

**BAZI HALOFİLİK VE HALOTOLERANT
MİKROORGANİZMALARIN, FENANTREN, PİREN VE
NAFTALEN PARÇALAYABİLME YETENEKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ
Sevim Feyza ERDOĞMUŞ
DANIŞMAN
Prof. Dr. Muhsin KONUK
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Ocak, 2012

Bu tez çalışması 10.FENED.11 numaralı proje ile BAP tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BAZI HALOFİLİK VE HALOTOLERANT MİKROORGANİZMALARIN,
FENANTREN, PİREN VE NAFTALEN PARÇALAYABİLME
YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sevim Feyza ERDOĞMUŞ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Muhsin KONUK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ocak, 2012

TEZ ONAY SAYFASI

Sevim Feyza ERDOĞMUŞ tarafından hazırlanan “Bazı halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların fenantren, piren ve naftalen parçalayabilme yeteneklerinin araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğini ilgili maddeleri uyarınca 06/01/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji **Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Muhsin KONUK
İkinci Danışmanı :

Başkan : Prof. Dr. Kıymet GÜVEN
Anadolu Ü. Fen Fakültesi,
Üye : Prof. Dr. Muhsin KONUK
Afyon Kocatepe Ü. Fen Edebiyat Fakültesi,
Üye : Prof. Dr. Cevdet UGUZ
Afyon Kocatepe Ü. Veteriner Fakültesi,
Üye : Doç. Dr. Elif KORCAN
Afyon Kocatepe Ü. Fen Edebiyat Fakültesi,
Üye : Doç. Dr. İ. Hakkı CİĞERCİ
Afyon Kocatepe Ü. Fen Edebiyat Fakültesi,

(Handwritten signatures of the jury members)

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Enstitü Müdürü
(Prof. Dr. Mevlüt DOĞAN)

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI HALOFİLİK VE HALOTOLERANT MİKROORGANİZMALARIN, FENANTREN, PİREN VE NAFTALEN PARÇALAYABİLME YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevim Feyza ERDOĞMUŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhsin KONUK

Bu araştırmada, 17 adet halofilik ve halotolerant izolatın PAH'ları (*p*-hidroksibenzoik asit, naftalen, fenantren ve piren) parçalayabilme yetenekleri ve izolatların PAH'ları parçalama sürecinde kullandıkları metabolik yolun belirlenmesi amaçlanmıştır.

İzolatların morfolojik ve kültürel özellikleri belirlenmiştir. Farklı PAH konsantrasyonlarında izolatların üreme durumları saptanmıştır. PAH'ların parçalanmasında intradiol halka parçalama yolundaki (*orto* yol) katekol 1,2-dioksijenaz ve/veya protokatekuat 3,4-dioksijenaz enzimlerini kullandıkları spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir. İzolatların dioksijenaz enzimlerini kodlayan gen bölgelerini belirleyebilmek için PCR amplifikasyonları yapılmıştır. Amplifikasyon ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Katekol 1,2 dioksijenaz ve protokatekuat 3,4 dioksijenaz enzimlerini kodlayan muhtemel gen bölgeleri saptanmıştır. Bu gen bölgelerinin nükleotid sekans analizleri belirlenmiştir.

Sonuç olarak; C-24, C-27, C-37, C-41, C-43, C-46, C-50, C-51, C-52, CH izolatlarının çalışmada kullanılan PAH'ları parçalayabildikleri ve yüksek tuzluluk koşullarına sahip ortamlarda PAH'ların biyoremediasyonu için potansiyel olarak kullanılabilceği tespit edilmiştir.

2012, xv + 190 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyolojik parçalanma, Halofilik mikroorganizma, PAH'lar

ABSTRACT

PhD Thesis

THE INVESTIGATION ON SOME HALOPHILIC AND HALOTOLERANT MICROORGANISMS' DEGRADATION ABILITY OF PHENANTHRENE, PYRENE, AND NAPHTHALENE

Sevim Feyza ERDOĞMUŞ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Muhsin KONUK

In this research, we aimed to determine PAHs (*p*-hydroxybenzoic acide, naphthalene, phenanthrene and pyrene) degradation ability of 17 halophilic and halotolerant isolates and the methabolic pathway used by the isolates during the degradation.

Morphological and cultural features, and growing conditions of these isolates were determined. The PAH degradation ways used by the isolates were also identified by using spechtrophotometric method. It was observed that the isolates use catechol 1,2 dioxygenase and/or protocatechuate 3,4 dioxygenase in intradiol ring cleavage. PCR amplification was carried to define the gene zones which codify dioxygenases of these isolates. The amplified products were also analysed on 1% (w/v) agarose gels, and possible gene zones of catechol 1,2 dioxygenase and protocatechuate 3,4 dioxygenase were determined. Nucleotide sequence analysis of these gene regions were performed.

Consequently, it was found that C-24, C-27, C-37, C-41, C-43, C-46, C-50, C-51, C-52, CH isolates could degrade the PAHs tested and these isolates could be used in bioremediation of the environments contaminated with PAH containing high salinity.

2012, xv + 190 sayfa

Key Words: Biodegradation, Halophilic microorganisms, PAHs

TEŞEKKÜR

Doktora tez konusu kapsamında çalışma imkânı sunan, çalışmalarım aŐamasında önerileri ile beni yönlendirip destek olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Muhsin KONUK'a teşekkür ederim.

Araştırma sürecinde kullanılan halofilik ve halotolerant izolatların teminini sağlayan ve çalıŐmalarımın her aŐamasında düşünce ve önerilerinden yararlandığım hocam sayın Prof. Dr. Kıymet GÜVEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma konusunun seçiminde bana önderlik eden ve araŐtırmalarımın başlangıcından bitimine kadar, tecrübe ve bilgi birikimiyle her türlü yardım ve desteğini benden esirgemeyen, olaylara her zaman farklı açılarla bakarak bana yardımcı olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Elif KORCAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimimin ilk yıllarında bana danışmanlık yapan Doktora tezime başlamamda büyük katkıları olan değerli hocam sayın Doç. Dr. Gülgün TINAZ'a teşekkür ederim.

Doktora tez çalıŐmalarımda ve diğer çalıŐmalarımda bütün bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak katkıda bulunan kıymetli hocam, sayın Doç. Dr. İ. Hakkı CİĞERCİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

İzolatların temini ve identifikasyonu konusunda yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Burçin MUTLU'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında her türlü sıkıntıma ortak olan, manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yardıma hazır olan arkadaşlarım Arş. Grv. Dr. Arzu ÖZKARA, Arş. Grv. Dr. Dilek AKYIL ve Arş. Grv. Dr. Yasin EREN'e teşekkürlerimi sunarım.

Labaratuvar çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Gökçe BULUT, Onur AKSOY, Bilgi AKSOY, Dilay YUMUK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasını 10.FENED.11 no'lu proje ile maddi olarak destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Bana her konuda destek olan, fedakârlıklarımı esirgemeyen ve verdikleri eğitimle bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme teşekkür ederim.

Bugüne kadar beni her konuda destekleyip, bana güvenerek her zaman yanımda olan çok sevgili ve değerli eşim, Ender ERDOĞMUŞ'a ve hayatıma neşe katan kızım Cemre ERDOĞMUŞ'a bu tez çalışması sırasındaki her türlü destek ve yardımlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevim Feyza ERDOĞMUŞ

AFYONKARAHİSAR, 2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH'lar)	3
2.2 PAH'ların Oluşumu ve Kaynakları	5
2.3 PAH'ların Sağlık Üzerine Olan Etkileri	6
2.4 PAH Bileşiklerinin Hava, Su ve Topraktaki Döngüsü	8
2.5 PAH'ların Mikrobiyal Parçalanması	9
2.5.1 Hidrokarbonların Halofilik <i>Bacteria</i> ve <i>Archaea</i> Üyeleri Tarafından Degredasyonu	12
2.5.2 PAH'ların Bakteriyel Katabolizması	13
2.6. Dioksijenaz Enzimleri	14
2.6.1 Intradiol Katekol Dioksijenazlar	16
2.6.2 Ekstradiol Katekol Dioksijenazlar	19
2.7 Halofilik Prokaryotlar	20
2.7.1 Halofilik <i>Archaea</i>	21
2.7.2 Halofilik <i>Bacteria</i>	25
2.8 Halofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Önemi	26
2.8.1 Bakteriorodopsin Üretimi	27
2.8.2 Halorodopsin Üretimi	27
2.8.3 Polimerik Maddelerin Üretimi	28
2.8.4 Besin ve Besin Endüstrisi	28
2.8.5 Enzim Üretimi	29
2.8.6 Biyolojik Sorumlu İyileştiriciler Olarak	29
2.8.7 Petrol Eldesi	30

2.8.8 Çevre Biyoteknolojisi	30
2.9 Literatür Özetleri	31
2.9.1 Halofilik <i>Archaea</i> ile Yapılmış Olan Çalışmalar	31
2.9.2 Halofilik ve Halotolerant <i>Bacteria</i> ile Yapılmış Olan Çalışmalar	33
2.10 Çalışmada Kullanılan PAH'lar	41
2.10.1 <i>p</i> -hidroksibenzoik asit	41
2.10.2 Naftalen	42
2.10.3 Fenantren	44
2.10.4 Piren	45
3. MATERYAL ve METOD	47
3.1 MATERYAL	47
3.1.1 Çalışmada Kullanılan İzolatlar	47
3.1.2 Kullanılan Besiyerleri	47
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler, Ayıraçlar ve Boyalar	59
3.1.3 Çalışmada Kullanılan PAH'lar	60
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	61
3.2 METOD	61
3.2.1 PAH Parçalayabilen İzolatların Belirlenmesi	61
3.2.2 İzolatların Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	62
3.2.3 PAH Parçalayabilen İzolatların Farklı PAH Konsantrasyonunda Üremelerinin Değerlendirilmesi	67
3.2.4 Ham Enzim Ekstrelerinin Hazırlanması	68
3.2.5 Protein Ekstrelerinin Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	69
3.2.6 Rothera Reaksiyonu	69
3.2.7 Dioksijenaz Enzimlerinin Spektrofotometrik Olarak Değerlendirilmesi	70
3.2.8 Spesifik Enzim Aktivitesinin Hesaplanması	71
3.2.9 Dioksijenaz Enzim Genlerinin Amplifikasyonu için İzolatlardan DNA Ekstraksiyonunun Yapılması	71
3.2.10 Dioksijenaz Enzim Kodlayan Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu	72
3.2.11 Agaroz Jel Elektroforezi	73
3.2.12 PCR Ürünlerinin Safılaştırılması	74
3.2.13 Dioksijenaz Enzimlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Nükleotid Sekans Analizi ..	74
3.2.14 Sekans Verilerinin Analizi	74
4. BULGULAR	75

4.1 PAH Parçalayabilen İzolatların Belirlenmesi	75
4.2 İzolatların Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	78
4.3 PAH Parçalayabilen İzolatların Farklı PAH Konsantrasyonunda Üremelerinin Değerlendirilmesi.....	85
4.4 Halka Parçalayan Dioksijenaz Enzimlerinin Değerlendirilmesi	88
4.4.1 Rothera Reaksiyonu	88
4.4.2 Dioksijenaz Enzimlerinin Spektrofotometrik Olarak Değerlendirilmesi	90
4.4.3 Spesifik Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi	97
4.5 Dioksijenaz Enzimlerini Kodlayan Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu	100
4.6 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	102
4.7 Dioksijenaz Enzimlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Nükleotid Sekans Analizi	104
4.7.1 Katekol 1,2 Dioksijenaz Enzimini Kodlayan Gen Bölgelerinin Sekans Analizi Sonuçları	104
4.7.2 Katekol 2,3 Dioksijenaz Enzimini Kodlayan Gen Bölgelerinin Sekans Analizi Sonuçları	105
4.7.3 Protokatekuat 3,4 Dioksijenaz Enzimini Kodlayan Gen Bölgelerinin Sekans Analizi Sonuçları	105
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	109
6. KAYNAKLAR	120
EKLER.....	139
EK 1 Katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgelerinin nükleotid sekans analizi sonuçları	139
EK 2 Katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgelerinin nükleotid sekans analizi sonuçları	146
EK 3 Protokatekuat 3,4 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgelerinin sekans analizi sonuçları	154
ÖZGEÇMİŞ.....	188

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
bç	Baz çifti
Da	Dalton
dk	Dakika
g	Gram
g/L	Gram/Litre
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
mM	Milimolar
μ g	Mikrogram
Rpm	Dakikadaki dönüş hızı
sn	Saniye
°C	Santigrat derece
V	Volt
%	Yüzde

Kısaltmalar

ATP	Adenozintrifosfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DNA	Deoksiribonükleotid
MIB	Munich Innovative Biomaterials
PCB	Poliklorobifeniller
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
SW	Sea water

pH	Hidrojen iyonları potansiyeli
PHA	Poly β -hidroksialkonat
PHB	β -hidroksibutirat
EPA	Environmental Protection Agency
DDT	<i>p-p</i> -Dikloro difenil trikloroetan
WHO	World Health Organization
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

- Şekil 4.1** İzolatların *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri..... 90
- Şekil 4.2** İzolatların *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri 91
- Şekil 4.3** İzolatların naftalen ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri 91
- Şekil 4.4** İzolatların naftalen ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri 92
- Şekil 4.5** İzolatların fenantren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri..... 92
- Şekil 4.6** İzolatların fenantren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri..... 93
- Şekil 4.7** İzolatların piren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri..... 93
- Şekil 4.8** İzolatların piren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri94
- Şekil 4.9** İzolatların *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri 94
- Şekil 4.10** C-52 İzolatının naftalen ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri 95
- Şekil 4.11** C-52 İzolatının fenantren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri 96

Şekil 4.12 C-52 İzolatının piren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri..... 97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) PAH'ların karsinojenite sınıflandırması (Int. Kyn. 1).....	7
Çizelge 3.1 PCR amplifikasyonu için kullanılan pirimerler	73
Çizelge 4.1 Farklı PAH içeren MSM besiyerinde halofilik ve halotolerant izolatların üreme durumları	78
Çizelge 4.2 İzolatların kültürel ve morfolojik özellikleri	79
Çizelge 4.2 (Devam) İzolatların kültürel ve morfolojik özellikleri.....	80
Çizelge 4.3 Farklı PAH konsantrasyonlarında izolatların MSM besiyerinde üreme durumları.....	87
Çizelge 4.4 Farklı PAH'lar ile inkübe edilen izolatların ham enzim ekstreleri ile yapılan rothera testi sonuçları.....	89
Çizelge 4.5 Farklı PAH'lar ile indüklenmiş izolatların ham enzim ekstrelerinin spesifik enzim aktivitesi.....	99
Çizelge 4.6 İzolatlara ait katabolik genlerin PCR amplifikasyon sonuçları	102
Çizelge 4.7 Katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan gen bölgesinin dizi analizi sonrası belirlenen en yakın gen bankası temsilcileri.	104
Çizelge 4.8 İzolatların protokatekhuat dioksijenaz enzimini kodlayan gen bölgelerinin dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın gen bankası temsilcileri	106

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 4.1 C-37 izolatının piren ile inkübasyon sonrası görünümü	75
Resim 4.2 C-27 izolatının <i>p</i> -hidroksibenzoik asit ile inkübasyon sonrası görünümü	76
Resim 4.3 C-43 izolatının fenantren ile inkübasyon sonrası görünümü.....	76
Resim 4.4 C-41 izolatının naftalen ile inkübasyon sonrası görünümü.....	76
Resim 4.5 C-50 izolatının piren ile inkübasyon sonrası görünümü	77
Resim 4.6 C-46 izolatının naftalen ile inkübasyon sonrası yakından görünümü.....	77
Resim 4.7 Negatif kontrol grubu görünümü	77
Resim 4.8 Modifiye Gram boyama işlemi sonrası Gram (-)olarak boyanmış hücreler, (A) Basil şekilli hücreler, (B) Kok şekilli hücreler	81
Resim 4.9 Katekol 1,2 dioksijenaz kodlayan muhtemel gen bölgelerinin (444 bç) amplifikasyon ürünleri	100
Resim 4.10 Katekol 2,3 dioksijenaz kodlayan muhtemel gen bölgelerinin (400 bç) amplifikasyon ürünleri	101
Resim 4.11 Protokatekhuat 3,4 dioksijenaz kodlayan muhtemel gen bölgelerinin (330 bç) amplifikasyon ürünleri	101
Resim 4.12 Katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan saflaştırılmış muhtemel gen bölgelerinin PCR amplifikasyon ürünleri (444 bç)	103
Resim 4.13 Katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodlayan saflaştırılmış muhtemel gen bölgelerinin PCR amplifikasyon ürünleri (400 bç)	103
Resim 4.14 Protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimini kodlayan saflaştırılmış muhtemel gen bölgelerinin PCR amplifikasyon ürünleri (330 bç).....	104

1. GİRİŞ

Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH)'lar doğada yaygın olarak bulunurlar ve potansiyel toksisiteleri, mutajeniteleri, karsinojeniteleri nedeniyle çevre kirleticisi olarak büyük öneme sahiptirler (Cerniglia and Heitkamp 1989, Patnaik 1992, Archana *et al.* 2008, Ri-He *et al.* 2008). Hidrofobik özellikleri nedeniyle pek çok PAH toprak ve sediment partiküllerine bağlanarak çevrede uzun süre parçalanmadan kalabilmektedir. Bunun sonucunda, çevre kirlenmesine neden olarak biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkilerler (Cerniglia *et al.* 1985, Tao *et al.* 2007).

PAH'lar ile kontamine ortamlar aynı zamanda yüksek tuz konsantrasyonuna sahiptir ve biyodegradasyon kontaminantların uzaklaştırılması için pek çok durumda primer mekanizmadır. Tuzlu habitatlarda PAH'lar bol miktarda bulunmalarına rağmen bu gibi ortamlarda PAH bileşiklerini parçalayabilen halofilik mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmalar ise çok azdır (Peng *et al.* 2008).

Aşırı tuzluluk koşullarına dayanıklı enzimleri, zor şartlarda enerji üretimine olanak sağlayan özel proteinlerinin varlığı, ekstrem koşullara karşı koyabilmek için kullandıkları stratejiler ve bu koşullara uyum göstermiş özel yapıları nedeniyle halofilik mikroorganizmalar, biyoteknoloji alanında çalışan birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Bu nedenle halofilik bakterilerin biyoteknolojik uygulamalarda özellikle biyoremediasyon çalışmalarında yararlanılmasının büyük avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Bu grup mikroorganizmalar tuzlu koşullar altında çok fazla katabolik çeşitlilik göstermelerine rağmen kullandıkları metabolik yollar ise tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmada, 17 adet halofilik ve halotolerant prokaryotik mikroorganizmanın *p*-hidroksibenzoik asit, naftalen, fenantren ve piren parçalayabilme yetenekleri ve kullandıkları metabolik yolun belirlenmesi amaçlanmıştır. Test edilen izolatların

PAH'ları parçalayabilme sürecinde kullandıkları metabolik yolun aydınlatılması için bu metabolik yollarda kullanılan enzimler, bu enzimleri kodlayan gen bölgeleri ve nükleotid sekansları belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH'lar)

Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH'lar), iki ya da daha fazla halkanın birleşmesiyle meydana gelen bileşikler olarak tanımlanmıştır (WHO 1998, Chang *et al.* 2011). PAH'lar doğada yaygın olarak bulunurlar ve potansiyel toksisiteleri, mutajeniteleri, karsinojeniteleri nedeniyle çevre kirleticisi olarak büyük öneme sahiptirler (Cerniglia and Heitkamp 1989, Patnaik 1992, Tao *et al.* 2007, Archana *et al.* 2008, Ri-He *et al.* 2008). Hidrofobik özellikleri nedeniyle pek çok PAH toprak ve sediment partiküllerine bağlanarak çevrede uzun süre parçalanmadan kalabilmektedir. Bunun sonucunda, çevre kirlenmesine neden olarak biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkilemektedirler (Cerniglia *et al.* 1985, Tao *et al.* 2007, Chang *et al.* 2011).

İki veya üç halkalı düşük molekül ağırlıklı PAH'ların, büyük molekül ağırlıklı PAH'lara oranla sudaki çözünürlükleri ve uçuculukları daha yüksektir. PAH'lar hidrofobik bileşiklerdir ve suda çözünmek yerine daha çok partiküllere tutunma eğilimindedirler. Bu nedenle de sulu ortamlarda daha çok sedimentlerde birikirler ve bu da biyolojik olarak parçalanmalarını yavaşlatmaktadır (Lima *et al.* 2005).

Yapılan araştırmalar sonucunda PAH'ların bitki ve hayvan dokularındaki birikim miktarlarının, bu canlının yaşadığı toprak ve içtikleri sudaki miktarlarından daha yüksek oldukları görülmüştür. Bu durum, PAH'ların dokularda birikme eğilimi gösterdiğini ortaya koymaktadır (Cerniglia *et al.* 1985, Hall *et al.* 1990, Bostrom *et al.* 1998, Catteral *et al.* 2000, Ololade and Lajide 2010).

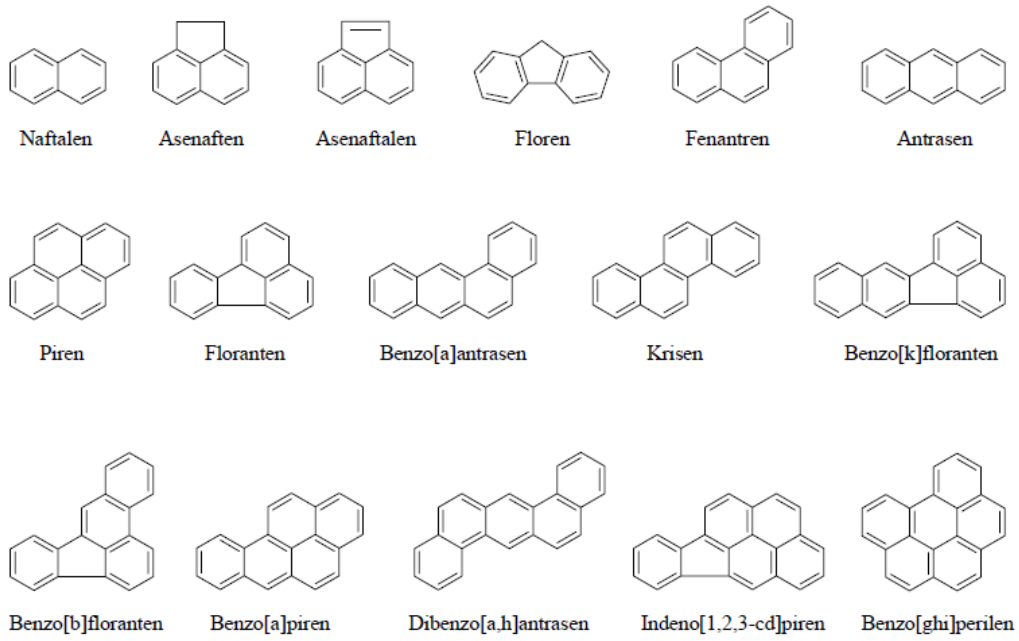
Fosil yakıtların evsel ve endüstriyel kullanımı, motorlu taşıt eksozları, volkanik patlamalar ve orman yangınları PAH'ların temel kaynakları olarak bilinmektedir (Saleha-Husian 2008, Chang *et al.* 2011).

Karbon ve hidrojenden oluşan bu organik bileşikler, daha çok fosil yakıtların ve diğer organik materyallerin tamamen yanmaması ya da yüksek sıcaklıkta erimesi sonucu meydana gelmektedirler. Sadece karbon ve hidrojen atomlarından oluşmalarına rağmen, benzen halkasında azot, oksijen ve kükürt atomlarının bulunduğu heterosiklik aromatik hidrokarbonlar da çoğunlukla PAH grubuna dahil edilmektedir (Lundstedt 2003).

Doğada 100'den fazla PAH bileşiği bulunmaktadır. En çok çalışılan ve yaygın olarak bulunanı, benzo[a] piren'dir. Bu bileşik 1938'de Kenneway tarafından kömür katranında karsinojen bir bileşik olarak tespit edilmiştir. Böylece, PAH'ların güçlü karsinojenik bileşikler olduğu kabul edilmektedir (Glatt *et al.* 1994).

Yüksek molekül ağırlıklı PAH'lar saf haldeyken katı formda bulunurlar ve genellikle erime noktaları 100 °C'den daha yüksek olduğu için buharlaşmaya uğramazlar. Büyük rezonans enerjileri dolayısıyla termodinamik yönden kararlıdır, fakat çeşitli halka pozisyonlarında fotooksidasyona uğrayabilirler (Saleha 2008).

