGTCCCATGTGAAAGGCCACGGCTCAACCGTGGAGGAG
CGT

HSA1 551
GGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGGGAG
CGT

T.th HB8 551
GGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGGGAG
CGT

T.th HB27 551
GGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGGGAG
CGT

T.flavus 551
GGCCTGGGGCGTCCCATGTGAAAGACCACGGCTCAACCGTGGGGGAG
CGT

SPS14 551
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCACGGCTCAACCGTGGAAACC
GCGC

HELIX 22

HELIX 23

22222

T.fil 601
TGGATACGGCCGGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGGGAATTCCCGG
AGT

Tok20A1 601
 TGGATACGGCCGGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 OK6A1 601
 TGGATACGGCCGGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 RT41A 601
 TGGATACGGCCGGGCTAGACGGTGGGAGAGrGTGGTGGGAATTCCCGGA
 GT
 T351 601
 TGGATACGGCCGGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 Tok8A1 601
 TGGATACGGCTGGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 331
 GGGATACGGAGGAACGCCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCACCC
 GT
 T.br YS38 601
 GGGATACGCTCAGGCTAGACGGCGGGAGGGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 ZHGIA1 601
 GGGATACGCTCAGGCTAGACGGCGGGAGGGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 ZFIA2 601
 GGGATACGCTCAGGCTAGACGGCGGGAGGGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 Vi7 601
 GGGATACGCTCAGGCTAGAGGGTGGGAGAGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 NMX2A1 601
 GGGATACGCTCAGGCTAGAGGGTGGGAGAGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 T.aq YT1 601
 GGGATACGCTCAGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 YS025 601
 GGGATACGCTCAGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 YS052 601
 GGGATACGCTCAGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT
 HSA1 601
 GGGATACGCTCAGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGGGAATTCCCGG
 AGT

T.th HB8 601
GGGATACGCTCAGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGAATTCCCGG
AGT

T.th HB27 601
GGGATACGCTCAGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGAATTCCCGG
AGT

T.flavus 601
GGGATACGCTCAGGCTAGACGGTGGGAGAGGGTGGTGAATTCCCGG
AGT

SPS14 601
CGNATACGCCCGGGCTAGACGGCGGGAGAGGGTGGTGAATTCCCGG
AGT

HELIX 23

BULGE 24

T.fil 651
AGCGGTGAAATGCGCAGATACCGGGAGGAACGCCGATGGCGAAGGCA
GCC

Tok20A1 651
AGCGGTGAAATGCGCAGATACCGGGAGGAACGCCGATGGCGAAGGCA
GCC

OK6A1 651
AGCGGTGAAATGCGCAGATACCGGGAGGAACGCCGATGGCGAAGGCA
GCC

RT41A 651
AGCGGTGAAATGCGCAGATACCGGGAGGAACGCCGATGGCGAAGGCA
GCC

T351 651
AGCGGTGAAATGCGCAGATACCGGGAGGAACGCCGATGGCGAAGGCA
GCC

Tok8A1 651
AGCGGTGAAATGCGCAGATACCGGGAGGAACGCCGATGGCGAAGGCA
GCC

331

GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAGCTCAGGCTAGACGGTGG
GAG

AGGGTGGTGAATTCCCGGAGTAGCGGTGAAATGCGCAGATACCCAC
CGGATTAGATACCGGGTAGTNACGCCCTAACGATGCGCGCTAGGTCC
TGGGTCTCTGGGGGCGAGCTACGCGTTAGCGCGCCGCCTGGGAGACGG
GCGCAGGCTGAACTCAAGGAATGACGGGGGCCCGCCAGCGGTGACATT
GGTATTCGAGCAGCGAGACGTACAGCNGACTCANGAACGGGTAGCTG
GGTCCCAGGACCCACAGGGTCGATGCCCTTACCTTGCGAGGGTG