Toksik özelliklerinin bulunması, dayanıklı olmaları ve çevrede yaygın olarak bulunmalarından dolayı 16 adet PAH bileşiği, Amerikan Çevre Koruma Örgütü'nün (EPA) öncelikli kirleticiler listesinde yer almaktadır. EPA'nın listesinde bulunan PAH'lar ve kimyasal yapıları Şekil 2.1'de verilmiştir (Keith and Telliard 1979, EPA 1993, Liu 2001). Uluslararası Kanseri Araştırma Örgütü (IARC) USEPA'nın belirlediği 16 PAH bileşiğinden 6 tanesinin dâhil olduğu 15 PAH bileşiğini potansiyel karsinojen olarak belirlemiştir (Archana *et al.* 2008, Int. Kyn. 1).



Şekil 2.1 EPA'nın öncelikli kirleticiler listesinde bulunan PAH'lar ve kimyasal yapıları (EPA 1993).

2.2 PAH'ların Oluşumu ve Kaynakları

PAH'lar çok çeşitli kaynaklardan meydana gelip çevreye yayılırlar. Başta doğal kaynaklı olarak volkanik aktiviteler ve orman yangınları olan PAH bileşikler, doğal kaynaklara kıyasla daha çok antropojenik faaliyetler sonucunda oluşmaktadır. Bilinen önemli antropojenik PAH kaynakları ise fosil yakıt tüketimi, petrol rafineri işlemleri, kok ve katran üretimi, endüstriyel işlemler ve motorlu araçlardan kaynaklanan emisyonlardır (Masih and Taneja 2006, Lease *et al.* 2011). Bunların dışında demir çelik endüstrisi, petrokimya endüstrisi, enerji üretim tesisleri ve çöp yakma tesisleri de PAH'ların önemli emisyon kaynaklarıdır (Ravindra *et al.* 2008).

Sigara dumanında da çok miktarda karsinojen PAH'lar bulunmaktadır. PAH'lardan en kanserojen olanı ve sigara dumanında en çok bulunanı benzo[a] piren'dir. Sigara için

insanlarda dudak ve akciğer kanserinin fazla görülmesinin sebebi diğer kanserojenlerle birlikte benzo[a] piren'dir (Kim *et al.* 2000).

PAH'lar, genelde oksijenin yetersiz olduğu koşullardaki yanma (500-800°C) reaksiyonları sonucunda oluşmaktadırlar. Eksik yanma veya yakıtla havanın yetersiz karışımı yakıtın bir kısmının yanmadan çıkış gazına kaçmasına sebep olmaktadır. Bunun tersine eğer hava eksik olursa termal dekompozisyon (piroliz) oluşur. Bu dekompozisyon süreci yakıtın orijinalinde olmayan yeni hidrokarbonların oluşmasına sebep olmaktadır (Finlayson and Pitts 1998, Esen 2006).

PAH'lar azot oksit ve nitrik asit ile reaksiyona girerek PAH'ların nitro türevlerini, kükürt oksitler ve sülfürik asitle reaksiyona girerek sülfirik ve sülfonik asit formlarını oluştururlar. Nitro PAH'ların oluşumu biyolojik etkileri ve mutajenik aktiviteleri yüzünden özellikle önemlidir (WHO 1998).

PAH bileşiklerinden asenaften, asenaftalen ve antrasenin boya, sentetik fiber, plastik ve böcek öldürücü üretimi gibi sektörlerde kullanılması amacıyla ticari olarak üretimleri yapılmaktadır. Ancak bu bileşiklerin ticari olarak üretimlerinin ve kullanımlarının çevresel etkileri diğer emisyon kaynaklarına oranla ihmal edilebilecek düzeydedir (Mumtaz and George 1995).

2.3 PAH'ların Sağlık Üzerine Olan Etkileri

Atmosferde hem gaz hem de partikül formda bulunabilen PAH'lar gerek deri yoluyla, gerekse solunum yoluyla canlı bünyesine girebilmektedirler. Bu durum onları canlılar için oldukça tehlikeli hatta toksik yapmaktadır. Solunum ve deri yoluyla alınan PAH'ların bazıları akciğerde ve deride karsinojenik etkilere sebep olurken, bazıları ise tümör oluşturucu aktivite göstermektedir. IARC'ın PAH'lar için hazırlamış oldukları karsinojenite sınıflandırılması Çizelge 2.1'de gösterilmiştir (Int. Kyn. 1).

Çizelge 2.1 Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) PAH'ların karsinojenite sınıflandırması (Int. Kyn. 1).

Yüksek Olasılıklı Karsinojen	Muhtemel Karsinojen
Benzo (a) antrasen	Benzo (b) fluoranten
Benzo (a) piren	Benzo (j) fluoranten
Dibenz (a, h) antrasen	Benzo (k) fluoranten
	Krisen
	Dibenz (a, h) akridin
	Dibenz (a, j) akridin
	7-h Dibenz (c, g) karbazol
	Dibenzo (a, e) piren
	Dibenzo (a, h) piren
	Dibenzo (a, i) piren

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, PAH'ların DNA yapısını bozarak bazı genetik değişikliklere sebep oldukları belirtilmiştir. Sigara içen ve işyerinde veya dışarıda yüksek miktarda PAH derişimine maruz kalan insanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, DNA mutasyonları görölmüştür. Bazı PAH bileşikleri ve bunların metabolitleri hücre bölünmesini kontrol eden mekanizmalar üzerinde onarılamaz hasarlara yol açarak balık ve memelilerde tümör oluşumuna, dolayısıyla kansere yol açmaktadırlar. PAH'lar yağ dokuda çözünebildiklerinden dolayı biyoakümülyasyona uğrayarak besin zincirine girebilmektedirler (Chen *et al.* 2006, Chang *et al.* 2011).

Dipte beslenen balıklar ve kabukluların bünyesine geçen PAH'lar hayvanlarda yara ve tümöre sebep olarak büyük bir olasılıkla besin zinciri yoluyla insanlara geçebilmektedir (Dickhut *et al.* 2000, Golomb *et al.* 2001). Hayvanlar üzerinde geçmişte yapılan araştırmalarda ise mutajenik ve karsinojenik etkilerinin yanında farklı toksik özelliklerinin de olduğu görölmüştür (Castellano *et al.* 2003).

Ayrıca PAH, PCB (Poliklorobifeniller) ve pestisit gibi kirleticilerin çevrede beraber bulunmalarının tek başına bulunmalarından daha tehlikeli olduğu belirtilmektedir (Lee *et al.* 1995).

2.4 PAH Bileşiklerinin Hava, Su ve Topraktaki Döngüsü

Atmosfere salınan PAH'lar kaynaklarından çok uzaklara taşınabilirler. Atmosferden kuru ve yağ çökme olaylarıyla toprağa, su kütlelerine ve bitkilerin üzerine inerler. Yüzey sularında PAH'lar uçuculaşma, fotoliz, oksidasyon, biyolojik parçalanma, parçacık madde üzerine adsorbsiyon ve sucul organizmaların bünyesine alınma gibi olaylarla giderilirler. Sedimena karışan PAH'lar yine biyolojik parçalanma ve sucul organizmaların bünyesine alınma olaylarıyla giderilirler. Topraktaki PAH'lar benzer şekilde uçuculaşma, fotoliz ve oksidasyon gibi abiyotik bozunma, biyotik bozunma ve bitkilerde biyoakümülyasyon olaylarıyla uzaklaştırılırlar. Ayrıca topraktaki PAH'lar yeraltı sularına sızarak akiferler vasıtasıyla farklı mesafelere taşınabilirler (ATSDR 2001).

Partiküller üzerine tutunmuş PAH bileşiklerinin asılı kalma süreleri ve taşınma mesafeleri parçacıkların boyutuna, kuru ve yağ çökme olaylarına bağlı iken, süpürülmeleri ise meteorolojik koşullara bağlıdır (ATSDR 2001).

Gaz fazındaki PAH'ların atmosferdeki bozunma ve dönüşümleri NO_x , N_2O_5 , OH, O_3 , SO_2 ve peroksiasetilnitrat molekülleriyle girdiği reaksiyonlar ve fotolizle gerçekleşir. Bu reaksiyonların sonucunda oksi-, hidroksi-, nitro- ve hidrokinitro-PAH bileşikleri oluşur. Bu bozunma ürünlerinden bazıları mutajeniktir. O_3 ve peroksiasetilnitratlar ile PAH'ların reaksiyonları sonucunda dion'lar (dione), azot oksitle reaksiyonları sonucunda ise dinitro- PAH bileşikleri oluşur. Kükürt dioksitle reaksiyonun ürünü ise sulfonik asit'tir. Gaz fazında PAH'ların en önemli reaksiyonları OH radikalleri ile girdiği reaksiyonlardır (Halsall *et al.* 2001, Dachs *et al.* 2002, Int. Kyn. 2).

Partikül fazdaki PAH bileşikleri NO_2 , O_3 ve SO_3 ile girdikleri reaksiyonlar sonucunda farklı bileşiklere dönüşürler. Bu reaksiyonlarda ışık katalizi yoktur. Işık katalizinde ise fotoliz sonucu kuinonlar, ketonlar ve asitler gibi oksidasyon ürünlerine dönüşürler. Kirli

bir havada partikül fazdaki PAH'ların yok olmasından sorumlu olaylar başta fotoliz ve bunu takiben NO₂, N₂O₅ ve HNO₃'le girdikleri reaksiyonlardır (ATSDR 2001).

2.5 PAH'ların Mikrobiyal Parçalanması

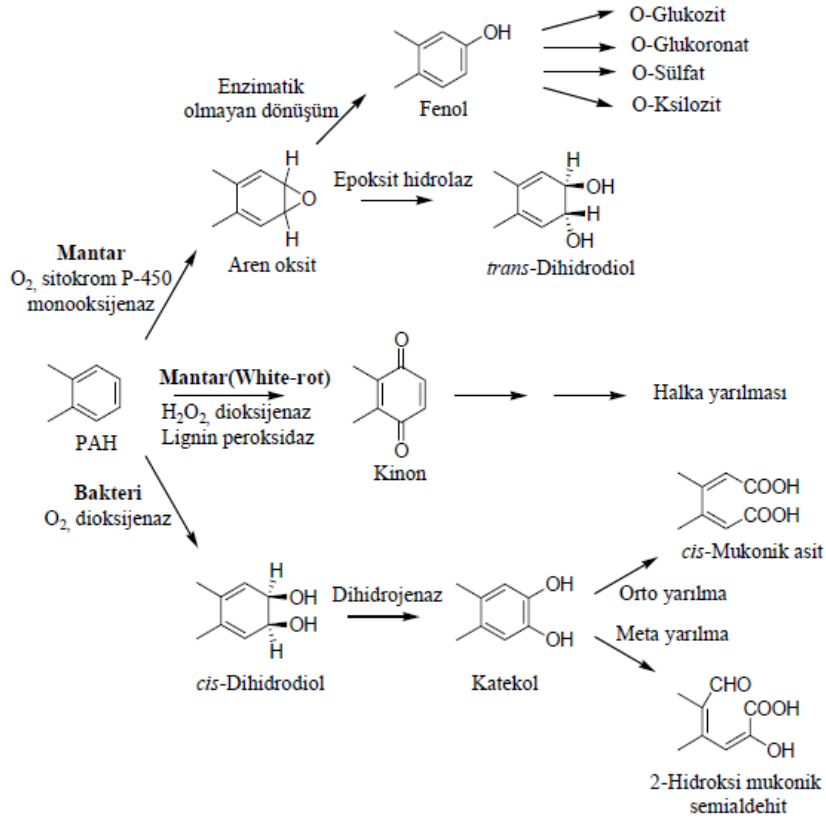
PAH'lar çeşitli ekosistemlerde yaygın olarak bulunurlar ve potansiyel toksisiteleri, mutajen olmaları ve karsinojeniteleri nedeniyle çevre kirleticisi olarak büyük öneme sahiptirler. Hidrofobik özellikleri nedeniyle pek çok PAH topraktaki ve sedimentteki partiküllere bağlanırlar. PAH'lar ile kontamine bölgelerin ekolojik yenilenmesinde mikrobiyal parçalanma majör mekanizmadır (Mallick *et al.* 2007, Tao *et al.* 2007, Peng *et al.* 2008, Chang *et al.* 2011, Lease *et al.* 2011).

Son yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesi, çeşitli ekosistemlerde PAH parçalanmasının metabolik işleyişin aydınlatılmasını ve bakterilerin metabolik yollardaki rolünün daha net ortaya koyulmasını sağlamıştır. Besin zinciri üzerinde karbon ve enerji akışında bakterilerin payının anlaşılmasından sonra mikrobiyal ekoloji çalışmalarında bakteriler tarafından petrol hidrokarbonları gibi bazı kirleticilerin daha zararsız formlara dönüşmesi sıklıkla çalışmalara konu olmuştur (Azam and Cho 1987, Margesin and Schinner 2001, Nicholson and Fathepure 2004, Garcia *et al.* 2005, Mallick *et al.* 2007, Wu *et al.* 2010, Lease *et al.* 2011).

Doğada kompleks moleküllerin parçalanması, biyolojik parçalanma olarak kendiliğinden devam ederken, ortam şartlarında insan eliyle yapılan değişikliklerle hızlandırılabilir ve biyoremediasyon çalışmaları olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyoremediasyonda zararlı kontaminantları parçalayabilmek için mikroorganizmaların metabolik çeşitliliklerinden yararlanılmaktadır (Mallick *et al.* 2007, Seo *et al.* 2009, Wu *et al.* 2010, Arulazhagan and Vasudevan 2011, Chang *et al.* 2011).

Bugüne kadar yapılan pek çok çalışmada PAH'ların mikroorganizmalar tarafından parçalanmaları, biyokimyasal ve genetik açılardan incelenmiştir (Wolfe 1977, Anonim 1985, Cao *et al.* 2008, Arulazhagan and Vasudevan 2009, Song 2009, Tapilatu *et al.* 2010). PAH'ları parçalayabilen mikroorganizmaların belirlenmesi, izolasyonu ve karakterizasyonu, çevrenin daha kısa bir sürede temizlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Hem prokaryotik hem de ökaryotik biyolojik parçalama mekanizmalarında, PAH halkalarına enzimatik tutunmanın başlaması için moleküler oksijenin bulunması gerekmektedir (Cerniglia 1984, Wu *et al.* 2010, Lease *et al.* 2011). Bunun yanısıra sülfat ve nitrat redükleme koşulları altında bazı anaerob mikroorganizmaların PAH parçalayabildikleri belirlenmiştir (Rockne and Strand 2001).

PAH'ların çevredeki bozunmaları biyolojik, kimyasal ve fotokimyasal süreçler sonucunda meydana gelmektedir. Bakteri ve mantarlar gibi mikroorganizmalar, PAH'ları diğer organik bileşiklere veya son ürünler olarak karbondioksit ve suya dönüştürür. Bakteri ve mantarların PAH'ları parçalama mekanizmaları birbirinden farklıdır. Bakteri ve mantarların PAH degradasyon mekanizmaları Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Bakteriler genellikle PAH'ları karbon kaynağı olarak kullanırken, mantarlar salgıladıkları enzim yardımıyla PAH'ları suda çözünür bileşiklere dönüştürürler. Mantarlar sitokrom P-450 enzim sistemi sayesinde PAH'ları okside ederek fenoller ve trans-dihidrodiollerini meydana getirirler. PAH'ların bakteriyel bozunması ise genellikle halkalardan birine dioksijenaz saldırısıyla başlar ve bir ara ürün olan katekol meydana gelir. Ardından halka hidroksil grupları arasından veya dışından parçalanır (Cerniglia 1992, Bamforth and Singleton 2005, Garcia *et al.* 2005).



Şekil 2.2 PAH'ların mikrobiyal degradasyonu (Cerniglia 1992).

Bugüne kadar metabolizma ya da kometabolizma yolları ile PAH'ları parçalayabilen birçok bakteri belirlenmiştir. PAH'ların bakteriler tarafından degradasyon mekanizmaları araştırılmıştır. Naftalen, fenantren ve antrasen gibi düşük molekül ağırlıklı PAH'ların genellikle toprakta ya da laboratuvar koşullarındaki bakteriler tarafından parçalanabildikleri görülmüştür (Cerniglia 1984, Cerniglia 1992, Sutherland *et al.* 1995, Tapilatu *et al.* 2010, Chang *et al.* 2011, Lease *et al.* 2011). Bununla birlikte benzo[a] piren ve benzo[a] antrasen gibi karbon ve enerji kaynağı olarak beş ya da daha fazla halkalı PAH'ların biyolojik olarak parçalanma mekanizmaları hakkında bilgimiz çok azdır.

PAH'ları kullanabilen birçok mantar türü üzerinde de araştırmalar yapılmıştır. *Bacidiomycetes*, *Deutromycetes* gibi filamentli mantarların PAH'ları parçalayabildikleri

gösterilmiştir. Fungal parçalanmaya duyarlı PAH'lar naftalen, fenantren, antrasen, piren, benzo[a] piren, floren, ketekol, benzo[a] antrasen, krisen, benzo[b] florantren örnek olarak verilebilir (Cerniglia 1997, Zheng and Obbard 2002, 2003).

2.5.1 Hidrokarbonların Halofilik *Bacteria* ve *Archaea* Üyeleri Tarafından Degredasyonu

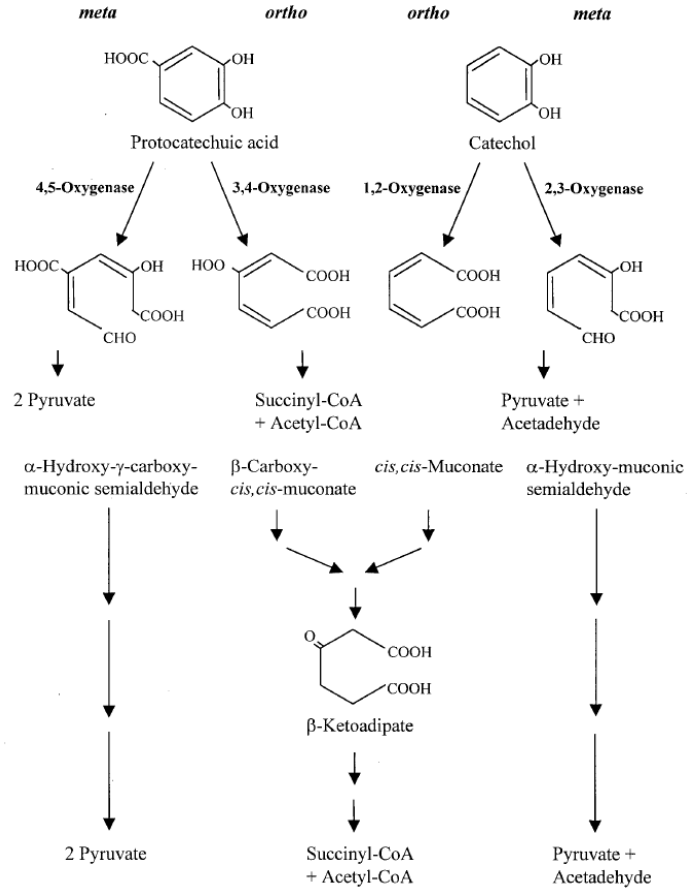
İnsanların sebep oldukları aktivitelerin giderek artması çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Özellikle aşırı tuzlu ortamlar bu kirlilikten etkilenmektedir. Bu gibi ortamlarda halofilik mikroorganizmalar tarafından organik kirleticilerin parçalanmasıyla ilgili bilinenler ise azdır. Ekstrem ortamlardaki mikroorganizmaların organik kirleticileri etkili bir şekilde ortamdan uzaklaştırıp uzaklaştıramayacakları tartışma konusudur. Halofilik mikroorganizmaların metabolizmaları farklıdır ve aşırı tuzlu ortamlara adaptasyon göstermişlerdir. Yapılan literatür taramaları sonucunda hem halofilik *Bacteria* hemde *Archaea* üyelerinin PAH'ların degredasyonunda düşünüldüğünden daha etkili olabilecekleri sonucuna varılmıştır (Garcia *et al.* 2005, Mallick *et al.* 2007, Borgne *et al.* 2008, Tapilatu *et al.* 2010, Arulazhagan and Vasudevan 2011, Chang *et al.* 2011).

Ekstrem halofilik, asidofilik, alkalifilik veya barofilik mikroorganizmaların biyolojik parçalanma potansiyellerinin sınırlı olduğuna dair görüşler vardır (Margesin and Schinner 2001). Pek çok durumda hidrokarbon parçalanmasında bu mikroorganizmaların metabolik aktivitelerinin yüksek tuz konsantrasyonunda azaldığı düşünülmektedir (Ward and Brock 1978, Kleinsteuber *et al.* 2006). Bunun aksi olarak bazı araştırmalarda tuzlu ortamlarda hidrokarbonların parçalanma miktarının arttığı görülmüştür (Yang *et al.* 2000, Kleinsteuber *et al.* 2006). Bu durum muhtemelen, mikrobiyal komünitelerin çok çeşitli ve kontamine bölgelerin spesifikliğinden kaynaklanmaktadır.

2.5.2 PAH'ların Bakteriyel Katabolizması

Tek karbon kaynağı olarak düşük molekül ağırlıklı PAH'ları kullanan ya da PAH'ları parçalayabilen birçok bakteri belirlenmiştir. Naftalen, fenantren, antrasen gibi PAH'ların bakteriler tarafından parçalanmasında yaygın olarak kullanılan biyokimyasal yollar iyi araştırılmıştır (Garcia *et al.* 2005, Seo *et al.* 2009, Lease *et al.* 2011). Pek çok aromatik bileşik enzimatik olarak parçalanarak ilk olarak katekol veya protokatekuat gibi di- veya trihidroksile substratlara dönüştürülür (Buchan *et al.* 2000, Cao *et al.* 2008, Chang *et al.* 2011). Biyolojik parçalanma mekanizmaları, PAH halkasının enzimatik atağını başlatmak için moleküler oksijen varlığını gerektirmektedir. Aerobik bakteriyel sistemlerde başlangıç basamağında PAH'ların dioksijenaz katalizli oksidasyonuyla gerçekleşmektedir ve cis-dihidrodiolle multikomponent enzim sistemi ile erken biyoürün olarak ortaya çıkmaktadır. PAH substratlarının cis-dihidrodiollerinin formasyonundan sorumlu dioksijenazlar en çok bakterilerde görülmektedir (Fairley *et al.* 2002, Song 2009).

Bu dihidroksile ara ürünler, intradiol ya da ekstradiol halka parçalayan dioksijenazlar ile *orto* parçalama yolu ya da *meta* parçalama yolu ile kesilerek santral ara ürünler oluşmaktadır ve daha sonra bu ürünler TCA siklusundaki ara ürünlere dönüşmektedirler. Intradiol halka parçalama yolundaki (*orto* yol) enzimler, katekol 1,2 dioksijenaz ve/veya protokatekuat 3,4-dioksijenaz iken ekstradiol halka parçalama yolundaki (*meta* yol) enzimler ise katekol 2,3 dioksijenaz ve/veya protokatekuat 4,5-dioksijenaz enzimleridir (Cerniglia 1992, Garcia *et al.* 2005, Song 2009). Bu metabolik yollar ve enzimleri Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

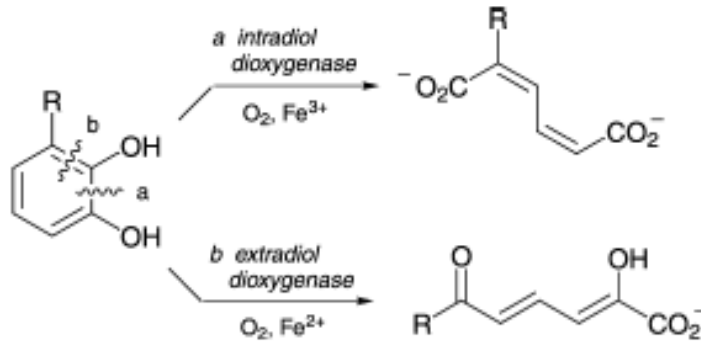


Şekil 2.3 Oksidatif aromatik halka parçalama reaksiyonu. Farklı aromatik hidrokarbonlar çeşitli halka parçalama reaksiyonları ile santral ara ürünlere dönüşmektedir (Iwagami 1994).

2.6. Dioksijenaz Enzimleri

Doğada pek çok enzimin atmosferdeki dioksijenin aktivasyonu ile faaliyet gösterdiği ve önemli reaksiyonlarda etkili oldukları görülmüştür. Oksijenazlar, oksijen atomlarının ürünün içine katılmasını sağlarlar. Monooksijenazlar sadece bir oksijen atomunun ürün katılımını sağlarken, dioksijenazlar her iki oksijen atomunu ürüne katmaktadır. Dioksijenaz enzimlerinin pek çoğu genellikle Fe^{+2} veya Fe^{+3} gibi bir metal kofaktöre ihtiyaç duymaktadırlar (Bugg 2003).

Katekol dioksijenazlar, katekol'ün oksidatif parçalanmasını katalizlemektedirler. Doğada aromatik bileşiklerin bakteriyel parçalanması için katekol'e dönüşümü anahtar basamaktır. (Dagley 1975). Katekol'ün oksidatif olarak parçalanmasını katalize edebilen ve dioksijeni substrat olarak kullanabilen iki dioksijenaz enzim ailesinin varlığı ortaya konulmuştur (Hayaishi *et al.* 1995). Bunlardan bir tanesi intradiol dioksijenazlar olup, katekol 1,2 dioksijenazlar (pyrocatechase) olarak isimlendirilmektedirler. Bu enzimler fenolik hidroksil grupları arasındaki karbon-karbon arasındaki bağları parçalayarak ürün olarak mukonik asit oluşumunu sağlamaktadırlar ve kofaktör olarak Fe^{+3} 'e gereksinim duymaktadırlar (Kojima *et al.* 1961). Diğeri ise ekstradiol dioksijenazlardır ve katekol 2,3 dioksijenazlar (metapyrocatechase) olarak isimlendirilmektedirler. Fenolik hidroksil gruplarına bitişik olarak bulunan karbon-karbon arası bağları parçalayarak ürün olarak 2-hidroksimukonaldehid oluşumunu sağlamaktadırlar ve kofaktör olarak Fe^{+2} 'e ihtiyaçları vardır (Kojima *et al.* 1961). Ekstradiol ve intradiol dioksijenazlar ile aromatik halkaların parçalanması Şekil 2.4'de gösterilmiştir. Metabolik yollar sonucunda açığa çıkan ürünler TCA'ya katılmaktadır.



Şekil 2.4 Ekstradiol ve intradiol dioksijenazlar ile aromatik halkaların parçalanması (Bugg 2003).

Intradiol (*orto*) yol; β -ketoadipate yolu olarak da isimlendirilmektedir (Stanier and Ornston 1973) Bu metabolik yol, pek çok farklı toprak mikroorganizmasında yaygın olarak görülmektedir. Bu metabolik yol bitki materyalleri, toprak ve diğer kaynaklardan

türevlenen aromatik bileşiklerin parçalanmasında önemli rol oynadığından dolayı ana yolak (major utility pathway) olarak bilinmektedir (Harwood and Parales 1996).

2.6.1 Intradiol Katekol Dioksijenazlar

Bu enzimler fenolik hidroksil grupları arasındaki karbon-karbon arasındaki bağları parçalayarak ürün olarak mukonik asit oluşumunu sağlamaktadırlar ve kofaktör olarak Fe^{+3} 'e gereksinim duymaktadırlar. Bu enzimlerin rol oynadıkları metabolik yol iki dala ayrılmaktadır. Bunlardan birinde katekol, diğerinde ise protokatekhuat rol oynamaktadır. Bu bileşikler katekol 1,2 dioksijenaz ve protokatekhuat 3,4 dioksijenaz tarafından parçalanmaktadır. Bakterilerde bu iki metabolik yol ara ürünleriyle birleşir ve bu yol β -ketoadipate enol lakton yolu olarak bilinir. β -ketoadipate yolu bakterilerde biyokimyasal olarak korunmaktadır ve bu metabolik yolun enzimlerini kodlayan yapısal genlerin farklı bakteri türlerinde homolog oldukları görülmüştür. *A. calcoaceticus* ve *P. putida* suşlarından β -ketoadipate yolundaki genler klonlanarak sekans analizleri yapılmıştır. İki organizmanın G+C içerikleri %20 oranında farklılık göstermesine rağmen izofonksiyonel enzimler için aminoasit sekansları %45-68 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Harwood and Parales 1996).

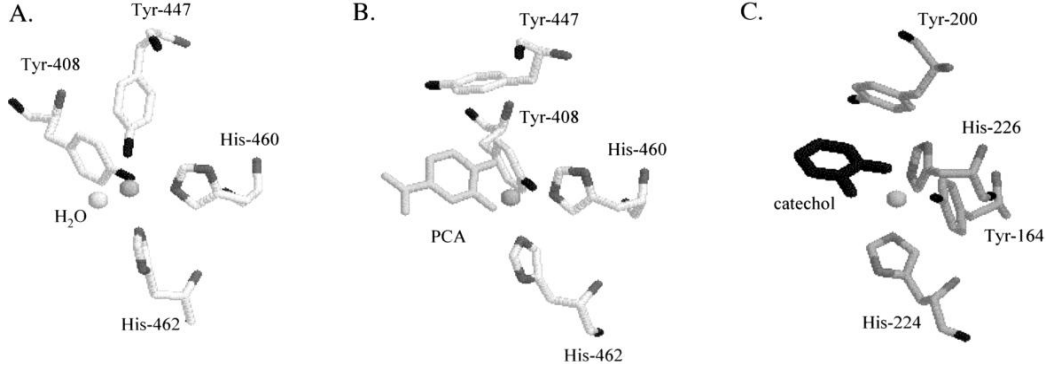
β -ketoadipate yolundaki farklılıklar; metabolitler, genetik organizasyon, operon dizileri ve gen regülasyonundan kaynaklanmaktadır. Bazı organizmalar bu yolun sadece bir kısmına sahipken diğerlerinininki farklılık gösterebilmektedir. *P. putida*'da katekol ve protokatekhuik asit yolları β -ketoadipate enol-lakton yolunda birleşmektedir (Ornston 1996). Farklı bakterilerde metabolik yol ürünlerinin farklı olduğu düşünülmektedir. Örneğin β -ketoadipate yolunda protokatekhuat pek çok bakteride anahtar efektördür. *Agrobacterium*'da β -karboksi cis-cis mukonat önemli bir indükleyicidir (Parke 1977). *Cat* ve *pca* genleri genellikle kümeler halinde bulunmaktadır fakat bu gen bölgeleri her türde korunmamıştır. Operon grupları arasındaki bağlantı supraoperonik (Wheelis and Stanier 1970) veya superoperonik (Morgan and Dean 1985) olarak kümelenebilir olarak bulunmaktadır. Örneğin *cat* ve *ben* genleri ile *pca* ve *pob* genlerinin, benzoatın katekole ve hidroksibenzoik asitin protokatekhuat'a dönüşümünü sağladığı ve aynı bakteride

yakın ilişkili oldukları görülmüştür (Harwood and Parales 1996). *A. calcoaceticus* suşunda *cat* genleri CatR tarafından pozitif yönde regüle olmakta iken PcbR regülatör protein ailesinden olan PcaR'nin *pca* gen ekspresyonunu aktive ettiği belirlenmiştir. (Rothmel *et al.* 1990, Romero-Stainer *et al.* 1994). *A. calcoaceticus* suşunda CatR homologu olan CatM proteini *cat* genlerini pozitif yönde regüle ederken PcaU ise *pca* genlerinin ekspresyonunu aktive etmektedir (Romero-Arroyo *et al.* 1995, Harwood and Parales 1996). *B. cepacia*'da protokatekhuat 3,4 dioksijenaz kodlayan genlerin negatif kontrol altında olabilecekleri düşünülmektedir (Zylstra *et al.* 1989).

Hayaishi, *Pseudomonas*'dan elde ettikleri katekol 1,2 dioksijenaz üzerinde $^{18}\text{O}_2$ işaretleme yöntemini kullanarak her iki oksijen atomunun reaksiyona nasıl katıldığını ve reaksiyon ürünlerini ortaya koyabilmiştir. (Hayaishi *et al.* 1955). Hayaishi, katekol dioksijenazın X ışınlarıyla kristal yapısını ortaya koymuştur. Ohlendorf, ilk kez *Pseudomonas putida*'dan intradiol enzim olan protokatekhuat 3,4 dioksijenaz'ın X ışınlarıyla kristal yapısını ortaya koymuştur. (Ohlendorf *et al.* 1988). Bu enzim oligomerik yapıdadır ve α ve β alt ünitelerine sahiptir. Bu enzim $(\alpha\beta\text{Fe}^{+3})_{3-12}$ kuaternal yapısındadır (Frazee *et al.* 1993). *Rhizobium trifolii* TA1 suşu üzerinde yapılmış olan çalışmalarda bu enzimin $(\alpha_2\beta_2\text{Fe}^{+3})_2$ kuaterner yapısında olduğu rapor edilmiştir (Chen *et al.* 1984). Farklı bakterilerde elde edilen protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enziminin α ve β alt ünitelerinin %22 ve %29 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur. *P. putida* ve *A. calcoaceticus* üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda α ve β alt ünitelerinin aminoasit sekanslarının %53-56 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Fe^{+3} kofaktörü dört tane aminoasit zincirine bağlı olarak bulunmaktadır. İmidazol zincir bölgesinde His-460, His-462 ve fenolik zincir bölgesinde ise Tyr-408, Tyr-447 yer almaktadır. Şekil 2.5 (A)'da gösterilmiştir. Bu iki tirozin ligantının kofaktör olan Fe^{+3} 'ü stabilize ettiği ve ligant-metal transfer etkileşimi dolayısı ile enzimin karakteristik rengi olan koyu kırmızı renk almasını sağladığı düşünülmektedir (Ohlendorf *et al.* 1988). *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* sp. ADP1 suşları ile yapılan çalışmalarda protokatekhuat 3,4 dioksijenazların X ışınlarıyla kristal yapıları aydınlatılmış ve aktif

bölgelerinin yüksek oranda benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Pyrz *et al.* 1985, Vetting *et al.* 1995).



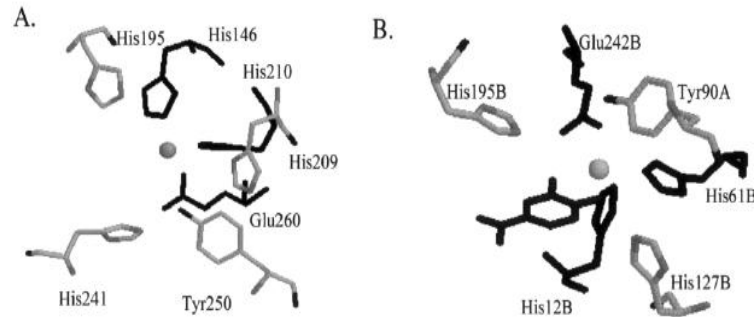
Şekil 2.5 Intradiol katekol dioksijenazların aktif bölgelerinin yapısı: (A) *Pseudomonas putida*'ya ait protokatekhuat 3,4 dioksijenaz, (B) Protokatekhuat 3,4 dioksijenaz ile substrat kompleksi, (C) *Acinetobacter* sp. ADP1'ye ait katekol 1,2 dioksijenaz enziminin aktif bölgesinin yapısı (Bugg 2003).

Intradiol dioksijenazlardan biri olan katekol 1,2 dioksijenaz'ın yapısı *Acinetobacter* sp. suşunda ortaya çıkarılmıştır. Bu enzim bir α_2 homodimer ile birlikte her alt ünite başına bir Fe^{+3} kofaktör içermektedir. Enzimin bu üçüncül yapısı protokatekhuat 3,4 dioksijenaz'ın yapısı ile benzerlik göstermesine rağmen katekol 1,2 dioksijenaz iki alt ünitesinin ara yüzlerinde lösin fermuar modeli yer almaktadır. Katekol 1,2 dioksijenaz'ın aktif bölgesi ise Fe^{+3} ligantlarının düzenlenmesiyle yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Aksiyal ligantlar; Tyr-200 ile His-226, ekvatoryal ligantlar ise Tyr-164 ve His-224 ligantlarıdır. Şekil 2.5 (C)'de gösterilmiştir (Vetting *et al.* 2000).

Dioksijen ile Fe^{+3} -katekol reaksiyonunun, substrat aktivasyon mekanizması yolu vasıtasıyla olabileceği düşünülmektedir. İntradiol katekol parçalanması sonucunda mukonik anhidrit ürünleri veya mukonik asitin furanon türevleri ortaya çıkmaktadır.

2.6.2 Ekstradiol Katekol Dioksijenazlar

Ekstradiol katekol dioksijenazlar fenolik hidroksil grupların yanında yer alan karbon-karbon arası bağların oksidatif olarak parçalanmalarını kataliz ederek 2-hidroksimukonaldehid oluşumunu katalizlemektedirler. Bu reaksiyon sırasında Fe^{+2} 'yi kofaktör olarak kullanmaktadırlar. Han vd. (1996)'da *Pseudomonas* LB400 suşu üzerinde yapmış oldukları çalışmalar sonucunda 2,3 dihidroksibifenil 1,2 dioksijenaz (BphC) enzim yapısını ortaya çıkarmışlardır. Enzimin bu üçüncül yapısı birbirine benzer iki domain $\beta\alpha\beta\beta$ içermektedir ve sadece bir tanesi Fe^{+2} 'yi kofaktör olarak kullanmaktadır. Aktif bölge üç aminoasit zinciri (His-146, His-210, Glu-260) ile Fe^{+2} merkezinin bağlı olarak bulunduğu bölgede yer almaktadır. Şekil 2.6 (A)'da *Pseudomonas* LB400 izolatının 2,3 dihidroksibifenil 1,2 dioksijenaz (BphC) enziminin aktif bölgesi gösterilmiştir (Han *et al.* 1995).



Şekil 2.6 Ekstradiol katekol dioksijenazların aktif bölgelerinin yapısı (A) *Pseudomonas* LB400 izolatının 2,3 dihidroksibifenil 1,2 dioksijenaz (BphC), (B) *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 izolatının protokatekhuat 4,5 dioksijenaz enzimi (Bugg 2003).

Sugimoto vd. (1999), *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 suşu üzerinde yapmış oldukları çalışmalar sonucunda protokatekhuat 4,5 dioksijenaz enziminin $\alpha_2\beta_2$ yapısında olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Sugimoto 1999). Şekil 2.9 (B)'de *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 izolatının protokatekhuat 4,5 dioksijenaz enziminin aktif bölgesi

gösterilmiştir Bu enzim BphC modeli ile hiçbir sekans benzerliği göstermemesine rağmen Fe^{+2} ligandlarının dizilimi çok benzerlik göstermektedir. Bu merkez His-12, His-61 ve Glu-242 ile düzenlenmiştir.

2.7 Halofilik Prokaryotlar

Halofilik mikroorganizmalar; gelişebilmeleri için yüksek miktarda tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyan, tuzlu ortamlarda yaşayabilmek için farklı adaptasyonlar geliştirmiş, hem prokaryotik hem de ökaryotik temsilcileri olan bir gruptur. Kushner (1985), mikroorganizmaları gelişebilmeleri için gerekli olan optimum NaCl miktarına göre şöyle sınıflandırmıştır:

- 1) Halofilik olmayanlar; gelişmeleri için %1'in altında NaCl'ye ihtiyaç duyanlar.
- 2) Az halofiller; gelişmeleri için %1-3 arasında NaCl'ye ihtiyaç duyanlar.
- 3) Orta derecede halofiller; gelişmeleri için %3-15 arasında NaCl'ye ihtiyaç duyanlar.
- 4) Aşırı halofiller; gelişmeleri için %15'den daha fazla NaCl'ye ihtiyaç duyanlar.

Ayrıca bunların dışında "Halotolerant" olarak adlandırılan bir grup daha bulunmaktadır. Bunlar tuzun varlığında veya yokluğunda gelişebilen mikroorganizmalardır (Kushner 1985).

Halotolerant mikroorganizmalar, tuz için özel bir gereksinimi olmayan mikroorganizmalardır. Ancak halotolerant olmayanların genel olarak ihtiyaç duyduğu

100-200 mM NaCl kadar tuza ihtiyaç duymalarına rağmen az halotolerantlar yaklaşık 1,25 M NaCl'e kadar üreyebilirler, orta derecede (ılımlı) halotolerantlar ise yaklaşık 3 M NaCl'e kadar üreyebilirler. Aşırı ekstrem halotolerantlar ise tuzun doygunluk noktasına kadar üreyebilmektedirler (Grant *et al.* 1998).

2.7.1 Halofilik *Archaea*

Doğada halofilik *Archaea* dağılımını belirleyen temel faktörler; total tuz konsantrasyonu, tuzların iyonik kompozisyonu ve mevcut besinlerdir. Dünya üzerinde halofilik *Archaea*, evaporasyon ile denizden orjinlenen ve dominant iyon kompozisyonu Na⁺ ve Cl⁻ olan thalassohaline ortamlarda ve oldukça farklı iyonik kompozisyona sahip athalassohaline sularda da yaşamaktadırlar (Rodriguez-Valera *et al.* 1979, Rodriguez-Valera 1988, Tindall 1988, Oren 1994, Kamekura 1999, Arulazhagan and Vasudevan 2009).

Archaea domaini içindeki halofilik mikroorganizmalar 3 familyada bulunurlar: *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae*, *Methanosarcinaceae*. Tuzlu ve aşırı tuzlu şartlara uyum sağlamış organizmaları olduğu kadar halofilik olmayan organizmaları da içermektedirler. Bunlardan bazıları 300 g/l tuz konsantrasyonlarında dahi gelişebilmektedirler. *Halobacteriales* takımı içindeki tek familya *Halobacteriaceae* tamamiyle halofillerden oluşmuştur. Tüm mikroorganizmalar içinde en çok tuza ihtiyaç duyan ve tuza en toleranslı olanlar bu familya içinde yer almaktadır (Grant 1986, Ma *et al.* 2010, Trigui *et al.* 2011).

Halofilik *Archaea* türlerinin çoğu içerdikleri C50 ve C40 karotenoidlerinden dolayı kırmızı tonlarındadır ve yüksek komünite yoğunluğuna ulaştıkları zaman nötral ve alkali aşırı tuzlu suların kırmızı renk tonlarında görünmelerine neden olmaktadır

(Arahal *et al.* 1996, Oren and Rodriguez-Valera 2001, Oren 2002a). Asidofilik halofilik *Archaea* tipleri henüz rapor edilmemiştir. Halofilik *Archaea* türlerinin pek çoğu optimum olarak 35-50 °C arasındaki ve bazen daha yüksek sıcaklıklarda üremektedirler (Shand and Perez 1999). Buna karşılık su sıcaklığı +11.5 ile 0 °C arasında değişmektedir (Franzmann *et al.* 1988). Halofilik *Archaea* üyeleri sulu ortamların yanı sıra tuzlu topraklardan da izole edilmişlerdir (Queseda *et al.* 1982, Kulicheuskaya *et al.* 1992, Zyvagintseva and Tarasov 1988). *Halobacteriaceae* üyeleri ayrıca, korunması için tuzlanmış yiyecek, deri ve diğer ürünlerde de bulunabilmektedirler (Rodriguez-Valera 1988).

Halofilik *Archaea* üyeleri çok yüksek miktarda hatta bazen doygunluğa yakın miktarda tuzla ihtiyaç duymaktadırlar. Üremeleri için en az 1,5 M NaCl'e ihtiyaç duymakta olup suşların çoğunluğu 3-5 M NaCl konsantrasyonunda en iyi üreme göstermektedir (Oren 2000, Trigui *et al.* 2011).

Doygun tuz konsantrasyonunda (5.2 M NaCl) yaşayan *Halobacteriales* ordosu üyeleri, ortamdaki yüksek ozmotik basınca karşı koyabilmek için sitoplazmalarında başta K⁺ ve Cl⁻ olmak üzere yüksek oranlarda iyonlar biriktirirler ("salt-in" stratejisi). 3.5 M NaCl'den daha yüksek olan hücre içi tuz konsantrasyonunun (yaklaşık 5 M) büyük kısmını KCl ve daha az olmak üzere NaCl oluşturmaktadır (Kushner 1985, Hough and Danson 1989, Ma *et al.* 2010). Halofilik *Archaea* üyeleri, iç ortamlarında ozmolit çözüner madde olarak dış ortamdakinin 100 katı oranında KCl biriktirdikleri için, hücresel bileşenleri de bu tuz konsantrasyonuna adapte olup proteinlerin stabilitesi ve fonksiyonu için bu tuz oranı gereklidir. Halofilik enzimler yaklaşık 1 M'ın altındaki NaCl/KCl konsantrasyonlarında hızla denatüre olmaktadır. Bu nedenle halofilik *Archaea* türlerinin protein yapılarında, diğer canlılara göre negatif yüklü aminoasit oranı %20 daha fazladır. Ortamın "salting-out" etkisini kompanse etmek için polar olmayan aminoasit miktarını azaltarak adapte olmuşlardır. (Danson and Hough 1997, Hough and Danson 1999, Sellek and Chaudhuri 1999, Kunte *et al.* 2001, Ma *et al.* 2010). *Halobacterium salinarum* NRC-1 proteomunun oldukça asidik karakterde

olduğu (izolektrik noktası 4.9) ve diğer canlıların proteinlerinin denatüre olduğu doygunluk derecesindeki hücre içi tuz konsantrasyonunda stabil kaldığı belirtilmiştir. Bazı halofilik *Archaea* türlerinin (*Natronococcus occultus*, *Natronobacterium gregoryi* v.b.) sitoplazmalarında yüksek tuz konsantrasyonunun yanısıra organik ozmolit çözüner madde olarak 2-sülfo trehaloz da saptanmıştır. Enzimatik mekanizmanın adaptasyonunda organik ozmolit biriktirilmesinin enerjetik yönden KCl'e göre ekonomik olmadığı belirtilmiştir. Salt-in sitoplazma stratejisiyle hücre içerisinde dışarıya göre daha yüksek oranda K⁺ biriktiren halofilik *Archaea* üyeleri, Na⁺ iyonlarını Na⁺/H⁺ antiport sistemi ile dışarı atmaktadırlar (Oren 1999, Oren 2000, Roeßler and Müller 2001, Oren 2002a). Potasyum ile birlikte karşıt iyon olarak Cl⁻ da stoplazmada yüksek oranda bulunmaktadır ve enerji gereksinimi olan aktif Cl⁻ alımının büyüme ve bölünme aşamalarında hücre hacmini arttırmaları için gerekli olduğu belirtilmiştir. Halofilik *Archaea* üyelerinde Cl⁻ alımı ile ilgili 2 sistem tanımlanmıştır. Bunlardan biri ışıkla çalışan klor pompası rodopsin, diğeri ise ışığa bağımlı olmayan transport sistemidir (Kunte *et al.* 2001). Ayrıca KCl'ün *Halobacterium salinarum*'da DNA'da zarar oluşturan oksidatif letal faktörlere karşı organizmayı koruduğu da rapor edilmiştir (Shahmohammadi *et al.* 1998).

Halofilik *Archaea*'nın hücre şekli, diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi, kendi hücre duvarları tarafından belirlenir. *Halobacteriaceae* familyasının türleri farklı şekillere sahiptirler. Çubuk (*Halobacterium* ve diğerleri), küre (*Halococcus*, *Natronococcus*)'ye ek olarak *Haloferax* gibi yassı pleomorfik türler de mevcuttur. Alışılmadık biçimler halofilik *Archaea* üyelerinin önemli bir turgor basıncına sahip olmasının eseridir. Üçgen şekilli (*Haloarcula japonica*) hücrelerin yanı sıra; ince, yassı ve kare şekilli *Archaea* mevcuttur (Oren 2002b).

Belirli halofilik *Archaea* türleri hücre duvarı dışında ayrıca polisakkarit kapsüle sahiptir. Çok miktarda ekzopolisakkarit *Haloferax* genusu tarafından salgılanır. *Haloferax mediterranei* üzerinde yapılan ilk analizler; ekstraselüler kısmın heteropolisakkarit ve majör komponentin mannoz olduğu olduğunu göstermiştir. Heteropolisakkarit yapıda glukoz, galaktoz, diğer belirlenememiş şekerler ve bunlar kadar aminoasit şekerler,

üronik asit de tespit edilmiş olup bunların sülfat bağları içerdikleri belirlenmiştir (Oren 2002a).

Halobacteriales'in birçok üyesi flagella yardımıyla hareket etmektedir. *Halobacterial* flagella sağa dönümlü heliks yapıdadır ve sola dönümlü *Bacteria*'dan farklıdır. Hareketlilik en fazla *Halobacterium salinarium*'da çalışılmıştır. Halofilik *Archaea* flagellumunun saat yönündeki rotasyonu hücrenin ileri doğru ilerlemesini, saat yönüne ters yapılan rotasyonu ise geriye doğru ilerlemesini sağlar (Oren 2002b).

Halofilik *Archaea*'da sitoplazmik membran, lipit ve proteinlerden oluşur. *Halobacteriales* ordosu üyelerinin hücre zarlarında, gliserole eter bağlı dallanmış 20-karbonlu (fitanil) ve bazen de 25-karbonlu zincirleri bulunmaktadır. Nötral lipitlerden farklı olarak fosfolipit, sülfolipit ve glikolipitlerden oluşan polar lipit tipleri suşların taksonomisinde önemli bir özellik olarak kullanılmaktadır (Torreblanca *et al.* 1986, Kates 1993). Besinlerin ve diğer bileşiklerin, iyonların içeri ve dışarı geçişleri, dış çevreden bilgi alan sensörleri, solunum elektron transportu için gerekli olan tüm fonksiyonları içeren yapıdır. Ayrıca retinal iyon pompası bakteriyorodopsin ve halorodopsin birçok halofilik *Archaea* membranında bulunur (Oren 2002b).

Gaz vezikülleri protein alt ünitelerinden yapılmış silindirik yapılardır. Gaz vezikül proteinleri halofilik *Archaea*'nın stabilizasyonu için tuza gereksinim duymayan proteinlerden biridir. *Halobacteriaceae*'de gaz vezikülleri basınca karşı hassastır ve düşük basınçta bile parçalanabilir. Gaz veziküllerine sahip olma, tuzlu su yüzeyinde yüzebilme aerobik halofilik mikroorganizmalar açısından avantajlıdır. Çünkü tuzca doymuş tuzlu sularda oksijen ve diğer gazların çözünürlüğü azdır (Oren 2002b).

Bazı *Halobacteriaceae* üyeleri çok miktarda polihidroksialkonat (PHA) polimeri üretirler. Özellikle *Haloferax mediterranei* ve *Haloarcula marismortui* PHA biriktirmektedir (Oren 2002b).

Halorubrum distributum dinlenme safhası için kalın duvarlı kist benzeri yapılar oluştururlar. Yaygın kültürlerin hücre duvarı ile kistlerin hücre duvarı arasında karşılaştırmalı bir bilgi yoktur. Gerçek endospor oluşumu *Archaea* üyeleri için şu ana kadar tanımlanamamıştır (Oren 2002b).

2.7.2 Halofilik Bacteria

Halofilik *Bacteria*'nın hücre şekilleri kok, çubuk ve gelişen hücrelerde ise elma şeklinde olup, uzun esnek filamentleri gözlenmektedir. Örnek olarak; *Dichotomicrobium thermohalophilum*'da uzun esnek filamentler gözlenmiştir (Hirsch *et al.* 1989)

Halomonas elongata'nın hücre duvarı hidrofobisitesi açısından farklılık gösterir. Yüzey hidrofobisitesi hücre duvar yapısı ve sitoplazmik membranın ortak bir fonksiyonudur. Yüksek NaCl konsantrasyonunda yüklü fosfolipidlerin sayıca artışı güçlendirilmiş hidrofilik eğilimi açıklayabilir. Hidrofilik hücre yüzeyi yüksek tuzluluktaki suyun az olduğu ortamlarda hücreyi su molekülü açısından daha çekici hale getirir ve bu sayede hücrenin su kaybetmesi önlenir (Oren 2002b).

Halomonas peptidoglukanının ilginç bir özelliği hidrofobik aminoasit lösin'in varlığıdır ki bu tüm hücre duvarı hidrofobisitesine katkı sağlar (Oren 2002b). *Halomonas eurihalina*, ilginç özellikli bir ekzopolisakkarit üretir. Bu yapının %42 karbonhidrat (çoğunlukla heksoz) ve %15'i proteindir. Kalan kısmının yapısı ise bilinmemektedir

(Oren 2002b). Halofilik *Bacteria*'da flagella ile hareket oldukça yaygındır. Özellikle kalın, polar flagella haloalkalifilik fotosentetik sülfür bakterisi *Halorhodospira abdelmalehii*'de gözlenir (Oren 2002b).

Halofilik *Bacteria*'da hücre membranında tuz bağımlı değişiklikler fosfolipid tipleri düzeyinde ve lipidlerdeki yağ asiti zincirleri düzeyinde identifiye edilmiştir. "Haloadaptasyon" hücre zarfının osmatik strese karşı bir cevabı olarak görülmektedir (Oren 2002b).

Halofilik *Archaea*'da sıkça görülen gaz veziküllerine, halofilik *Bacteria*'da nadiren rastlanmaktadır. *Cyanobacteria*'nın gerçek halofilik temsilcileri gaz vezikülleri içermemektedir (Oren 2002b). Bazı halofilik *Bacteria*'da ısıya toleranslı endosporlar bulunur (Oren 2002b).

2.8 Halofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Önemi

Halofilik mikroorganizmalar, biyoteknolojide çok sayıda ilgi çeken uygulamalarda yer bulmuşlardır. Halofilik mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalarda başlıca kullanım alanları aşağıda sıralanmıştır:

1. Bakteriorodopsin üretimi,
2. Halorodopsin üretimi,
3. Polimerik maddelerin üretimi,
4. Besin ve besin endüstrisi,
5. Enzim üretimi,

6. Biyolojik sorumlu iyileştiriciler olarak,
7. Petrol eldesi,
8. Çevre biyoteknolojisi

2.8.1 Bakteriorodopsin Üretimi

Çevrenin oksijen içeriği azaldığı zaman, halofilik *Archaea*'lar bakteriorodopsin sentezlemektedir. Bakteriorodopsin güneş ışığını elektiriğe dönüştürmek için kullanılabilir ve bir ATP jeneratörüdür (Oren 2002c). Bakteriorodopsin, güneş ışığından elektrik üretimi, deniz suyundan tuz giderimi, kimyasal ve biyosensörlerde kullanılması ve ultra hızda ışık saptanması gibi alanlarda da potansiyel olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. *Holobacterium salinarum*'dan elde edilen bakteriorodopsin COBEL adlı bir İsveç firması ve MIB (Munich Innovative Biomaterials) adlı Alman firması tarafından ticari olarak satılmaktadır (Kushner 1985, Hough and Danson 1989, Margesin and Schinner 2001).

2.8.2 Halorodopsin Üretimi

Halorodopsin kloride iyonu için biyosensör olarak kullanılır, ışık yansıma pompası olarak görev yapar. Bu sistem halofilik *Archaea*'da kloru (Cl⁻) hücre içine potasyum (K⁺) için anyon olarak pompalar (Oren 2002c).

2.8.3 Polimerik Maddelerin Üretimi

Ekstrem halofillerden olan *Haloferax mediterranei* hücre dışı polimerik madde olan β hidroksibutirat (PHB) ve β -hidroksibutirat'ın kopolimeri olan poly- β -hidroksialkonat (PHA) içerebilirler. Poly- β -hidrosialkonat içerikleri tuzluluğa bağlı olarak kuru ağırlıklarının %19-38'e kadar olabilmektedir. Poly- β -hidroksialkonat biyolojik parçalanabilir plastiklerin üretiminde kullanılır. Böyle termoplastikler (biyolojik polyesterler) polypropilenlere benzer olarak yüksek direnç ve düşük erime sıcaklığı gibi mükemmel özelliklere sahiptirler (Oren 2002c).

2.8.4 Besin ve Besin Endüstrisi

Besinlerde izole edilen *Micrococcus varians*, salçadan izole edilen *Vibrio costicola* gibi çok sayıda halofilik bakteriler vardır. Tat vericiler olarak bilinen ticari ürünlerde üretilmektedir. Mesela Tayland'da "nam pla" denilen fermente edilmiş balık sosu geleneksel olarak iki parça balık ve bir parça deniz tuzu eklenerek yapılır. Karışım konsantre tuzlu su ile kaplanır ve yaklaşık bir yıl fermente olması için bırakılır. *Halobacterium* ve *Halococcus* olarak identifiye edilmiş olan kırmızı halofilik *Archaea*, yaklaşık üç hafta sonra maksimum yoğunluklarına ulaşırlar ve fermantasyon periyodu boyunca bu durumlarını sürdürürler. Halobakterial proteazlar bu süreçte muhtemelen rol oynamaktadırlar. *Archaea* metabolizmasınca oluşan ürünlerin bu sosun aromasına katkı yaptığı düşünülmektedir (Oren 2002c).

Yağsız katkı maddesi olarak gliserol dieter lipitlerin besin katkı maddesi olarak kullanılabilceği ileri sürülmüştür (Post and Collins 1982, Ma *et al.* 2010).

2.8.5 Enzim Üretimi

Archaeal enzimler, yüksek tuzda görev yaptıkları ve organik çözücülere karşı dirençli oldukları için biyoteknolojik işlemlerde kullanılmaktadırlar. Tekstil ve deterjan endüstrisinde kullanılan enzimler, enzim endüstrisinin %65'ini oluşturmaktadır. Endüstri temelli mikrobiyal enzimlerin büyük bir çoğunluğu bakteriyel proteazlardır ve deterjan katkısı olarak kullanılır. Pek çok deterjan proteaz, amilaz, lipaz ve selüloz enzimleri içerir. Bu enzimler düşük sıcaklıkta enerji tasarrufu sağlarlar. Lipazlar çamaşır ve bulaşık deterjanlarında katı ve sıvı yağları temizleme kapasitesinden dolayı geniş kullanım alanına sahiptir (Oren 2002c). Ektoin'ler *Halomonas elongata* tarafından üretilen bir maddedir ve enzim düzenleyici olarak kullanılır. Ayrıca enzimin raf ömrünü ve enzim hazırlama işlemini artırır ve nemlendirme özelliğini arttırmak için cilt kremlerinde kullanılır (Oren 2002c, Ma *et al.* 2010).

İlaç ve kozmetiklerin yapısında kullanılan lipozomlar'ın yapımında halofilik *Archaea* esterazlara karşı yüksek bir kimyasal stabiliteye sahip olan eter bağlı lipitleri kullanılmaktadır. Amilaz, amiloglukozidaz, proteaz ve lipaz gibi yüksek tuzlulukta işlevsel olan ekzoenzimleri, yüksek tuz konsantrasyonunda makromoleküllerin yıkımı ile ilgili biyoteknolojik proseslerde kullanılabilirler (Chaga *et al.* 1993, Ventosa and Nieto 1995, Margesin and Schinner 2001).

2.8.6 Biyolojik Sorumlu İyileştiriciler Olarak

Halobacterium salinarium 84 kDa proteini üretir. Bu protein kanser hastalarında üretilen *C-myc* karşı üretilen antibadileri keşfetmek için kullanılır. Bu genetik mühendisliğinde *E.coli* içinde üretilen insan myc (transkripsiyon faktörü) proteininden daha pozitif sonuçlar vermektedir (Oren 2002c).

Halosinlerin, tuzlanmış yiyeceklerin veya derilerin tabaklanması esnasında meydana gelebilen bakteriyel bozunumun kontrolü amacıyla kullanılacakları ve bunlardan HalH7 halosininin halobakterilerdeki gibi memelilerde de benzer etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Litchfield 2002).

2.8.7 Petrol Eldesi

Haloferax mediterranei akuatik sistemlerin jeolojik özelliklerini değiştirmek üzere kullanılan hücre dışı bir polisakkarit üretir. Bu salgı kalınlaştırıcı ve jel maddesi olarak viskoziteyi stabilize eder. Bu polisakkarit pH, sıcaklık ve yüksek tuz konsantrasyonuna karşı dirençlidir. Bu nedenle petrol kuyularından petrol çıkarma işlemini iyileştirmek için kullanılabilir (Oren 2002c).

2.8.8 Çevre Biyoteknolojisi

Alkali yapıdaki endüstriyel sulardan veya tuzlu sulardan biyolojik fosfatın uzaklaştırılması için halofilik bakterilerin kullanılması mümkündür. Biyolojik fosfatı uzaklaştırılması için mikroorganizmaların kullanılması önerilmektedir *Halomonas* sp.'nin tuzlu fenolik atık suların temizlenmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Garcia *et al.* 2005)

İnsektisit, lindan, DDT (*p-p*-Dikloro difenil trikloroetan) veya triklorofenoller gibi halojenli organik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarında üreyebilen halofilik *Archaea* üyelerinin patentli proseslerde de kullanıldığı belirtilmiştir (Margesin and Schinner 2001).

Aromatik bileşiklerle kontamine olmuş tuzcul çevrelerde, halofilik bakterilerin katabolik rolünü Garcia vd. (2005) araştırmışlardır (Garcia *et al.* 2005). Hipersalin Oklahoma büyük tuz düzlüklerinde benzen ve toluenin aerobik parçalanırlılığı test edilmiş ve halofilik mikroorganizmaların parçalamadaki rolü gösterilmiştir (Nicholson and Fathepure 2004). Lefebvre vd. (2005), deri işleme atık suyunun biyolojik olarak temizlenmesi için halofilik mikroorganizmaları önermişlerdir (Lefebre *et al.* 2005). Tapilatu vd. (2010), kontamine olmamış tuzlu göllerden hidrokarbon (n-alkan) parçalayabilen aşırı halofilik *Archaea* üyelerini izole ederek hidrokarbonları parçalayabildikleri göstermişlerdir (Tapilatu *et al.* 2010). Arulazhagan ve Vasudevan (2011), deniz suyundan izole etmiş oldukları halotolerant bakteri izolatu olan *Ochrobactrum* sp.VA1'in tuzlu koşullar altında antrasen ve piren parçalayabilme yeteneğinin olduğunu belirlemişlerdir (Arulazhagan and Vasudevan 2011). Chang vd. (2011), petrol ile kontamine olmuş bölgelerden aldıkları sediment ve toprak örneklerinden izole ettikleri izolatların PAH biyoremediasyonu için potansiyel olarak kullanılabileceğini belirlemişlerdir (Chang *et al.* 2011).

2.9 Literatür Özetleri

2.9.1 Halofilik *Archaea* ile Yapılmış Olan Çalışmalar

Emerson vd. (1994), petrol ile kontamine olmuş olan tuzlu sulardan ve topraktan izole edilmiş ve 16S rRNA analizleri ile halofilik bir *Archaea* olan *Holoferax* sp. D1227 olarak belirlenmiş olan izolatu tek karbon ve enerji kaynağı olarak aromatik bileşikleri (benzoat, sinamik asit, fenil propionat vb.) kullanarak üreyebildiği belirlenmiştir. Buna rağmen fizyolojik olarak benzer mikroorganizmalar olan *Holoferax volcanii*, *Holoferax mediterrani*, *Haloarcula vallismortis*, *Haloarcula hispanica*'nın bu aromatik bileşikleri kullanarak üreyemedikleri saptanmıştır (Emerson *et al.* 1994).

Fu ve Oriol (1999), aşırı tuzlu petrol atıkları ile kontamine olmuş topraktan izole etmiş oldukları *Haloferax* sp. D1227 izolatı ile ilk kez aromatik hidrokarbonları (benzoik asit, sinamik asit, 3-fenilpropionik asit) karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak üreyebildikleri göstermişlerdir. 3-fenil propionik asitin *Haloferax* sp. D1227 suşu tarafından degradasyonu, *Archaea*'nın aromatik bileşikleri metabolize etme stratejilerinin anlaşılabilmesi için çalışılmıştır (Fu and Oriol 1999).

Fairley vd. (2002), *Haloarcula* sp. D1 izolatının aerobik koşullarda protokatekhuat veya katekol'den daha ziyade gentisik asit yolunu kullanarak *p*-hidroksibenzoik asiti metabolize edebildiğini belirlemişlerdir. *p*-hidroksibenzoik asit ile üreyen hücrelerde gentisat 1,2 dioksijenz aktivitesi belirlenmiştir (Fairley *et al.* 2002).

Cuadros-Orellana vd. (2006), aşırı tuzlu beş bölgeden aldıkları örneklerde aromatik bileşikleri metabolize edebilen halofilik *Archaea* izole ederek karakterize etmişlerdir. 44 yeni halofilik *Archaea*'nın tek karbon kaynağı olarak 0,4 mM *p*-hidroksibenzoik asiti enerji kaynağı olarak kullanarak gelişebildiklerini belirlemişlerdir. Bu izolatların metabolik ve genetik çeşitliliğine bağlı olarak *p*-hidroksibenzoik asiti en geniş oranda *Halobacteriaceae* üyeleri arasında parçalama yeteneklerinin olduğunu ileri sürmüşlerdir (Cuadros-Orellana *et al.* 2006).

Tapilatu vd. (2010), kontamine olmamış tuzlu göllerden hidrokarbon (n-alkan) parçalayabilen aşırı halofilik *Archaea* üyelerini izole etmişlerdir. Bu izolatlardan biri (MSNC 2) *Haloarcula* sp. ve bunlardan üçü ise *Haloferax* sp. (MSNC 4,14,16) olarak tanımlanmıştır. Biyolojik parçalama çalışmaları 40 °C'de, 225 g/l NaCl içeren besiyerinde 30 gün içinde %32-95 (0,5 g/l) heptadekan degradasyonunun gerçekleştiğini göstermiştir. Ayrıca MSNC 14 izolatının fenantreni parçalayabilen belirlenmiştir. Bu çalışmayla ilk kez *Haloarcula* sp. ve *Haloferax* sp. izolatlarının hidrokarbon degradasyonunda rol oynayabildiğini göstermiştir (Tapilatu *et al.* 2010).

2.9.2 Halofilik ve Halotolerant *Bacteria* ile Yapılmış Olan Çalışmalar

Fraze vd. (1993), *Pseudomonas putida* suşundan, protokatekhuat 3,4 dioksijenaz genlerini klonlayarak sekans analizini yapmışlar ve α ve β olmak üzere iki alt üiteden oluştuğunu belirlemişlerdir. (Fraze *et al.* 1993).

Nishihara vd. (1994), fenol parçalayabilen *Pseudomonas putida* BH'nin katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan *phe* B genini karakterize etmişlerdir. Katekol 2,3 dioksijenaz enziminin atık sulardaki düşük konsantrasyondaki katekol türevlerinin muamelesi için uygun olduğu belirlenmiştir (Nishihara *et al.* 1994).

Cenci ve Caldini (1996), farklı aromatik hidrokarbonlara maruz bıraktıkları *Pseudomonas fluorescens* suşunda katekol dioksijenaz enzimlerinin ekspresyonunu araştırmışlardır. Benzoat ve katekol ile inkübe edilen hücrelerde dioksijenaz aktivitesinin en yüksek olduğunu saptamışlardır. Sonuçlar katekol 1.2 dioksijenaz üzerinde model bileşiklerin kullanımının etkili olduğunu göstermiştir. Bu enzimin düşük substrat spesifikliğı göstermesi bunu doğrulamaktadır. İzosiklik bileşiklere göre heterosiklik bileşikler varlığında spesifik enzim aktivitesinde artış olduğu görülmüştür (Cenci and Caldini 1996)

Joshi ve Walia (1996), petrol hidrokarbonları ile kontamine olmuş yeraltı sularından izole etmiş oldukları hidrokarbon parçalayabilen bakterilerin katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodlayan gen bölgeleri ile ilgili yaptıkları çalışmada PCR amplifikasyonlarını ve sekans analizlerini yapmışlardır. PCR amplifikasyonu için *xyIE*, *nahH*, pAW313 primerlerini kullanmışlardır. Katekol dioksijenaz genlerinin korunmuş DNA bölgelerinin sekansları seçilerek belirlenmiştir. Katekol dioksijenaz genlerinin içinde yer alan 30 bç DNA sekansı (ICP313), amplifiye DNA fragmentlerini tespit etmek için prob olarak kullanılmıştır. Bu amplifiye DNA fragmentlerinin özdeşliğı, *StuI*, *BglI* restriksiyon enzimleri ile DNA fragmentlerinin kesilmesi ile doğrulanmıştır. PCR

değerlendirilmesinin spesifikliği çeşitli bakteriyel izolatlardan (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Micrococcus roseus* ATCC 516, *Serratia marcescens* ATCC 60, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Chryseobacterium gleum* ATCC 29896, *Chromatium vinosum* ATCC 17899, *Comamonas testosteroni* ATCC 11996, *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Bacillus subtilis* ATCC 21697, *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17698, *Arthrobacter globiniformis* ATCC 35698, *Pseudomonas putida* mt-2 ATCC 33015, *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 31012, *Pseudomonas putida* ATCC 17484) izole edilen DNA'lar kullanılarak test edilmiştir. Bakteriyel izolatlarda DNA amplifikasyonu sonucunda katekol dioksijenaz aktivitesinden yoksun olduklarını göstermiştir. Aynı zamanda kullandıkları primerler aromatik hidrokarbonlar ile kontamine olmuş bölgelerden izole edilen bakterilerde katekol dioksijenaz genlerini amplifiye etmiştir (Joshi and Walia 1999).

Lee vd. (1995), *Pseudomonas putida* KF715 suşunun kromozomal DNA'sında kodlanmış olan katekol 2,3 dioksijenaz genini klonlayarak nükleotid sekans analizlerini yapmışlardır. Enzim kodlayan gen bölgesinin ATG başlangıç kodunu ile başlayıp TGA terminasyon kodunu ile sonlanmakta olup 924 baz çifti içerdiğini belirlemişlerdir. Bu gen bölgesinden kodlanmış olan polipeptidin moleküler ağırlığı 35 kDa olduğu saptanmıştır. Katekol 2,3 dioksijenazın aminoasit sekansı, aynı suşun TOL plazmitindeki ilişkin enzim ile %94 ve 2,3-dihidroksibifenil 1,2 dioksijenaz ile %25 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Katekol 2,3 dioksijenaz diğer ekstradiol tipteki dioksijenaz enzimleri ile karşılaştırıldığında muhtemelen katalitik rol oynadıkları düşünülen evrimsel bakımdan korunmuş olan aminoasit residülerinin benzer olduğu saptanmıştır (Lee *et al.* 1996).

Oh vd. (1997), *Pseudomonas cepacia* G4'ün TOM plazmitinde kodlanmış olan katekol 2,3 dioksijenazın yapısını araştırmışlardır. Bu gen bölgesi klonlanarak sekans analizi yapılmıştır. Bu enzimin 945 bç olduğu belirlenmiştir. Bu gen bölgesinden kodlanan polipeptidin moleküler ağırlığının ise 35 kDa olduğu ve 314 aminoasit içerdiği

saptanmıştır. *P. putida* UCC2 ve *P. pickettii* PKO1 suşu ile sırasıyla %79-82 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Oh *et al.* 1997).

Kastner vd. (1998), antrasen ve piren parçalayabilen *Sphingomonas paucimobilis* BA2 ve BP9 izolatları topraktan izole etmişlerdir (Kastner *et al.* 1998).

Strachan vd. (1998), *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 suşundan katekol 1,2 dioksijenaz enzimini saflaştırarak karakterize etmişlerdir. Ayrıca bu enzimi kodlayan *catA* gen bölgesini klonlayarak sekans analizini gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda enzimin homodimer yapısında olduğu belirlenmiştir. Her alt ünitenin 0,6 atom Fe içerdiği saptanmıştır. Saflaştırılmış enzimin MS analizlerinden elde edilen verilere göre 31539 Da ve 31588 Da moleküler ağırlığa sahip olduğu belirlenmiştir. Total hücresel proteinin yaklaşık olarak %40'ının katekol 1,2 dioksijenaz ürünü olduğu belirlenmiştir. Enzimin aminoasit sekans yapısının *Arthrobacter* mA3 ile %56 ve *Rhodococcus erythropolis* AN-13 ile yaklaşık %75 oranında benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Fakat gram negatif bakteriler ile karşılaştırıldığında bu oran %35'in altına düşmüştür (Strachan *et al.* 1998).

Buchan vd. (2000), *Roseobacter* grubu toprak mikroorganizmalarının β -ketoadipate yolunu kullanarak aromatik hidrokarbonları parçalayabildiklerini belirlemişlerdir. Altı *Roseobacter* izolatının sekiz aromatik bileşikten (anthranilate, benzoat, p-hidroksibenzoat, salisiklat, vanilat, ferulat, protokatekuat ve kumarat) en az üçünde gelişebildiklerini saptamışlardır. *Roseobacter* grubu izolatlarından dördünün p-hidroksibenzoik asitde gelişebildiğini ve p-hidroksibenzoik asitin, protokatekuat 3,4 dioksijenaz aktivitesini indüklediğini saptamışlardır. *Sagittula stellata* E-37 ve Y3F izolatlarında halka parçalayan enzimi kodlayan *pcaGH* geninin sekans analizleri yapılmıştır. Bunun sonucunda β -ketoadipate metabolik yolunun protokatekuat dalında *pcaGH* geni ile bir arada bulunan ilave genler (*pcaC*, *pcaQ*, *pobA*) belirlenmiştir.

Roseobacter izolatlarının kendi aralarında *Pca* genlerinin sekans analizlerinin diğer toprak bakterilerine kıyasla daha çok benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir (Buchan *et al.* 2000).

Young vd. (2006), *Pseudomonas putida* ATCC 17484 ve *Burkholderia cepacia* PB12'da fenantren parçalanmasında ara metabolitlerin (1-hydroxy-2-naphthoate, salisiklat ve katekol) etkisini araştırmışlardır. 1-hidroksi-2-naftolat, salisiklat ve katekol'ün, her iki izolat içinde fenantren'in biyodegradasyonu üzerine potansiyel indükleyici etkisi olduğu belirlenmiştir. En fazla indüksiyon PB12 izolatında 1-hidroksi-2-naftolat ilave edilmesi ile indüksiyonun 12 kat artmasında görülmüştür (Young *et al.* 2006)

Nicholson ve Fathepure (2003), aerobik koşullar altında halofilik ve halotolerant bakteriler tarafından benzen parçalanmasını araştırmışlardır. Oklahoma'nın petrol üretim bölgelerinden alınan topraktaki zengin halofilik bakteri kültürlerinin benzen, toluen, etilbenzen ve ksileni 1-2 hafta içinde tamamen parçalayabildiklerini belirlemişlerdir. ¹⁴C ile işaretlenmiş benzen ¹⁴CO₂'e dönüşerek benzeni parçaladıkları saptamışlardır. Komünite analizleri sonucunda baskın üyenin *Marinobacter* sp. olduğu belirlenmiştir (Nicholson and Fathepure 2003).

Garcia vd. (2005), aromatik bileşikleri parçalayabilen halofilik bakterilerin katabolik çeşitliliklerini araştırmışlardır. İspanya'nın düşük moleküler ağırlıklı bileşikler ile kontamine olmuş farklı bölgelerinden aldıkları tuzlu su, sediment, toprak örneklerinden bakteri izolasyonu yapmışlardır. Aromatik bileşik olarak benzoik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, sinamik asit, salisiklik asit, fenilasetik asit, fenilpropionik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, *p*-aminosalisiklik asit, *p*-kresol ve fenol kullanmışlardır. Halka parçalayan dioksijenaz enzimlerin varlığını spektrofotometrik olarak belirlemişlerdir. Dejenere primerler kullanarak aromatik halkaları parçalayan dioksijenaz enzimlerini kodlayan gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonlarını yapmışlardır. Sonuçta

izolatların, β -ketoadipate yolundaki katekol 1,2 dioksijenaz ve protokatekhuaat 3,4 dioksijenaz enzimlerini kullanarak aromatik bileşikleri parçalayabildiklerini belirlemişlerdir. Ayrıca *Halomonas organivorans*'da bu iki enzim aktivitesinin olduğunu saptamışlardır. Bu çalışma ılımlı halofilik bakterilerin yüksek tuzluluk koşullarına sahip ortamlarda aromatik bileşikleri parçalayabildiklerini göstermiştir (Garcia *et al.* 2005).

Saxena ve Thakur (2005), *Pseudomonas fluorescens* IST8 izolatu ile yapmış oldukları çalışmada; 4-klorobenzoik asit'i *orto* yolun halka parçalayan enzimlerinden biri olan katekol 1,2 dioksijenaz enzimi ile parçalandığını saptamışlardır. Ham enzim ekstratlarının DEAE-selüloz iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi sonuçları; katekol 1,2 dioksijenazın iki farklı fraksiyona sahip olduğunu göstermiştir. Enzim aktivitesi için optimum pH 6,5'de ve 25°C sıcaklıkta gerçekteştiği belirlenmiştir. Saflaştırılmış proteinlerin SDS-PAGE sonuçları moleküler ağırlıklarının 28-24 kDa olduğunu göstermiştir. Bu durum enzimin dimerik yapısının olduğunu ortaya koymuştur (Saxena and Takur 2005).

Wang vd. (2006), karbon kaynağı olarak benzoik asit kullanarak *Pseudomonas aeruginosa* TKU002 suşundan katekol 1,2 dioksijenaz enzimini saflaştırarak karakterize etmişlerdir. Saflaştırmış oldukları katekol 1,2 dioksijenaz enziminin diğer mikroorganizmalardaki katekol 1,2 dioksijenaz enzimleri ile aynı karakterizasyon gösterdiğini belirlemişlerdir (Wang *et al.* 2006).

Mallick vd. (2007), petrol ile kontamine olmuş topraktan izole ettikleri *Staphylococcus* sp. PN\Y izolatının karbon ve enerji kaynağı olarak fenantreni de kullanabildiği belirlenmiştir. Fenantren biyoderadasyonunda çeşitli metabolitler spektrofotometrik ve kromatografik analizler ile ortaya çıkarılmıştır. Fenantren asimilasyonunun 2 hidroksi-naftoik asit yoluyla gerçekteştiğini belirlemişlerdir. Fenantren metabolizması fenantrenin 1,2 pozisyonunun dioksijenasyonu ile başlamıştır. Fenantren 1,2 diol meta

parçalanmasını takiben 2 hidroksi-naftoik asit daha sonra trans-2,3-diokso-5-(29-hidroksifenil)-penta-4-enoik asit ve bunu takiben salisiklik asit oluşmaktadır. Daha alt metabolik yolda salisiklik asit katekole dönüşür. Daha sonra katekol 2,3 dioksijenaz enzimi tarafından 2-hidroksimukanaldehid'e dönüşmesi ile TCA siklusuna katılmaktadır. Fenantren parçalanmasında rol oynayan bu katabolik genin plazmitde kodlandığını belirlemişlerdir (Mallick *et al.* 2007).

Tao vd. (2007), PAH'lar ile kontamine olmuş olan topraktan izole ettikleri *Sphingomonas sp.* GY2B ile yapmış oldukları çalışmalarda fenantren biyotransformasyonunu incelemişlerdir. Bu izolatın tek karbon ve enerji kaynağı olarak fenantreni etkili bir şekilde kullanabildiği belirlenmiştir. En iyi üremenin pH 7,4'te ve 30 °C sıcaklıkta, 100 mg/l⁻¹ fenanren içeren MSM besiyerinde gerçekleştiği görülmüştür. Eklenen substratın %99,8'inin parçalayabildiği saptanmıştır. Düşük konsantrasyonda glukoz ilavesinin (10-200 mg/l⁻¹) üremeyi teşvik etmesine rağmen >500 mg/l⁻¹ glukoz ilavesinin üremeyi inhibe ettiği belirlenmiştir (Tao *et al.* 2007).

Cao vd. (2008), *Pseudomonas putida* P8 izolatı ile yapmış oldukları çalışmalarda yüksek konsantrasyonlarda benzoat parçalanmasında *orto* veya *meta* parçalama yolu indüksiyonunu araştırmışlar ve katabolik enzimlerin kütle spektrofotometresi ile identifikasyonlarını yapmışlardır. Benzoat veya suksinat ile birlikte üretilen *Pseudomonas putida* P8 izolatından elde edilen proteinler 2-D jel elektroforezinde yürütülmüştür. Benzoat ile üretilen hücrelerde 8 farklı protein belirlenmişken bu proteinler suksinat ile üretilen hücrelerde belirlenmemiştir. MS identifikasyonu ile 8 proteinin hepsi benzoat degradasyonunda rol olan enzimler olarak belirlenmiştir. Bunlar arasında Cat B (EC 5.5.1.1), Pca I (EC 2.8.3.6) ve Pca F (EC 2.3.1.174) *ortho* parçalama enzimleri olarak ve Dmp C (EC 1.2.1.32), Dmp D (EC 3.1.1.-), Dmp E (EC 4.2.1.80), Dmp F (EC 1.2.1.10), Dmp G (EC 4.1.3.) ise *meta* parçalama yolu enzimleri olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak benzoat ile üretilen *Pseudomonas putida* P8 izolatının *orto* ve *meta* parçalama yolundaki katekol 1,2 dioksijenaz ve katekol 2,3 dioksijenaz enzim aktiviteleri gösterdiği belirlenmiştir (Cao *et al.* 2008).

Arulazhagan ve Vasudevan (2009), Hindistan (Tamilce)'nin yedi farklı bölgesinden topladıkları deniz suyu örneklerinden PAH parçalayabilen mikroorganizmaları izole etmişler ve bu izolatları *Ochrobactrum* sp., *Enterobacter cloacea*, *Stenotrophomonas maltophilia* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların hem düşük hem yüksek molekül ağırlıklı PAH'ları (fenantren, florin, piren ve benzo [e] piren) metabolize edebildiklerini belirlemişlerdir. Aynı zamanda bu bakterilerin ham petrol ile kontamine olmuş tuzlu atık sularda mevcut olan PAH'ları parçalayabildikleri saptanmıştır. Bu bakteriyel birlikler tuzlu atık sulardaki yüksek molekül ağırlıklı PAH'ları %80 ve düşük molekül ağırlıklı PAH'ları ise %100 oranında parçalayabildikleri görülmüştür (Arulazhagan and Vasudevan 2009).

Song (2009), aromatik hidrokarbon parçalayabilen 15 bakteri izole ederek 16 S rRNA analizi tanımlanmıştır. Bu bakterilerin aromatik hidrokarbonları β -ketoasit metabolik yolunun katekol veya protokatekhat dalaıyla parçalayabildikleri, rothera reaksiyonu ile belirlenmiştir. Protokatekhat 3,4 dioksijenaz ve katekol 1,2 dioksijenaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. *Pseudomonas fluorescens* izolatında protokatekhat 3,4 dioksijenaz aktivitesinin, *Microbacterium esteraromaticum*'da ise katekol 1,2 dioksijenaz aktivitesi diğer izolatlardan daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Song 2009).

Urszula vd. (2009), *Stenotrophomonas maltophilia* suşu üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda monosiklik hidrokarbonları parçalayabilen çeşitli dioksijenaz enzimlerini izole ederek karakterize etmişlerdir. Farklı *Stenotrophomonas maltophilia* suşları arasında KB2 izolatında ilk kez üç farklı dioksijenaz enzim aktivitesi saptanmıştır. Benzoat ve katekol ile üreyen hücrelerde katekol 1,2 dioksijenaz aktivitesi belirlenmiştir. Fenol ile inkübe edilen hücrelerde ise katekol 2,3 dioksijenaz aktivitesi saptanmıştır. *p*-hidroksibenzoik asit, protokatekhat ve vanilik asit ile inkübasyon sonucunda ise protokatekhat 3,4 dioksijenaz enzim aktivitesi belirlenmiştir (Urszula et al. 2009).

Zhao vd. (2009), oksijenli koşullar altında halofilik bakteriyel birlikler tarafından fenatren biyodegradasyonunu araştırmışlardır. Petrol ile kontamine olmuş %10 tuzlulukta tuzlu topraktaki halofilik bakteriyel birliklerin %5, 10, 15 tuzluluk oranında fenantreni parçalayabilmelerine rağmen %0,1 ve %20 tuzluluk oranında parçalayamadıkları belirlenmiştir (Zhao *et al.* 2009).

Wu vd. (2010), *Flavobacteria* FCN2 izolatının fenantreni parçalayabildiğini göstermişlerdir (Wu *et al.* 2010).

Arulazhagan ve Vasudevan (2011), deniz suyundan izole etmiş oldukları bir halotolerant bakteri izolatı olan *Ochrobactrum* sp.VA1'in tuzlu koşullar altında antrasen ve piren parçalayabilme yeteneğini belirlemişlerdir. PAH degradasyonunu arttırmak için glukoz ve sodyum sitrat ilave karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. VA1 izolatının ilave bir karbon kaynağı olmaksızın antraseni %73 oranında ve pireni %66 oranında parçalayabildiğini saptanmıştır. Glukoz ve sodyum sitrat varlığında PAH degradasyonunun arttığı görülmüştür. Karbon kaynağı olarak glukoz ilave edildiğinde dört günde antrasenin %87 ve pirenin %83 oranında kullanıldığı belirlenmiştir. Karbon kaynağı olarak sodyum sitrat ilave edildiğinde ise dört günde antrasenin %81 ve pirenin %76 oranında kullanıldığı saptanmıştır. Üre alternatif nitrojen kaynağıdır ve PAH kaynağına ilave edildiğinde PAH kullanım oranı dört günde antrasen için %88 ve piren için %84 olarak belirlenmiştir. Nitrojen kaynağı olarak sodyum sitrat ilave edildiğinde ise PAH kullanım oranının artmadığı görülmüştür. Fenotipik ve filogenetik analizler PAH kullanan halotolerant bakteri izolatının *Ochrobactrum* sp. olduğunu göstermiştir (Arulazhagan and Vasudevan 2011).

Chang vd. (2011), petrol ile kontamine olmuş bölgelerden aldıkları sediment ve toprak örneklerinden PAH biyoremediasyonu için potansiyel olarak kullanılacak *Staphylococcus* sp. KW-07, *Pseudomonas* sp. CH-11, *Ochrobactrum* sp. CH-19 olmak üzere üç suş izole etmişler ve PAH degradasyonuna aracılık eden katekol dioksijenaz geninin (*nahH* genleri) *Staphylococcus* sp. KW-07 ve *Ochrobactrum* sp. CH-19

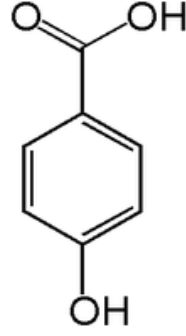
izoatlarında kromozomlarda, *Pseudomonas* sp. CH-11 izolatında ise plasmid DNA'sında yer aldığı belirlenmiştir. Tüm izolatlar benzer optimum sıcaklıkta (25°C) ve pH'da (7,0) tek karbon kaynağı %0.1 fenantren olan Mineral salt medium (MSM) besiyerinde üretilmiştir. *Pseudomonas* sp. CH-11 ve *Staphylacoccus* sp. KW-07 üç gün içinde fenantrenin %90'ını parçalayabilirken *Ochrobactrum* sp. CH-19 izolatının ise yedi gün içinde fenantrenin %90'ını parçalayabildiği saptanmıştır. Üç izolat arasında fenantren degradasyonunda en etkili suşun, *Staphylacoccus* sp. KW-07 olduğu görülmüştür (Chang *et al.* 2011).

Lease vd. (2011), kontamine olmuş ve olmamış olan kaynaklardan piren parçalayabilen *Mycobacterium* spp.'ler izole edilerek identifikasyonlarını yapmışlardır. Zenginleştirilmiş kültürlerden piren'i hızlı bir şekilde degrade edebilen üç izolat belirlemiştir (Lease *et al.* 2011).

2.10 Çalışmada Kullanılan PAH'lar

2.10.1 *p*-hidroksibenzoik asit

p-hidroksibenzoik asit bir aromatik halka içermektedir. Benzoik asitin fenolik bir türevidir. 214-217 °C arasında erimektedir. Sucul organizmalar üzerinde düşük toksisite göstermektedir. Karasal organizmalar üzerine etkisi ile ilgili veri bulunmamaktadır. Deri ve göz üzerinde iritasyona sebep olur. *Haloarcula* sp. D1 halofilik *Archaea* suşu *p*-hidroksibenzoik asitini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiği belirlenmiştir. Bu *p*-hidroksibenzoik asiti metabolize edebilen ilk *Archaea* suşudur. Buna rağmen *Haloferax* sp. D1227 suşu bu bileşikleri parçalayamamaktadır (Emerson *et al* 1994). *p*-hidroksibenzoik asitin yapısı Şekil 2.7'de gösterilmiştir (Int. Kyn. 5).



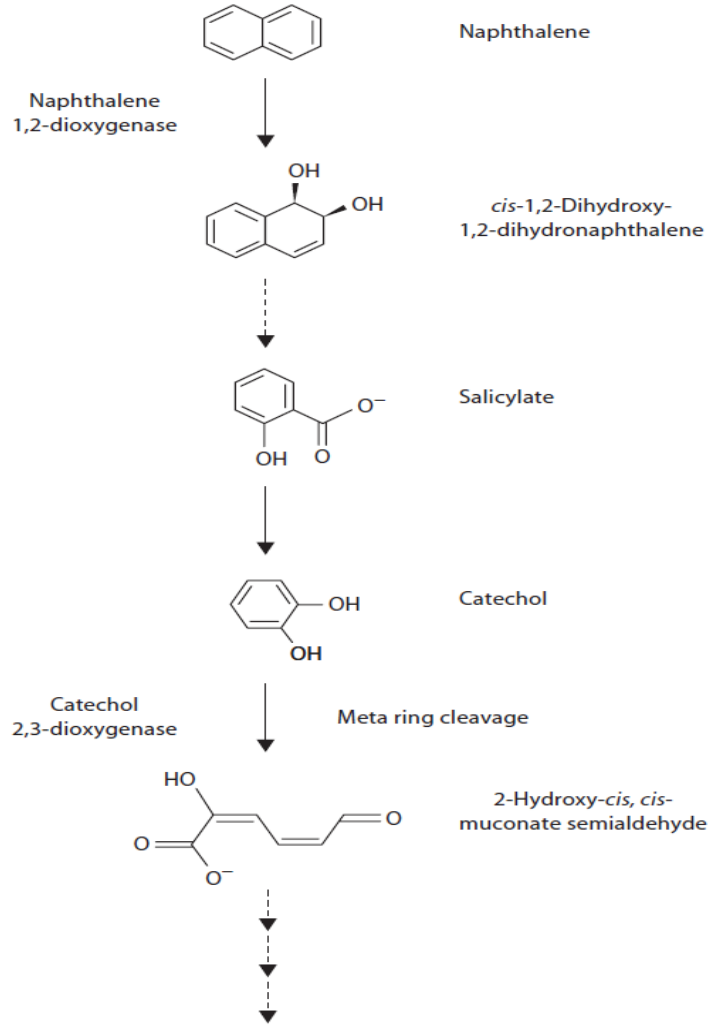
Şekil 2.7 *p*-hidroksibenzoik asitin yapısal şekli (Int. Kyn. 5).

2.10.2 Naftalen

Kimyasal formülü $C_{10}H_8$ ve moleküler kütlesi 128,16 g/mol olan naftalen, bisiklik aromatik hidrokarbondur. Saf naftalen, beyaz, 0,078 mmHg buhar basıncında oda sıcaklığında suda çözünmeyen bir katıdır. Naftalen petrol ya da katran kömür fraksiyonu ve distilasyonu ile üretilir (Bruce *et al.* 1998). Naftalen, gastro- intestinal sistem, solunum sistemi ve deri yolu ile absorbe edilir. Absorbe edilmiş naftalen ve /veya metabolitleri vücut içerisinde kan yolu ile karaciğer ve diğer organlara geçer. Absorbe edilen naftalenin büyük çoğunluğu, çeşitli formlarda metabolitler, idrarla ve küçük bir miktarı dışkı ile elimine edilir Naftalen; deri, göz, burun ve boğazı irrite edebilir. Karaciğer, böbrek ve merkezi sinir sistemini etkileyebilir, ciddi vakalarda komaya ve ölüme neden olabilir, sarılık, dermatit ve damarlarda hemoliz meydana getirebilir (IPCS INCHEM 1983). IARC; naftalenin hayvanlarda kansere neden olduğuna dair yeterli deliller olduğundan da karsinogenik olabileceğini bildirmiştir, ancak insanlar üzerine etkileri hakkında yeterli bilgi yoktur (Int. Kyn. 1)

Naftalen, bakterilerin PAH'ları parçalayabilme yeteneklerinin incelenmesi için model bir bileşik olarak sıklıkla kullanılmaktadır çünkü naftalen en basit ve en çok çözünebilen PAH'dır. Bugüne kadar, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* ve *Streptomyces*

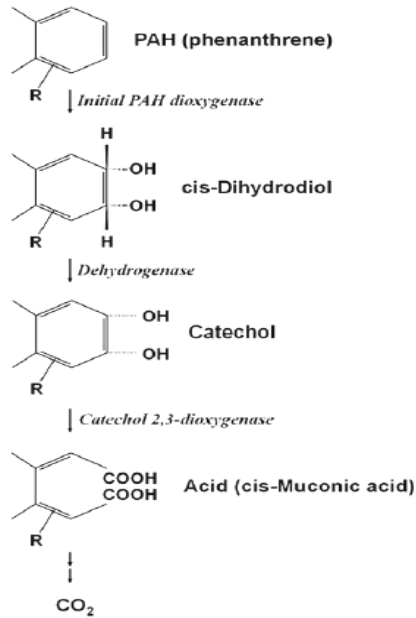
genusları gibi naftaleni karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen pek çok bakteri izole edilmiştir (Seo *et al.* 2009). Naftalenin parçalanması naftalen dioksijenazın enzimatik atığıyla başlamaktadır. Naftalenin aerobik bakteriyel parçalama sürecindeki muhtemel metabolik yolu Şekil 2.8’de gösterilmiştir.



Şekil 2.8 Naftalenin bakteriler tarafından aerobik degradasyonundaki muhtemel metabolik yol (Borgne *et al.* 2008)

2.10.3 Fenantren

Fenantren, yüzün üzerinde değişik kombinasyona sahip PAH' lardan, en çok araştırılan yaklaşık on beş kimyasal maddeden bir tanesidir. Karbon ve hidrojenle oluşan bu organik bileşiklerin, farklı birçok türevidir. Fenantrenin bakteriler tarafından aerobik degradasyonundaki muhtemel metabolik yol Şekil 2.9'da gösterilmiştir. (Chang 2011). Fenantren karsinojenik ve mutajenik olmamasına rağmen diatomlar, yumuşakçalar kabuklular ve balıklara üzerinde toksik etki göstermiştir. İki ya da daha fazla halkanın orta konumlarında ki iki karbon atomunu ortaklaşa kullanarak, oluşan hidrokarbonlar arasında yer alırlar. Fenantren üç aromatik halkaya sahiptir. Fenantrenin bakteriyel degradesyonu geniş oranda çalışılmıştır. Fenantreni karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen *Acidovorax*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* gibi çeşitli bakteriler izole edilmiştir (Seo et al 2009).

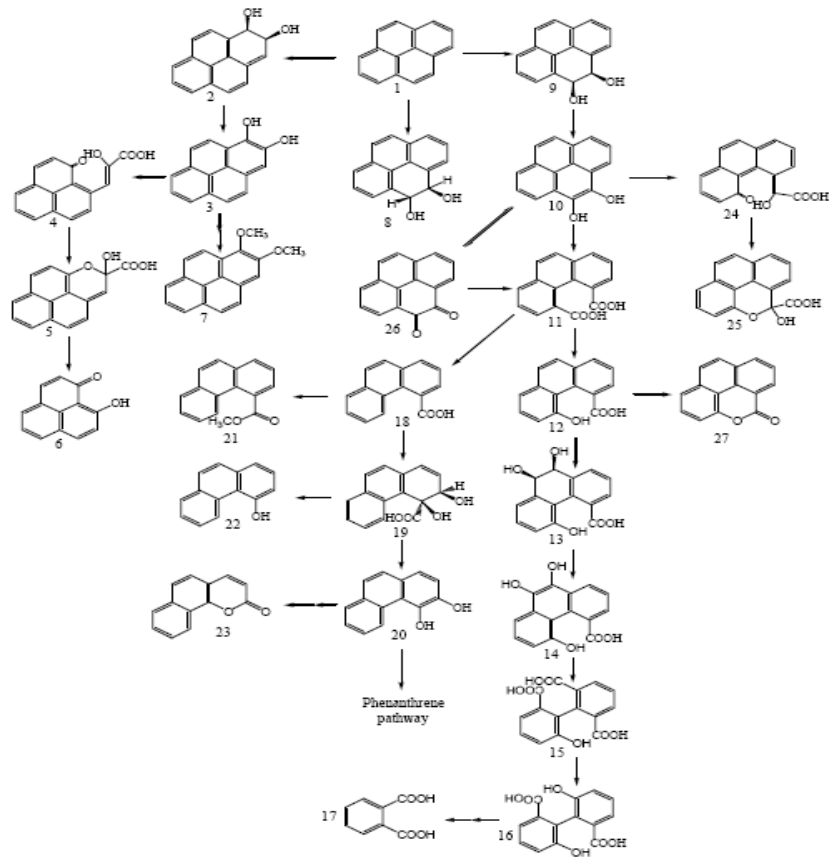


Şekil 2.9 Fenantrenin bakteriler tarafından aerobik degradasyonundaki muhtemel metabolik yol (Chang 2011)

2.10.4 Piren

Piren dört halkalı bir bileşiktir. Saf piren, sarı renkte oda sıcaklığında suda çözünmeyen bir katıdır. Erime noktası 110 °C'dir. Çok halkalı PAH'ların degradasyon mekanizmasının incelenmesi için iyi bir modeldir. Şekil 2.10'da bakteriler tarafından piren degradasyonundaki genel metabolik yol gösterilmiştir.

Bugüne kadar piren parçalayabilen pek çok bakteri izolatu çalışılmıştır. *Mycobacterium* pireni karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıp parçalayabilen bir cinstir. Diğer piren parçalayabilen suşlardan bazıları, *Rhodococcus* sp., *Bacillus cereus*, *Burkholderia cepacia*, *Cycloclasticus* sp. P1, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Sphingomonas* sp. VKM B-2434, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*'dır (Seo et al 2009).



Şekil 2.10 Bakteriler tarafından piren degradasyonundaki genel metabolik yol (Su-Seo *et al.* 2009). 1, piren; 2, -piren-cis-1,2-dihidrodiol; 3, piren-1-2-diol; 4, 2-hidroksi-3-propenik asit; 5, 2-hidroksi-2-1-okso-piren-2-karboksilik asit; 6, 4-hidroksiperinaftanon; 7, 1-2-dimethosipiren; 8- piren-trans-4,5-dihidrodiol; 9, piren-cis-4,5-dihidrodiol; 10, piren-4,5-diol; 11, fenantren-4,5, dikorboksilik asit; 12, 4-karboksifenantren-5-diol; 13, 4-karboksi-5-hidroksi-fenantren; 14, 4-karboksifenantren; 15, 2,6,6-trikarboksi-2-hidroksibifenil; 17, pitalik asit; 18, 4-fenantroik asit; 19; 3,4-dihidroksi-3,4-dihidro-fenantren-4-karboksilik asit; 20, fenantren 3,4-diol; 21, 4-fenantroik asit metil ester; 22, 4-hidroksi fenantren; 23, 7,8-benzokaumarin; 24, 2-hidroksi asetik asit; 25, 5-hidroksi-5H-4-okso-piren-5-karboksilik asit; 26, piren-4,5-dion; 27,4-okso-piren-5.

3. MATERYAL ve METOD

3.1 MATERYAL

3.1.1 Çalışmada Kullanılan İzolatlar

Bu çalışmada kullanılan 17 adet halofilik ve halotolerant prokaryotik mikroorganizma daha önceki bir çalışmada izole edilmiş olup identifikasyonları 16S rDNA dizi analizi ile yapılmıştır. İzolatlar; Prof. Dr. Kıymet Güven (Eskişehir Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi) tarafından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan izolatlar; C-12, C-15, C-18, C-19, C-22, C-23, C-24, C-27, C-29, C-37, C-41, C-43, C-46, C-50, C-51, C-52 ve CH kod numarasına sahip izolatlardır. Bunlardan CH izolatu dışındaki izolatlar İzmir Çamaltı Tuzla'sından izole edilmiştir (AÜAF Proje No: 071018, Proje Adı: İzmir-Çamaltı Tuzlası Halofilik Mikroorganizmalarının İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Biyoteknolojik Potansiyellerinin Araştırılması).

3.1.2 Kullanılan Besiyerleri

%5 Deniz Suyu (SW) (g/l)

NaBr.....0,130 g

HNaCO₃.....0,033 g

KCl.....1,0 g

CaCl₂.....0,145 g

MgSO₄.7H₂O.....9,898 g

MgCl₂.6H₂O.....6,913 g

NaCl.....39,0 g

Maya ekstraktı.....1,0 g

Agar.....20,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra pH 7,0'ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985).

%10 Deniz Suyu (SW) (g/l)

NaBr.....0,26 g

HNaCO₃.....0,067 g

KCl.....2,0 g

CaCl₂.....0,289 g

MgSO₄.7H₂O.....19,797 g

MgCl₂.6H₂O.....13,827 g

NaCl.....78,0 g

Maya ekstraktı.....0,2 g

Agar.....20,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra pH 7,0'ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985).

%15 Deniz Suyu (SW) (g/l)

NaBr.....	0,39 g
HNaCO ₃	0,1 g
KCl.....	3,0 g
CaCl ₂	0,434 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	29,695 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	20,74 g
NaCl.....	117,0 g
Maya ekstraktı.....	3,0 g
Agar.....	20,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra pH 7,0'ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985).

%20 Deniz Suyu (SW) (g/l)

NaBr.....	0,52 g
HNaCO ₃	0,134 g
KCl.....	4,0 g
CaCl ₂	0,578 g

MgSO₄.7H₂O.....39,594 g

MgCl₂.6H₂O.....27,654 g

NaCl.....156,0 g

Maya ekstraktı.....4,0 g

Agar.....20,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra pH 7,0'ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985).

%25 Deniz Suyu (SW) (g/l)

NaBr.....0,65 g

HNaCO₃.....0,167 g

KCl.....5,0 g

CaCl₂.....0,723 g

MgSO₄.7H₂O.....49,492 g

MgCl₂.6H₂O.....34,567 g

NaCl.....195,0 g

Maya ekstraktı.....5,0 g

Agar.....20,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra pH 7,0'ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985).

%30 Deniz Suyu (SW) (g/l)

NaBr.....	0,78 g
HNaCO ₃	0,2 g
KCl.....	6,0 g
CaCl ₂	0,868 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	59,39 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	41,48 g
NaCl.....	234,0 g
Maya ekstraktı.....	6,0 g
Agar.....	20 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra pH 7,0'ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985).

%25 lik Tuzlu Su Çözeltisi (g/l)

NaBr.....	0.128 g
HNaCO ₃	0.14 g
KCl.....	0.95 g
CaCl ₂	3.32 g
NaCl.....	234,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985)

%30 luk Tuzlu Su Çözeltisi (g/l)

MgSO₄.7H₂O.....35 g

MgCl₂.6H₂O.....30 g

NaBr.....0.8 g

HNaCO₃.....0.2 g

KCl.....7,0 g

CaCl₂.....0.5 g

NaCl.....240,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlanarak,1M Trisma-Base ile pH 7,5'a ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Int. Kyn. 3).

Kazein Besiyeri (g/l)

CaCl₂.2H₂O.....0,2 g

KCl.....2,0 g

Maya ekstraktı.....5,0 g

Sodyum tri- sitrat.....3,0 g

Kazein.....20,0 g

MgCl₂.6H₂O.....20,0 g

NaCl.....250,0 g

Agar.....20,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra pH 7,0 ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Beşe 1974, Harley and Prescott 1993, Gonzales *et al.* 1978, Oren *et al.* 2002a, Norris and Ribbons 1971).

Tween 80 Besiyeri (g/l)

CaCl₂.2H₂O.....1,0 g

KCl.....2,0 g

Tween 80.....1,0 g

Maya ekstraktı.....5,0 g

Sodyum tri- sitrat.....3,0 g

MgSO₄.7H₂O.....20,0 g

Agar.....20,0 g

NaCl.....250,0 g

Agar.....20,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra pH 7,0'ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Norris and Ribbons 1971).

Selüloz Besiyeri (g/l)

CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,2g
KCl.....	2,0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	20,0 g
Kazamino asit.....	1,0 g
Maya ekstraktı.....	1,0 g
Karboksi metil selüloz.....	2,0 g
NaCl.....	250,0 g
Agar.....	20,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlanmış ve besiyeri içine karboksimetil selüloz ilave edilerek kaynatılmıştır. Karboksimetil selüloz çözüldükten sonra besiyerinin pH'ı 7,0'ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Harley and Prescott 1993).

İndol Besiyeri (g/l)

CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,2 g
KCl.....	2,0 g
Tripton.....	10,0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	20,0 g
NaCl.....	250,0g

Agar.....20,0g

Distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra besiyerinin pH'ı 7,0'ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklav olarak steril edilmiştir (Harley and Prescott 1993).

Jelatin Besiyeri

CaCl₂.2H₂O.....0,2 g

KCl.....2,0 g

Maya ekstraktı.....5,0 g

Tripton.....5,0 g

Jelatin.....20,0 g

MgCl₂.6H₂O.....20,0 g

NaCl.....250,0 g

Agar.....20,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Besiyerinin pH değeri 7,0'ye ayarlanarak 121 °C'de, 1.06 atm. basınçta, 15 dk steril edilmiştir (Beşe 1974, Harley and Prescott 1993, Gonzales *et al.* 1978).

Nişasta İçeren Brown (1963) Besiyeri (g/l)

Maya ekstraktı.....5,0 g

C₆H₅Na₃O₇5H₂O.....3,0 g

MgSO ₄ 7H ₂ O.....	20,0 g
KCl.....	2,0 g
Nişasta.....	10,0 g
Agar.....	20,0

Distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. NaCl değerleri %15 olacak şekilde ortama ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri 7,0 olarak 1 M HCl veya 0,5 M NaOH ile ayarlanmış ve hazırlanan cözelti 121 °C, 1.06 atm basınçta, 15 dk steril edilmiştir. Nişasta içeren katı Brown (1963) besiyeri hazırlamak için ortama 20 g/l agar ilave edilmiştir (Amoozegar *et al.* 2003).

Skimmed Milk (Yağsız Süt) Tozu İçeren Besiyeri (g/l)

Glikoz.....	1,0 g
Pepton.....	2,0 g
Maya ekstraktı.....	5,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,2 g
Yağsız süt tozu.....	5,0 g
Agar.....	20,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. NaCl değerleri %15 olacak şekilde ortama NaCl ilave edilmiştir. Besiyerinin pH'ı 0,5 M HCl ile 7,0'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan cözelti 121°C, 1.06 atm. basınçta, 15 dk steril edilmiştir. Yağsız süt tozu ve glikoz 121 °C' de, 1.06 atmosfer basınçta, 5 dk steril edilmiştir. Ayrı olarak steril edilen cözelti, yağsız süt

tozu ve glikoz 45-50 °C'ye kadar soğutulmuş bazal ortama aseptik koşullarda ilave edilip iyice çalkalanmıştır. Yağsız süt tozu içeren katı Brown (1963) besiyeri hazırlamak için ortama 20 g/l agar ilave edilmiştir (Denizci vd. 2004).

Birchwoodksilan İçeren Brown Besiyeri (g/l)

Maya ekstraktı.....	5,0 g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .5H ₂ O.....	3,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	20,0 g
KCl.....	2,0 g
Birchwoodksilan.....	10,0 g
Agar.....	20,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. NaCl değerleri %15 olacak şekilde ortama ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri 7,0 olacak şekilde hazırlanmış ve bu çözelti 121 °C, 1.06 atm. basınçta, 15 dk steril edilmiştir. Birchwoodksilan içeren katı Brown (1963) besiyeri hazırlamak için ortama 20 g/l agar ilave edilmelidir. Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, ksilanın homojen olarak dağılmasını sağlamak amacıyla 2 dk boyunca sonikatörde homojenize edilmiştir (Gessesse and Gashe 1997).

Şeker Testleri için Kullanılan Besiyeri

NaBr.....	0,65 g
HNaCO ₃	0,167 g

KCl.....	5,0 g
CaCl ₂	0,723 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	49,492 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	34,567 g
NaCl.....	195,00 g
Şeker.....	5,0 g

Distile su ile 1 L'ye tamamlanarak pH 7,0'ye ayarlanmıştır. %25 SW besiyerine; fruktoz, maltoz, mannitol, sukroz, galaktoz ve rafinoz son konsantrasyonu 5 g/l olacak şekilde filtreden geçirilmiş ve besiyerine eklenmiştir ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985).

Mineral Tuz Besiyeri (MSM)(g/l⁻¹)

(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl.....	23,84 g
MgCl ₂ .6 H ₂ O	2,07 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	3,14 g
CaCl ₂	0,22 g
HNaCO ₃	0,03 g
KCl.....	0,63 g

NaBr.....0,07 g

Bu miktarlar 100 ml distile su için verilmiştir. Bu besiyere 1 ml iz element solüsyonu ilave edilip besiyerinin pH'ı KOH ile pH 7,2'ye ayarlanmıştır (Zhao *et al.* 2009).

İz element Solüsyonu(mg/l⁻¹)

Ca(NO₃)₂.4H₂O.....800mg

FeSO₄. 7H₂O.....400 mg

CuSO₄.5H₂O.....80 mg

ZnSO₄.7H₂O.....40 mg

MnSO₄.4H₂O.....40 mg

NaMO₄. 2H₂O.....8 mg

H₃BO₃.....6 mg

Distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir (Zhao *et al.* 2009).

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler, Ayıraçlar ve Boyalar

Kovaks Ayıracı

Para-dimetilaminobenzaldehit.....5,0 g

İzoamil alkol.....75 ml

Hidroklorik asit.....25 ml

Önce aldehit alkolde eritilmiş sonra yavaş yavaş asit ilave edilmiştir (Harley and Prescott 1993).

Para- aminodimetilanilin monohidroklorid Ayıracı

Para- aminodimetilanilin monohidroklorid.....1,0 g

Distile su.....100 ml

Para- aminodimetilanilin monohidroklorid distile su içerisinde iyice çözülmüştür.

Kongo Kırmızısı Çözeltilisi

Kongo kırmızısı.....0,1 g

Distile su.....100 ml

Kongo kırmızısı distile su içerisinde iyice çözüldükten sonra selüloz hidroliz deneylerinde kullanılmıştır (Harley and Prescott 1993).

3.1.3 Çalışmada Kullanılan PAH'lar

p-hidroksibenzoik asit, Sigma-Aldrich,, 0001400812

Naftalen, Sigma-Aldrich, 184500

Fenantren, Sigma-Aldrich, MKBB 7303

Piren, Sigma-Aldrich,, 522012

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Nüve soğutmalı inkübatör ES110
- Heidolph unimax 1010 inkübatör
- Jenway 6305 Uv/Vis spektrofotometre
- Mikro 200R hettich santrifüj
- Bandelin sonopulus UV-2070 sonikatör
- Hot plate benchmark
- A3 Applied biosystems 2720 thermal cyclers
- Elektroforez NYX technic
- Eelektroforetik jel görüntüleme sistemi NYX technic iluminyx 1D21226AB
- Sartorius hassas terazi
- Nüve FN500 sterilizatör
- Nüve OT 4060 Otoklav
- Hanna instruments H1221 pH metre

3.2 METOD

3.2.1 PAH Parçalayabilen İzolatların Belirlenmesi

PAH parçalayabilen izolatların belirlenmesi için Zhao vd. (2009), yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, PAH parçalanmasının belirlenmesi için kullanılan basit ve hızlı bir yöntemdir (Zhao *et al.* 2009). Bu yöntemde %3-5 (w/v) agarlı Mineral Tuz Besiyeri (MSM) ortamı %20 NaCl tuz konsantrasyonu olacak şekilde hazırlanmıştır. Steril kabinde petrideki besiyerlerin yüzeyine selüloz asetat filtre kağıtları 55 mm disk

çapında olacak şekilde kesilmiş ve steril bir pens yardımıyla kenarlarından tutularak yerleştirilmiştir. Bu işlem sırasında hiç hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. *p*-hidroksibenzoik asit, naftalen, fenantren 4mg/ml⁻¹ ve piren 2mg/ml⁻¹ konsantrasyonunda olacak şekilde etil-eter içinde çözülmüştür. Hazırlanan bu PAH solüsyonlarından 1'er ml selüloz asetat filtre kağıtlarının yüzeyine emdirilerek steril bir cam yayıcı kullanılarak hızlı ve dikkatli bir şekilde yayılmıştır. Daha sonra petri kapakları ile petrilerin %90'ı kapanacak şekilde kapatılarak steril kabinde etil eterin buharlaşması sağlanmıştır. Yaklaşık 5 dk sonra petrilerin kapakları tamamen kapatılmıştır. Daha önce %20 SW besiyerinde 37 °C'de üretilen (OD₆₀₀ nm'de yaklaşık 0,6-0,7) 17 izolatdan her biri her PAH için ayrı ayrı 1'er ml selüloz asetat filtre kâğıtlarına emdirilerek yayılmıştır. Petriler 37 °C'de inkübasyona bırakılarak üremeleri her gün bir ay süresince kontrol edilmiştir. Negatif kontrol grubu için bu işlemler selüloz asetat filtre kâğıtlarına PAH'lar emdirilmeden gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol grubu için ise %20 SW besiyerine izolatlardan ekim yapılmıştır. Bu işlemler üç kez tekrarlanmıştır.

İnkübasyon sonrasında izolatların filtre kâğıtları üzerinde ve kenarlarında üremesi, bu izolatların PAH'ları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak parçalayabildiklerini gösterirken hiç üreme göstermeyen izolatların ise PAH'ları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak parçalayamadıklarını göstermektedir (Zhao *et al.* 2009).

3.2.2 İzolatların Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Gram Boyama

Aşırı derecede halofilik mikroorganizmaların gram boyaması Dussault (1955)'e göre yapılmıştır. Modifiye edilmiş bu boyama yönteminde, lam üzerine yayılan örnek önce %2'lik asetik asit ile 5 dk muamele edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra %0,25'lik kristal viyole ile 3 dk boyanmış, lugol ile 1 dk, alkol ile 10

saniye ve son olarak da safranin ile 1 dk boyanmıştır. Ara yıkama işlemleri için %25'lik NaCl çözeltisi kullanılmıştır (Int. Kyn. 4).

İzolatların pigmentasyonları %20 SW besiyerinde 37 °C'de 7 gün inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir.

İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu pH Değerinin Belirlenmesi

İzolatlar pH'ı 5, 7, 9 ve 11'e ayarlanmış %25 SW besiyerlerine ekildikten sonra 37 °C'de 7 gün etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir izolatın farklı pH'lardaki gelişme durumu belirlenmiştir (Tindall 1992, Anton *et al.*2002).

İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu Sıcaklığın Belirlenmesi

İzolatlar %25 SW agarlı besiyerlerine ekildikten sonra 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C ve 55 °C'de 7 gün etüvlerde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir izolatın farklı sıcaklıklardaki gelişme durumları belirlenmiştir (Anton *et al.* 2002).

İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu NaCl Miktarının Belirlenmesi

İzolatlar %5, %10, %15, %20, %25 ve %30'luk NaCl içeren %20 SW besiyerlerine ekilmiş ve 37 °C'de inkübasyon sonrası gelişme durumları incelenmiştir (Anton *et al.* 2002).

İzolatların Farklı Karbon ve Şeker Kaynaklarını Kullanma Durumunun Belirlenmesi

İzolatların farklı karbon ve şeker kaynaklarını kullanabilme yeteneklerinin ortaya koyulması amacıyla %25 SW besiyerine glukoz, fruktoz, maltoz, mannitol, sükroz ve rafinoz son konsantrasyonu 5 g/l olacak şekilde eklenerek 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üremenin olup olmadığına göre değerlendirilmiştir (Tindall 1992, Anton *et al.* 2002).

Jelatin Hidrolizi

İzolatların jelatinli besiyerine ekimleri yapılarak 40°C’de 7 gün etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Kolonilerin etrafında belirgin zonların görülmesi jelatin hidrolizi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Beşe 1974, Harley and Prescott 1993, Gonzales *et al.* 1978).

Katalaz Testi

İzolatların %25’lik SW agarlı besiyerine ekimleri yapılmıştır. %25’lik SW agarlı besiyerinde gelişen koloniler üzerine birkaç damla %3 H₂O₂ eriyiği damlatılmıştır. Besiyeri üzerine gaz kabarcıklarının meydana gelmesi pozitif katalaz reaksiyonu, gaz kabarcıklarının gözlenmemesi ise negatif katalaz reaksiyonunu olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 1993).

Kazein Hidrolizi

İzolatlar Kazein besiyerine ekilerek 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası petri kutuları siyah bir zemin üzerinde incelenmiştir. Üreme bölgelerinin etrafındaki şeffaf bölgeler kazein pozitif olarak değerlendirilmiştir (Norris and Ribbons 1971, Beşe 1974, Gonzales *et al.* 1978, Harley and Prescott 1993, Oren *et al.* 2002a).

Oksidaz Testi

İzolatlar %25 SW agarlı besiyerine ekimleri yapılarak 37 °C'de inkübe edilmiştir. Üreyen kolonilerden öze ile bakteriler alınarak para-aminodimetilanilin monohidroklorid ayracı dökülmüş olan filtre kâğıdı üzerine sürülmüştür. 5-10 saniye içinde mor rengin meydana gelmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 1993).

Tween 80 Hidrolizi

İzolatların Tween 80 besiyerine ekimleri yapılmıştır. 40 °C'de 30 gün etüvde beklendikten sonra koloniler etrafındaki şeffaf zonlar incelenmiştir. Üreme bölgelerinin etrafındaki şeffaf bölgeler Tween 80 pozitif olarak değerlendirilmiştir (Norris and Ribbons 1971).

DNAaz Testi

Kültürler, DNAaz agar besiyerine azaltma yöntemi ile ekimleri yapılarak 40 °C'de 7 gün etüvde inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda üzerlerine 1 N HCl dökülmüştür ve

kolonilerin etrafında berrak bir bölge gözlenmesi, DNAaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 1993).

İndol Testi

İzolatların tripton besiyerine ekimleri yapılarak, 40 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tüplere 0,5 ml kovaks ayırıcı ilave edildikten sonra kırmızı renk oluşumu indol üretimi için pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 1993).

Nişasta Hidrolizi

İzolatların %15 NaCl içeren ve içermeyen nişastalı Brown (1963), besiyerine ekimleri yapılarak 7 gün 37 °C'de inkübe edilmiştir. Nişasta içeren katı besiyerine inoküle edilen amilaz üreticisi izolatlar %0,3 I₂-%0,6 KI solüsyonu ile boyanmıştır. Yapılan test sonrasında kahverengiye boyanan besiyeri üzerinde izolatların nişastayı parçaladığı bölgeler renksiz olarak kalmıştır. Renksiz ve şeffaf olarak göze çarpan koloni etrafındaki bölgelere bakarak nişastanın parçalandığına ve koloniyi oluşturan izolatların amilaz enzimi ürettiğine karar verilmiştir (Amoozegar *et al.* 2003).

Selüloz Hidrolizi

İzolatlar selüloz besiyerine ekimleri yapılarak 37 °C'de 30 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra selüloz besiyerinde üremiş kültürler %0,1'lik Kongo kırmızısı çözeltisi ile 30 dk boyandıktan sonra 1 M'lık NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. Bakteri ekilen bölgenin

etrafındaki berrak ve renksiz bir bölge selüloz hidrolizinin gerçekleştiğini göstermiştir (Harley and Prescott 1993).

Protein Hidrolizi

İzolatlar %15 NaCl'li ve NaCl'süz skimmed-milk (yağsız süt tozu) içeren besiyerine izolatların ekimleri yapılmıştır ve 7 gün 37 °C'de inkübe edilmiştir. Kültürlerin etrafında belirlenen şeffaf zonlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Denizci vd. 2004).

Birchwoodksilan Hidrolizi

Birchwoodksilan içeren Brown besiyerine ekim yapılan izolatlar 7 gün 37 °C'de etüvde inkübe edilmiştir ve %0,1 Kongo Kırmızısı ile boyanmıştır. Kırmızıya boyanan besiyeri üzerinde izolatların ksilanı parçaladığı bölge renksiz olarak kalmış ve pozitif olarak değerlendirilmiştir (Gessesse and Gashe 1997).

3.2.3 PAH Parçalayabilen İzolatların Farklı PAH Konsantrasyonunda Üremelerinin Değerlendirilmesi

PAH parçalayabilen izolatların farklı PAH konsantrasyonlarında üremelerinin değerlendirilmesi için PAH'lar etil eter içerisinde çözündürülerek 300 ppm'lik stok PAH solüsyonları hazırlanmıştır. İzolatların; 20, 40, 80, 120, 160, 200 ppm PAH (*p*-hidroksibenzoik asit, naftalen, fenantren, piren) konsantrasyonlarında üremeleri incelenmiştir. 250 ml'lik erlenlerin içine etil eter içerisinde çözülmüş olan PAH'lardan

besiyerlerine 20, 40, 80, 120, 160, 200 ppm olacak şekilde koyulduktan sonra buharlaştırılmıştır. 100 ml karbon kaynağı içermeyen MSM +%20 NaCl besiyeri ilave edilmiştir. Daha sonra %20 SW besiyerinde 37 °C'de üretilen (OD₆₀₀ nm'de yaklaşık 0.7) bakteri kültüründen 2ml erlen içine ilave edilmiştir. Erlenler 150 rpm, 37 °C'de 10-15 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda besiyerindeki bulanıklığa ve OD₆₀₀ nm'de spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre farklı PAH konsantrasyonlarında izolatların üreme durumları değerlendirilmiştir (Arulzahagan and Vasudevan 2009).

3.2.4 Ham Enzim Ekstrelerinin Hazırlanması

250 ml'lik erlenlerin içine etil asetat içerisinde çözülmüş olan PAH'lardan izolatların optimum üreme gösterdiği konsantrasyon (80 ppm) son konsantrasyon olacak biçimde ilave edilip buharlaştırıldıktan sonra 100 ml karbon kaynağı içermeyen MSM +%20 NaCl besiyeri ilave edilmiştir. Daha önceden %20 SW besiyerinde üretilen (OD₆₀₀ nm'de yaklaşık 0,7) bakteri kültüründen 2 ml erlen içine ilave edilmiştir. Erlenler 150 rpm, 37 °C'de 10-15 gün inkübasyona bırakılmıştır. (Arulzahagan and Vasudevan 2009). Üretilen izolatlar logaritmik evreye ulaştıklarında (OD₆₀₀ nm'de yaklaşık 0,6-0,7) hücreler 6000 rpm, 5 dk santrifüjlenerek toplanmış, tuzlar tarafından enzimatik aktivitenin engellenmemesi için ortamdaki tuz deiyonize su ile bir kez yıkama işlemi yapılarak uzaklaştırılmıştır. Hücreler aynı hacimde parçalama tamponu (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M gliserol, 5 mM amonyum sülfat, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)'na tutturulmuş ve 8 dk sonikasyon cihazı ile sonikasyon yapılmıştır. Sonikasyon işlemi sırasında protein denatürasyonunu engelleyebilmek için bu işlemler buz dolu bir beher içinde yapılmıştır. Bu süspansiyon 11,000 rpm, 4 °C'de 3 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant enzim değerlendirmesi için kullanılmıştır (Garcia *et al.* 2005).

3.2.5 Protein Ekstrelerinin Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

PAH parçalayabilen izolatlardan elde edilen protein ekstrelerindeki protein konsantrasyonunu belirlemek için Total Protein Kit (Sigma TP0100) kullanılmıştır. Bu prosedür, Bradford (1976)'un yöntemine dayanan *in vitro* bir mikro tekniktir. Bu kit, 50 µl veya daha az örnek için kullanılabilen basit, hızlı ve oldukça hassas bir tekniktir (Bradford 1976).

Bu yöntemde, standart, kör ve örnek tüplerine dörtte bir oranında seyreltilmiş olan protein deney solüsyonundan 2,5 ml ilave edilmiştir. Kör tüpüne %0.85'lik NaCl çözeltisinden 50 µl, standart tüpüne 0,3 mg/ml'lik konsantrasyonundaki protein standart solüsyonundan 50 µl (P9744-5ml) ve örnek tüpüne protein ekstrelerinden 50 µl ilave edilmiş ve tüpler çalkalanmıştır. Yaklaşık 2 dk sonra spektrofotometre ile 595 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Bu yöntemde renk en az 30 dk sabit kalmaktadır. Örneklerdeki protein konsantrasyonu aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Bradford 1976).

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/ml)} = \frac{(A_{\text{test}} \times \text{Standartın konsantrasyonu})}{(A_{\text{standart}})}$$

3.2.6 Rothera Reaksiyonu

Intradiol halka parçalayan dioksijenazların varlığı ham hüce ekstreleri kullanılarak, kolorimetrik bir yöntem olan rothera reaksiyonu ile belirlenmiştir (Stanier *et al.* 1966). Bu reaksiyon Ottow ve Zolg (1974)'un metoduna göre yapılmıştır. 2 ml ham enzim ekstresine, 2 mM katekol veya protokatekkuat substrat olarak ilave edilerek 30 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra ekstradiol yolun ürünü olan

mukoniksemialdehit oluşumunun göstergesi sarı rengin ortadan kaybolmasıdır. Bu yüzden sarı rengin kaybolması ekstradiol halka parçalanmanın olduğu yönünde değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere 1g katı amonyum sülfat 0,5 ml konsantre amonyum hidroksit, %1 sodyum nitroprusidden 5 damla ilave edilmiştir. Koyu mor renk oluşumu β ketoadipate yolu olarak bilinen intradiol parçalanmanın olduğunun göstergesidir. Bu yüzden reaksiyon sonrası mor renk oluşumu intradiol halka parçalanmanın olduğu yönünde değerlendirilmiştir.

3.2.7 Dioksijenaz Enzimlerinin Spektrofotometrik Olarak Değerlendirilmesi

Katekol 1,2 dioksijenaz enzim aktivitesi'nin belirlenmesi, oda sıcaklığında, 260 nm'de ($\epsilon_{260}=16,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) cis, cis mukonik asit oluşumu ile absorbans artışının gözlenmesi ile değerlendirilmiştir (Ngai *et al.* 1990). Reaksiyon karışımı 20 μl katekol (50 mM), Tris-HCl (50 mM) pH 7,4, 35-40 μg ham enzim ekstresi, toplam hacim 400 μl olacak şekilde ayarlanmıştır. Katekol 2,3 dioksijenaz aktivitesi ise oda sıcaklığında, 375 nm'de ($\epsilon_{375}=36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 2-hidroksi-mukonik semialdehid oluşmasıyla absorbans artışının gözlenmesi ile değerlendirilmiştir. Reaksiyon karışımı 20 μl katekol (50 mM), Tris-HCl (50 mM) pH 7,4 uygun miktarda enzim (yaklaşık 35-40 μg ham enzim ekstresi), toplam hacim 400 μl olacak şekilde ayarlanmıştır (Fetzner *et al.* 1989). Protokatekhuat 3,4 dioksijenaz aktivitesi ise protokatekhuat oksidasyonu oluşması sebebiyle oda sıcaklığında, 290nm'de ($\epsilon_{290}= 3,890 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) absorbans düşüşünün spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle değerlendirilmiştir (Stainer *et al.* 1954). Reaksiyon karışımı 20 μl protokatekhuat (50 mM), Tris-HCl (50 mM) pH 7,4 ve 35-40 μg ham enzim ekstresi, toplam hacim 400 μl olacak şekilde ayarlanmıştır. Protokatekhuat 4,5 dioksijenaz aktivitesi oda sıcaklığında, 410 nm'de ($\epsilon_{410} = 9,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) absorbans artışının spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile değerlendirilmiştir (Stainer *et al.* 1954). Reaksiyon karışımı 20 μl protokatekhuat (50 mM), Tris-HCl (50 mM) pH 7,4 ve 35-40 μg ham enzim ekstresi toplam hacim 400 μl olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.8 Spesifik Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Spesifik enzim aktivitesi $\mu\text{mol ürün dk}^{-1}$ mg protein olarak verilmiştir. Enzim aktivitesi ölçümleri üç kez tekrarlanmıştır (Temizkan vd. 2004).

$$\text{Örnekteki enzim ünitesi} = \frac{V_t \times dA/dt \times 1000 \times \text{sulandırma faktörü}}{\epsilon \lambda \times V_s \times d} \mu\text{mol (1/dk l)}$$

ϵ_λ =Absorbsiyon katsayısı ($\text{cm}_2 \text{mol}^{-1}$)

d= Küvetin ışık yolu

dA/dt =Birim zamanda (dakikada) absorbans değişimi (dk^{-1})

V_t = Reaksiyon karışımının toplam hacmi (ml)

V_s = Reaksiyona katılan örnek (enzim) hacmi (ml)

Spesifik aktivite = U/mg protein

3.2.9 Dioksijenaz Enzim Genlerinin Amplifikasyonu için İzolatlardan DNA Ekstraksiyonunun Yapılması

İzolatlardan DNA ekstraksiyonu, GF-1 Bakteriyel DNA Ekstraksiyon Kiti (Vivantis) kullanılarak yapılmıştır. Daha önce %20 SW besiyerinde üretilen kültürlerden 1-3 ml ependorf tüplerine alınarak 6000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar döküldükten sonra her bir ependorf tüpüne 100 μl tampon R1 ilave edilerek pipetlenmiştir. Her bir ependorf tüpüne 10 μl (50 mg/ml) lizozim ilave edilip iyice çalkalanmış ve 37 °C'de 20 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 10,000 rpm'de 3dk

santrifüjlenerek süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Proteinlerin denatürasyonu için ependorf tüplerine 180 µl tampon R2 ve 20 µl proteinaz K ilave edilerek 65 °C'de 20 dk inkübe edilmiştir. Bu işlem sırasında her 5 dk'da bir ependorf tüpleri karıştırılmıştır. Homojenizasyon için 2 hacim tampon BG ilave edilip homojen bir karışım elde edilinceye kadar iyice karıştırılmıştır. Sonra 10 dk 65 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 200 µl soğuk etanol ilave edilerek 5-6 sn vortekslenmiştir. Ependorftaki sıvı kolona doldurularak 10,000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Kolonlar alınarak ependorfun dibinde kalan sıvı atılmıştır. Etanol ilave edilen 750 µl yıkama solüsyonu ile kolonlar yıkanarak 10,000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Kolonu kurutmak için tekrar 10,000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Kolonlar DNA'yı toplayacağımız ependorf tüplerine aktarılarak daha önce 65 °C'de 5 dk ısıtılmış olan Elution tampondan 60 µl ilave edilmiştir. Oda ısısında 2 dk bekletildikten sonra 10,000 rpm'de 2 dk santrifüjlenmiştir. Bu şekilde DNA'lar ependorf tüplerinde toplanmıştır. DNA ekstraksiyonundan sonra DNA varlığını kontrol etmek için %1'lik agaroz jel hazırlanarak jelde yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.10 Dioksijenaz Enzim Kodlayan Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu

PAH'ların degradasyonu sürecinde rol oynayan üç katabolik gen tarafından kodlanan anahtar enzimlerin varlığını belirleyebilmek için katekol 1,2 dioksijenaz (1,2 CTD) ve katekol 2,3 dioksijenaz (2,3 CTD) ve protokatekuat 3,4 dioksijenaz (3,4 PCD) için Çizelge 3.1'de gösterilmiş olan primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada, Garcia vd. (2005)'nin farklı dioksijenaz gen bölgelerini referans olarak dizayn etmiş oldukları primerler kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Primer dizaynında en çok korunmuş olan genleri kullanmışlardır (Garcia *et al.* 2005).

Her bir PCR karışımının içeriğinde; 5 µl 10x reaksiyon tamponu, 2,5 µl 25 mM MgCl₂, 8 µl dNTPs (her birinden 200 µl), 50 pmol primerler, 0,25 µl Taq DNA polimeraz ve steril distile su ile son hacim 50 µl olacak şekilde eklenmiştir. 1,2 CTD ve 3,4 PCD için

PCR amplifikasyon koşulları;

95 °C’de 5dk (Denatürasyon)

94 °C’de 1dk 35 döngü

50 °C’de 1dk (Annealing)

72 °C’de 1dk olacak şekilde ayarlanmıştır.

Benzer koşullar 2,3 CTD içinde uygulanmıştır ancak annealing sıcaklığı 40-45 °C arasında uygulanmıştır. Amplifiye ürünler etidyumbromid ile %1’lik agaroz jelde analiz edilerek 312 nm dalga boyu UV veren transillüminatör altında fotoğraflanmıştır (Garcia *et al.* 2005).

Çizelge 3.1 PCR amplifikasyonu için kullanılan primerler

Gen bölgeleri	Kullanılan primerler		Gen Bölgesi
1,2 CTD	cat1(5’-ACCATCGARGGYCCSCTSTAY-3’)	cat3(5’-GTTRATCTGGGTGGTSAG-3’)	444 bç
2,3 CTD	cat 2.3.1 (5’-GARCTSTAYGCSGAYAAGGAR-3’)	cat2.3.2 (5’-RCCGCTSGGRTCGAAGAARTA-3’)	400 bç
3,4 PCD	pro 3.4.2 (5’-GCSCSCTSGAGCCSAACTTC-3’)	pro 3.4.4 (5’-GCCGCSAGSACGATRTCGAA-3’)	330 bç

3.2.11 Agaroz Jel Elektrofrez

%1’lik agaroz jel için, 1X TAE (10X TAE tampon Vivantis #PCO723) tampon ile agaroz karıştırılarak kaynatma yolu ile çözdürülmüştür. Jel dökülmeden önce elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde bu karışıma 5 µl etidyumbromid (EC-007 Vivantis) ilave edilmiştir. Jel tarakları yerleştirilmiş olan jel tepsisine jel dökülerek donması beklenmiştir. Tarak dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra jel elektrofrez tankına geçirilmiştir. 0,5’lik TAE tampon çözelti olarak kullanılmıştır. Çukurlara 10 µl örnek ve 2 µl yükleme boyası (NMO410 Vivantis) olacak şekilde yükleme yapılmıştır. 5 µl 1 kb DNA markır (Vivantis #NL1405), 2 µl yükleme boyası olacak şekilde yükleme

yapılmıştır. 145-150 V'da 20 dk yürütülmüştür. DNA fragmentleri DNA markır ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.2.12 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR'dan sonra jelde yürütülen ürünlere Vivantis GF-GP-050 DNA geri kazanım (recovery) kit protokolü uygulanmıştır. İlgili olan gen bölgeleri UV ışığı ortamında bistüri ile kesilerek 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır. Sonra saflaştırılmış ürünler ile %1'lik agoroz jelde yürütülmüş ve 312 nm dalga boyu UV veren transillüminatör altında görüntülenmiştir. Bant kalitesi iyi olmayan örnekler için PCR jel purifikasyon protokolü tekrar uygulanmıştır.

3.2.13 Dioksijenaz Enzimlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Nükleotid Sekans Analizi

Saflaştırılmış PCR ürünlerin nükleotid sekans analizleri Aka Biotech Firması Labaratuvarında (Beckman Coulter Model: CEQ 8000 XL DNA Analiz Sistemi) yapılmıştır.

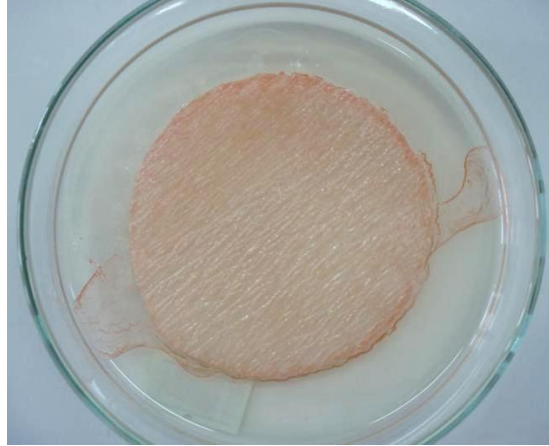
3.2.14 Sekans Verilerinin Analizi

Dizi analizi sonuçları BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı ile değerlendirilerek her bir izolat için dioksijenaz enzim kodlayan gen bölgelerinin sekans analizleri gen bankasındaki benzerlik gösterdiği türler belirlenmiştir (Int. Kyn. 6).

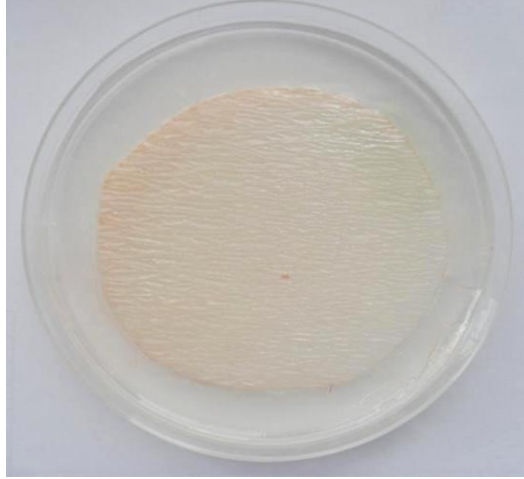
4. BULGULAR

4.1 PAH Parçalayabilen İzolatların Belirlenmesi

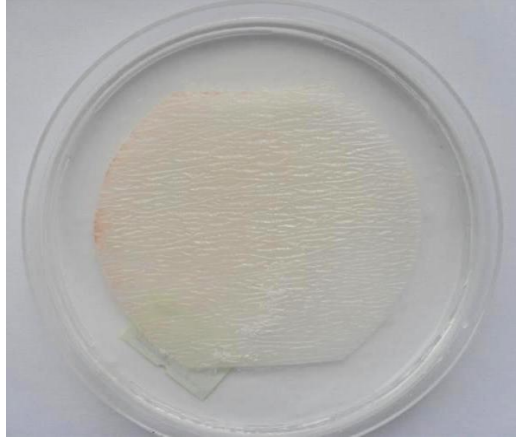
Bu çalışmada Zhao vd. (2009)'nin yöntemi kullanılarak test edilen 17 adet halofilik ve halotolerant izolattan 10 adetinin; C-24, C-27, C-37, C-41, C-43, C-46, C-50, C-51, C-52, CH, denen PAH'ları (*p*-hidroksibenzoik asit, naftalen, fenantren, piren) parçalayabildikleri belirlenmiştir. Resim 4.1-4.7'de bazı izolatların tek karbon kaynağı PAH olan MSM besiyerinde üremeleri gösterilmiştir.



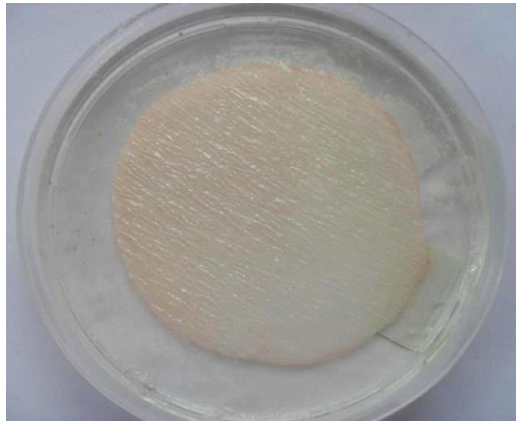
Resim 4.1 C-37 izolatının piren ile inkübasyon sonrası görünümü



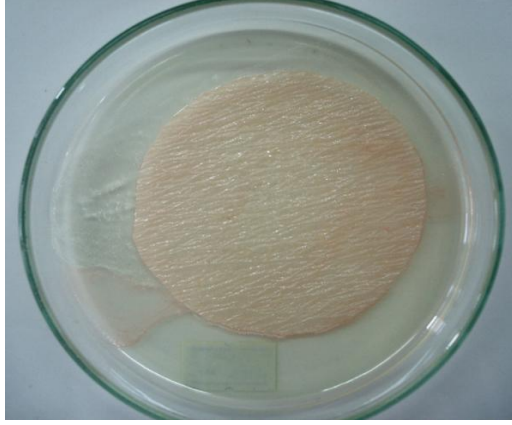
Resim 4.2 C-27 izolatının *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyon sonrası görünümü



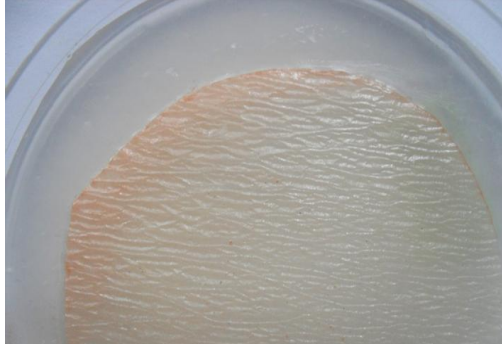
Resim 4.3 C-43 izolatının fenantren ile inkübasyon sonrası görünümü



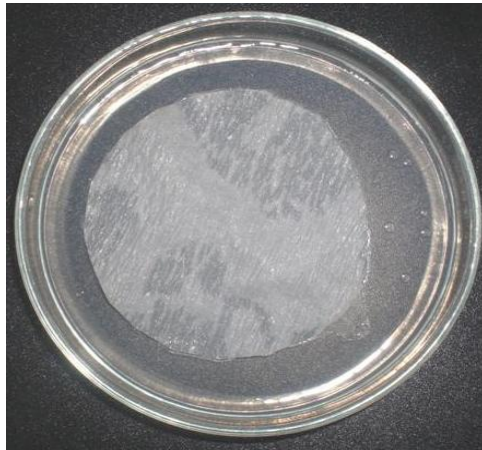
Resim 4.4 C-41 izolatının naftalen ile inkübasyon sonrası görünümü



Resim 4.5 C-50 izolatının piren ile inkübasyon sonrası görünümü



Resim 4.6 C-46 izolatının naftalen ile inkübasyon sonrası yakından görünümü



Resim 4.7 Negatif kontrol grubuna ait görüntü

C-37 ve C-51 izolatlarının *p*-hidroksibenzoik asit'i karbon ve enerji kaynağı olarak kullanamadıkları belirlenmiştir. Diğer PAH (naftalen, fenantren ve piren) kaynaklarını ise karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak üreyebildikleri belirlenmiştir. Diğer izolatların ise kullanılan tüm PAH kaynaklarını karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak üreyebildikleri görülmüştür. Negatif kontrol grubunda hiç üreme görülmemişken pozitif kontrol grubununun hepsinde üreme görülmüştür. PAH parçalayabilen izolatların listesi Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı PAH içeren MSM besiyerinde halofilik ve halotolerant izolatların üreme durumları

İZOLATLAR	PAH'lar			
	<i>p</i> -hidroksibenzoik asit	naftalen	fenantren	piren
C-12	-	-	-	-
C-15	-	-	-	-
C-18	-	-	-	-
C-19	-	-	-	-
C-22	-	-	-	-
C-23	-	-	-	-
C-24	+	+	+	+
C-27	+	+	+	+
C-29	-	-	-	-
C-37	-	+	+	+
C-41	+	+	+	+
C-43	+	+	+	+
C-46	+	+	+	+
C-50	+	+	+	+
C-51	-	+	+	+
C-52	+	+	+	+
CH	+	+	+	+

-(üreme yok), + (üreme var)

4.2 İzolatların Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

PAH parçalayabilen izolatların kültürel ve morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Bu özellikler Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 İzolatların kültürel ve morfolojik özellikleri

TESTLER	C-24	C-27	C-37	C-41	C-43	C-46	C-50	C-51	C-52	CH
Gram reaksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Koloni şekli	Kok	Kok	Kok	Kok	Kok	Kok	Kok	Kok	Kok	Basil
Pigmentasyon	Kırmızı-turuncu	Kırmızı-pembe	Pembe-turuncu	Kırmızı-turuncu	Pembe	Pembe	Pembe-turuncu	Pembe-turuncu	Kırmızı	Krem
Biyokimyasal testler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Jelatin	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNAz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNAz+NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enzim testleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Protein hidrolizi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Protein+%15NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nişasta+%15NaCl	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
BirchwoodKsilan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Selüloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Şeker Testleri (pH üreme)										
Glikoz	++ 8	++ 8	+++ 8	++ 8	++ 8	++ 8	+++ 8	++ 8	+++ 8	+++ 8
Maltoz	++ 8	++ 8	+++ 8	++ 8	+++ 8	+ 8	++ 8	+ 8	++ 8	+ 8
Sukroz	++ 8	++ 8	+++ 8	++ 8	++ 8	+ 8	++ 8	+ 8	++ 8	+ 8
Mannitol	+ 8	+ 8	+++ 8	++ 8	+++7.8	++ 8	++7.9	++ 8	++ +8	++ 8
Rafinoz	++ 8	+ 8	+ 8	++ 8.3	++ 8	++ 8	++ 7.5	++ 8	++ +8	++ 8
Fruktoz	++ 7.8	++ 7.8	+++7. 8	++ 8	+++7. 8	++ 8	++ 8	++ 8	++7. 8	++7.8
İzolatların fiziksel istekleri										
pH 5,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pH 7,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pH 9,0	+	+	+++	++	++	++	++	+++	+++	++
pH 11,0	+	+	++	++	+	+	+	+	++	++
Sıcaklık 25°C	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+++
Sıcaklık 30°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sıcaklık 37°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sıcaklık 45°C	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Sıcaklık 55°	+	+	++	+	+	+	+	++	+	-

Çizelge 4.2 (Devam) İzolatların kültürel ve morfolojik özellikleri

TESTLER	C-24	C-27	C-37	C-41	C-43	C-46	C-50	C-51	C-52	CH
%5 NaCl	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
%10 NaCl	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
%15 NaCl	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++
%20 NaCl	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
%25 NaCl	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
%30 NaCl	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+pozitif reaksiyon, -negatif reaksiyon

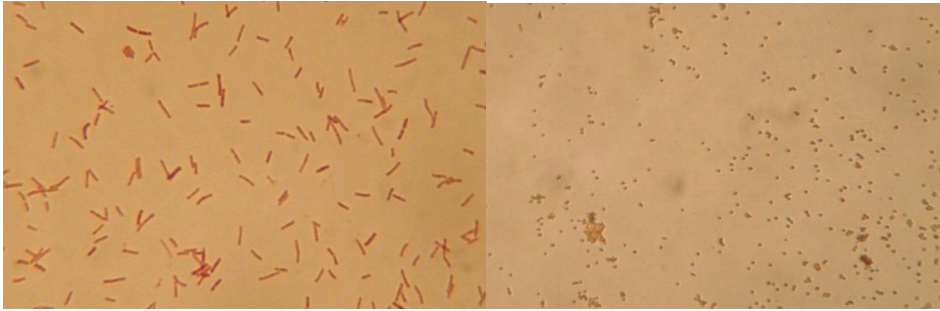
+ orta, ++iyi, +++çok iyi

Gram Boyama

Gram boyama sonucunda PAH parçalayabilen izolatların hepsinin Gr (-) olarak boyandıkları belirlenmiştir. CH izolatı (basil) haricinde diğer izolatların mikroskopik morfolojilerinin kok olduğu saptanmıştır. Resim 4.8 (A)'da Gr (-) basil şekilli hücreler ve (B)'de ise kok şekilli hücreler görülmektedir. %20 SW besiyerinde 37 °C'de 7 gün inkübasyon sonrasında CH izolatının krem renginde, diğer izolatların ise kırmızı ya da turuncu tonlarında koloni oluşturdukları görülmüştür.

A

B



Resim 4.8 Modifiye Gram boyama işlemi sonrası Gram (-)olarak boyanmış hücreler, (A) Basil şekilli hücreler, (B) Kok şekilli hücreler

İzolatların Optimum Büyüme için İhtiyaç Duyduğu pH Değerinin Belirlenmesi

PAH parçalayabilen izolatların tümünün pH 5,0 ve 7,0'de, çok iyi üreme gösterdikleri belirlenmiştir. C-37, C-51 ve C-52 izolatlarının ise pH 9,0'da da çok iyi üreme göstermelerine rağmen C-24 ve C-27'nin üremesinin ise azaldığı görülmüştür. pH 11,0'de ise C-24, C-27, C-43, C-46, C-50 ve C-51 izolatlarının üremelerinin azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak izolatların hepsinin nötral pH 7,0±1'de iyi üreme

gösterdikleri belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki aşamalarında izolatlar nötral pH'da inkübe edilmiştir.

İzolatların Optimum Büyüme için İhtiyaç Duyduğu Sıcaklığın Belirlenmesi

Tüm izolatların 30 ve 37 °C'de çok iyi üreyebildikleri görülmüştür. İzolatların 25, 45 ve 55 °C'de üreyebilmelerine rağmen üremenin sıcaklığın azalması ve artması ile birlikte azaldığı görülmüştür. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki aşamalarında izolatlar 37 °C'de inkübe edilmiştir.

İzolatların Optimum Büyüme için İhtiyaç Duyduğu NaCl Miktarının Belirlenmesi

Tüm NaCl konsantrasyonlarında izolatların hepsinin üreyebildikleri ancak izolatlarda en iyi üremenin %20-30 NaCl konsantrasyonlarında olduğu saptanmıştır. Bu nedenle biyokimyasal testlerde izolatlar %25 SW besiyeri kullanılmıştır. Diğer izolatlara göre CH izolatının düşük NaCl konsantrasyonlarında da çok iyi üreme gösterdiği belirlenmiştir.

İzolatların Farklı Karbon ve Şeker Kaynaklarını Kullanma Durumunun Belirlenmesi

İzolatların farklı karbon ve şeker kaynaklarını kullanabilme yetenekleri ile ilgili test sonuçlarına göre, glukoz, fruktoz, maltoz, mannitol, sükroz ve rafinoz kullanabilme yeteneğinde oldukları belirlenmiştir.

Jelâtin Hidrolizi

C-43, C-46 ve C-50 dışındaki diğer izolatların jelatini hidroliz edebildikleri görülmüştür.

Katalaz Testi

İzolatların tümünde katalaz testi pozitif olarak belirlenmiştir.

Kazein Hidrolizi

Kazein besiyerinde gelişen izolatlar siyah zemin üzerinde incelenmiş olup üreme bölgelerinin etrafında hiçbir izolatda şeffaf bölgeler görülmemiştir. Bu sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir.

Oksidaz Testi

C-43, C-46, C-50 ve CH izolatları dışındaki izolatların oksidaz testi sonucu pozitif olarak saptanmıştır.

Tween 80 Hidrolizi

Tween 80 besiyerinde gelişen izolatların hiçbirinin etrafında şeffaf zon görülmediği için sonuç negatif olarak görülmüştür.

DNAaz Testi

DNAaz besiyerinde gelişen izolatların üzerine 1 N HCl damlatılması sonucunda izolatların hiçbirinin etrafında şeffaf zon görülmemiştir. Sonuç negatif olarak saptanmıştır.

İndol Testi

İndol besiyerinde gelişen izolatların üzerine 0,5 ml kovaks ayracı damlatıldıktan sonra izolatların hiçbirinde kırmızı renk oluşumu gözlemlenmemiş ve sonuç negatif olarak görülmüştür.

Nişasta Hidrolizi

%15 NaCl içeren besiyerinde, C-43, C-46 ve CH izolatlarında koloni etrafındaki şeffaf bölgeler, sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir. Diğer izolatların ise nişastayı hidrolize edemedikleri saptanmıştır. NaCl içermeyen besiyerinde ise izolatların hiçbirinin nişastayı hidroliz edemedikleri görülmüştür.

Selüloz Hidrolizi

Selüloz besiyerinde gelişen kültürler %0,1'lik kongo kırmızısı çözeltisi ile 30 dk boyanıp sonra 1 M'lık NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. CH dışındaki tüm izolatlarda kolonilerin etrafında renksiz ve berrak bölge oluştuğu görülmüş ve sonuç pozitif olarak saptanmıştır.

Protein Hidrolizi

%15 NaCl'lü ve NaCl'süz skimmed-milk (yağsız süt tozu) agar içeren besiyerinde izolatların hiçbirinin etrafında şeffaf zon görülmemiştir ve sonuç negatif olarak görülmüştür.

Birchwoodksilan Hidrolizi

Birchwoodksilan içeren Brown (1963) besiyerinde gelişen izolatlar %0,1 kongo kırmızısı ile boyanmış ve izolatların hiçbirinde kolonilerin etrafında renksiz olarak bir bölgeye rastlanmamıştır ve sonuç negatif olarak saptanmıştır.

4.3 PAH Parçalayabilen İzolatların Farklı PAH Konsantrasyonunda Üremelerinin Değerlendirilmesi

PAH parçalayabilen 10 adet izolatın; tek karbon kaynağı PAH olan MSM broth besiyerinde, farklı PAH (*p*-hidroksibenzoik asit, naftalen, fenantren, piren)

konsantrasyonlarında (20, 40, 80, 120, 160, 200 ppm) üremeleri incelenmiştir. Farklı PAH konsantrasyonlarında izolatların üreme durumları Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

C-37 ve C-51 izolatları, *p*-hidroksibenzoik asit ile MSM broth besiyerinde inkübasyonları sonrasında PAH konsantrasyonlarının hiçbirinde üreme göstermediği görülmüştür. Diğer izolatlar ise 80 ve 120 ppm'lik *p*-hidroksibenzoik asit konsantrasyonunda en iyi üreme gösterirken PAH konsantrasyonlarının artış ve azalışında ise üremelerinde azalma görülmüştür. 200 ppm'lik *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyon sonrasında ise C-24, C-27, C-37 ve C-51 izolatlarında üreme görülmemiştir.

İzolatların hepsi farklı naftalen konsantrasyonlarında üreme göstermiştir. İzolatlar en iyi 80, 120 ve 160 ppm naftalen konsantrasyonlarında üreme göstermiştir. 20 ve 200 ppm naftalen konsantrasyonlarında ise izolatların üremelerinde azalma görülmüştür.

İzolatların hepsi 80 ve 120 ppm fenantren konsantrasyonlarında iyi üreme göstermiştir. 20 ppm fenantren konsantrasyonunda izolatların hepsi üremiştir ancak üremelerinde inhibisyon görülmüştür. 40 ve 160 ppm fenantren konsantrasyonunda tüm izolatlar orta derecede üreme göstermiştir. 200 ppm fenantren konsantrasyonunda, C-41, C-43, C-46, C-50, C-52 ve CH izolatlarında az miktarda üreme görülmesine rağmen diğer izolatlarda üreme görülmemiştir.

İzolatların hepsi 80 ve 120 ppm piren konsantrasyonlarında ise iyi üreme göstermiştir. 40 ppm konsantrasyonunda izolatlar orta ve iyi derecede üreme göstermiştir. 20 ve 160 ppm piren konsantrasyonunda ise izolatların hepsi üremesine rağmen üremelerinde azalma görülmüştür. 200 ppm piren konsantrasyonunda ise izolatların hiçbirinde üreme görülmemiştir.

Çizelge 4.3 Farklı PAH konsantrasyonlarında izolatların MSM besiyerinde üreme durumları

İZOLATLAR	PAH konsantrasyonları (ppm)																							
	<i>p</i> -hidroksibenzoik asit						naftalen						fenantren						piren					
	20	40	80	120	160	200	20	40	80	120	160	200	20	40	80	120	160	200	20	40	80	120	160	200
C-24	+	++	+++	+++	++	-	+	++	+++	+++	++	+	+	++	+++	+++	++	-	+	++	+++	+++	+	-
C-27	+	++	+++	+++	+	-	+	++	+++	+++	++	+	+	++	+++	+++	++	-	+	++	+++	+++	+	-
C-37	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	++	+	+	++	+++	+++	+	-	+	++	+++	+++	+	-
C-41	+	++	+++	+++	++	+	+	++	+++	+++	+++	++	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++	+	-
C-43	+	++	+++	+++	++	+	+	++	+++	+++	+++	++	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++	+	-
C-46	+	++	+++	+++	++	+	+	++	+++	+++	+++	++	+	++	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++	+	-
C-50	+	+	+++	+++	++	+	+	++	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++	++	+	+	++	+++	+++	+	-
C-51	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++	++	-	+	++	+++	+++	+	-
C-52	+	+	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++	+	-
CH	+	++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++	+	-

+pozitif reaksiyon, -negatif reaksiyon

+ az (OD₆₀₀ 0.1-0.3), ++orta (OD₆₀₀ 0.3-0.5), +++ iyi (OD₆₀₀ 0.5-0.8)

4.4 Halka Parçalayan Dioksijenaz Enzimlerinin Değerlendirilmesi

4.4.1 Rothera Reaksiyonu

İnradiol halka parçalama yolundaki (*orto* yol) enzimler, katekol 1,2 dioksijenaz ve/veya protokatekhuat 3,4-dioksijenaz iken ekstradiol halka parçalama yolundaki (*meta* yol) enzimler ise katekol 2,3 dioksijenaz ve/veya protokatekhuat 4,5-dioksijenaz enzimleridir (Cerniglia1992).

Katekol 1,2 dioksijenaz, protokatekhuat 3,4 dioksijenaz (*orto* yol enzimleri) ve katekol 2,3 dioksijenaz, protokatekhuat 4,5 dioksijenaz (*meta* yol enzimleri) enzimlerinin varlığı ham hüce ekstreleri kullanılarak, kolorimetrik bir yöntem olan rothera reaksiyonu ile değerlendirilmiştir (Stanier *et al.* 1966). Bu reaksiyon Ottow ve Zolg (1974)'un metoduna göre yapılmıştır. Katekol 1,2 dioksijenaz, katekol 2,3 dioksijenaz substrat olarak katekol kullanırken, protokatekhuat 3,4 dioksijenaz, protokatekhuat 4,5 dioksijenaz substrat olarak protokatekhuat kullandığı için rothera testinde katekol ve protokatekhuat substrat olarak kullanılmıştır.

Farklı PAH içeren ortamda inkübe edilerek üretilmiş olan izolatların ham enzim ekstreleri ile katekol substratı kullanılarak yapılmış olan rothera testi sonucunda mor renk oluşumu *orto* (intradiol) parçalanmanın gerçekleştiğini göstermiştir. *Meta* (ekstradiol) parçalanma sonucuna ise rastlanmamıştır. Substrat olarak protokatekhuat kullanılarak, farklı PAH içeren ortamda inkübe edilerek üretilmiş olan izolatların ham enzim ekstreleri ile yapılmış olan rothera testi sonucunda, mor renk oluşumu görülmüştür. Bu sonuç, *orto* (intradiol) parçalanmanın gerçekleştiğini göstermiştir. *Meta* (ekstradiol) parçalanma sonucu görülmemiştir. rothera test sonuçları Çizelge

4.4’de gösterilmiştir. C-37 ve C-51 izolatları *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonları sonucunda üremedikleri için rothera testi yapılamamıştır.

Rothera test sonuçlarına göre izolatların *meta* yolu kullanmadıkları dolayısıyla katekol 2,3 dioksijenaz ve/veya protokatekhuat 4,5 dioksijenaz enzimlerini kullanmadıkları görülmüştür. Sonuçlar izolatların PAH parçalanmasında *orto* yol enzimlerini (katekol 1,2 dioksijenaz ve/veya protokatekhuat 3,4-dioksijenazi) kullandıklarını göstermektedir.

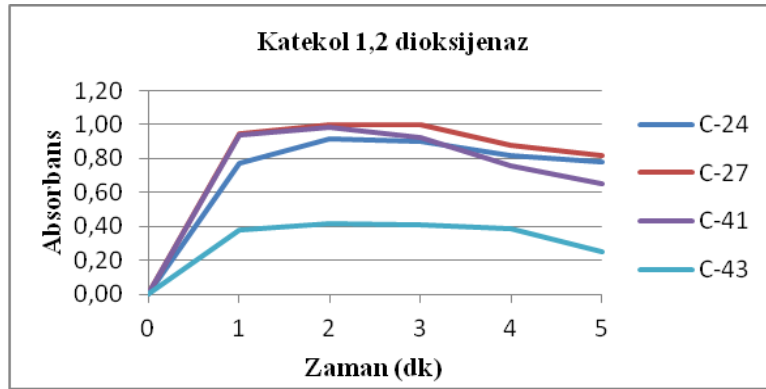
Çizelge 4.4 Farklı PAH’lar ile inkübe edilen izolatların ham enzim ekstreleri ile yapılan rothera testi sonuçları

İzolatlar	PAH’lar			
	H.benzoikasit	Naftalen	Fenantren	Piren
C-24				
Katekol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol
Protokatekhuat	<i>Orto</i> yol	-	-	-
C-27				
Katekol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol
Protokatekhuat	<i>Orto</i> yol	-	-	-
C-37				
Katekol	-	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol
Protokatekhuat	-	-	-	-
C-41				
Katekol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol
Protokatekhuat	-	-	-	-
C-43				
Katekol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol
Protokatekhuat	-	-	-	-
C-46				
Katekol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol
Protokatekhuat	-	-	-	-
C-50				
Katekol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol
Protokatekhuat	-	-	-	-
C-51				
Katekol	-	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol
Protokatekhuat	-	-	-	-
C-52				
Katekol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol
Protokatekhuat	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol
CH				
Katekol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol	<i>Orto</i> yol
Protokatekhuat	-	-	-	-

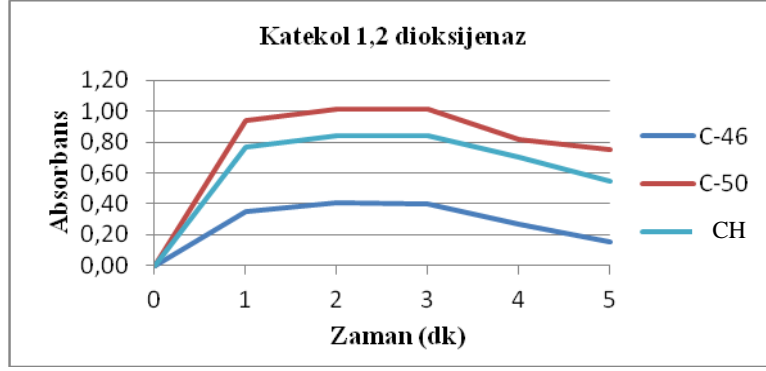
4.4.2 Dioksijenaz Enzimlerinin Spektrofotometrik Olarak Değerlendirilmesi

Katekol 1,2 dioksijenaz enzimi için yapılan spektrofotometrik ölçümlerde ilk bir-iki dk içinde en yüksek absorbands değerlerine ulaşıldığı görülmüştür. Bu değerlerin genellikle üçüncü dk'ya kadar sabit kaldığı ve üçüncü-dördüncü dk arasında absorbandsın düştüğü görülmüştür.

İzolatların *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri sonucunda en yüksek absorbands değerinin C-50 izolatına ait olduğu görülmüştür. C-37 ve C-51 izolatları *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübe edildiklerinde üremedikleri için bu izolatlar için spektrofotometrik ölçüm yapılamamıştır. Diğer izolatlar arasında ise C-52 izolatı dışındaki izolatların tümünde absorbands artışı belirlenmiştir. Şekil 4.1 ve 4.2'de İzolatların *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri gösterilmiştir.

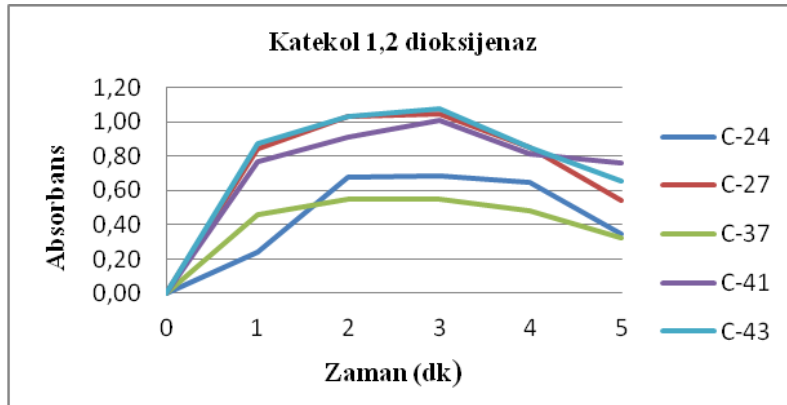


Şekil 4.1 İzolatların *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri

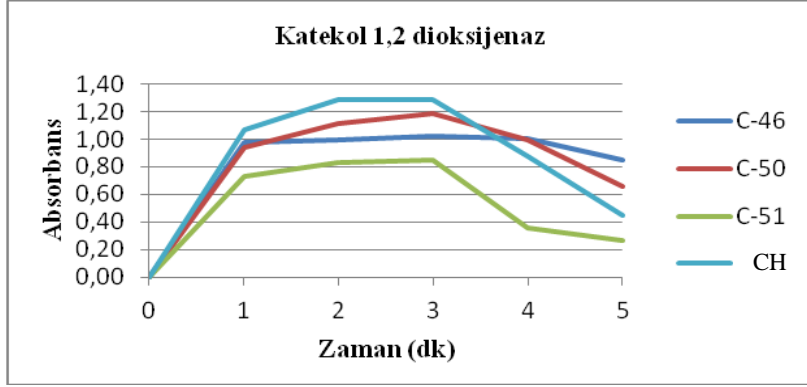


Şekil 4.2 İzolatların *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri

İzolatların naftalen ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri sonucunda C-52 izolatu dışındaki tüm izolatlarda absorbans artışı görülmüştür. Bu izolatlar arasında en yüksek absorbans değerinin CH izolata ait olduğu saptanmıştır. Şekil 4.3 ve 4.4’de İzolatların naftalen ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri gösterilmiştir.

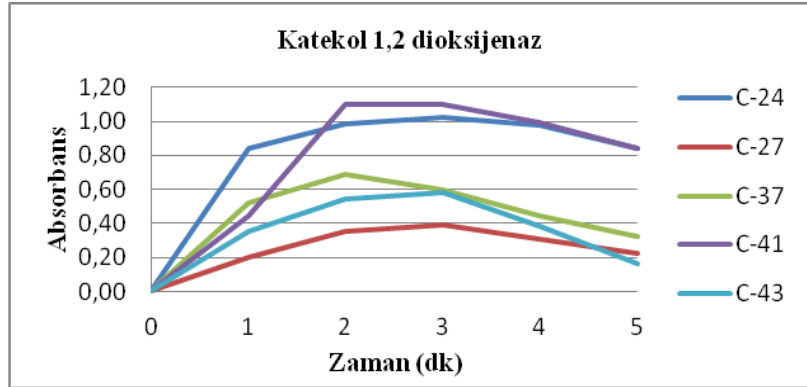


Şekil 4.3 İzolatların naftalen ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri

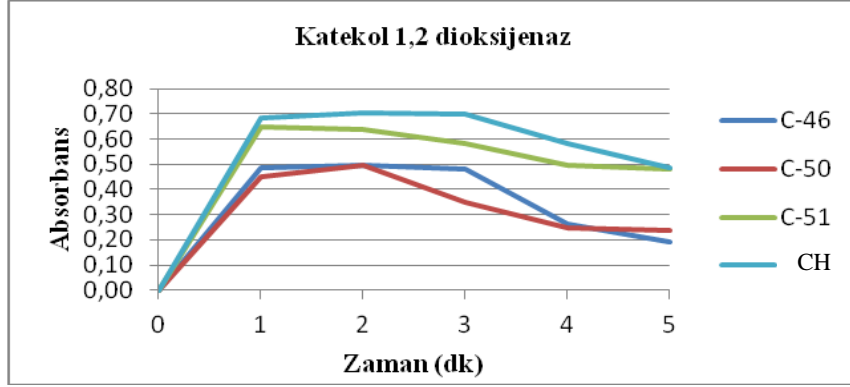


Şekil 4.4 İzolatların naftalen ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri

İzolatların fenantren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri sonucunda C-52 izolatu dışındaki tüm izolatlarda absorbans artışı görülmüştür. En yüksek absorbans değerinin ise C-41 izolatına ait olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.5 ve 4.6'da İzolatların fenantren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri gösterilmiştir.

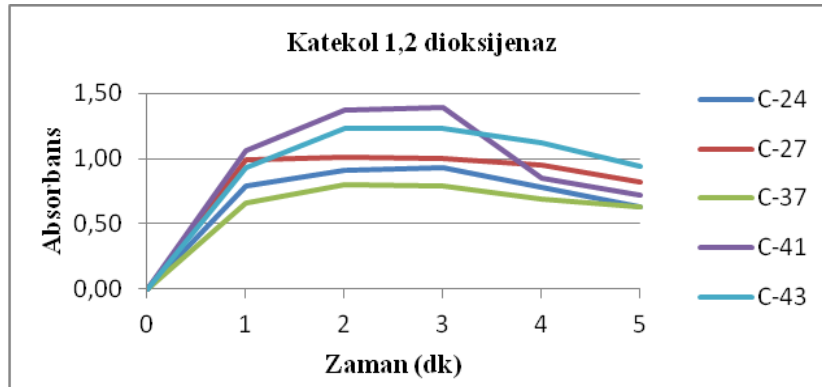


Şekil 4.5 İzolatların fenantren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri

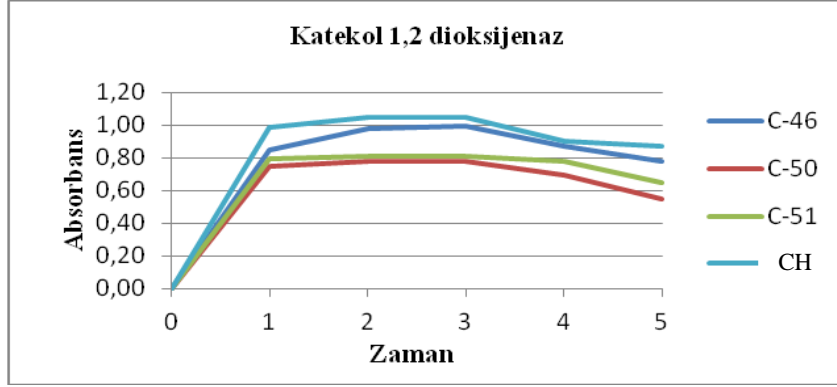


Şekil 4.6 İzolatların fenantren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri

İzolatların piren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri sonucunda ise fenantren de olduğu gibi en yüksek absorbans değerinin C-41 izolatında olduğu saptanmıştır. C-52 izolatı dışındaki diğer izolatlarda ise absorbans artışları görülmüştür. Şekil 4.7 ve 4.8’de izolatların piren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri gösterilmiştir.



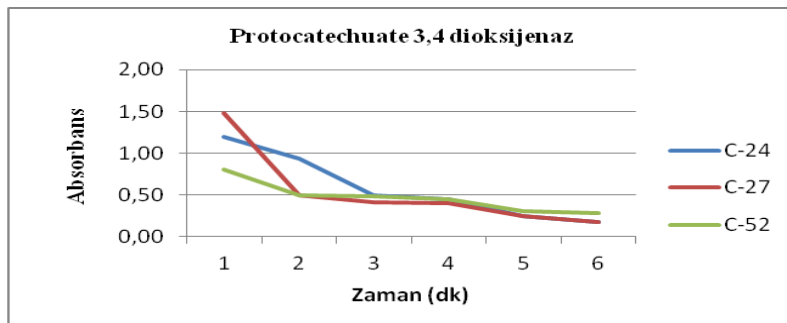
Şekil 4.7 İzolatların piren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri



Şekil 4.8 İzolatların piren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile katekol 1,2 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri

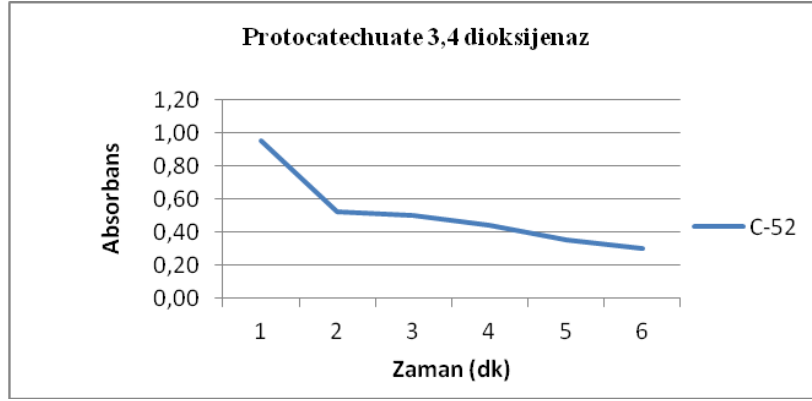
Protokatekuat 3,4 dioksijenaz enzimi için yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda ise ilk bir-iki dk içinde absorbansda düşüş belirlenmiştir. Bu değerlerin genellikle üçüncü dk'ya kadar sabit kaldığı ve üçüncü-dördüncü dk ise düşmeye başladığı görülmüştür.

İzolatların *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile yapılan protokatekuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümlerinde sadece C-24, C-27 ve C-52 izolatlarının absorbans değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Şekil 4.9'da izolatların *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri gösterilmiştir.



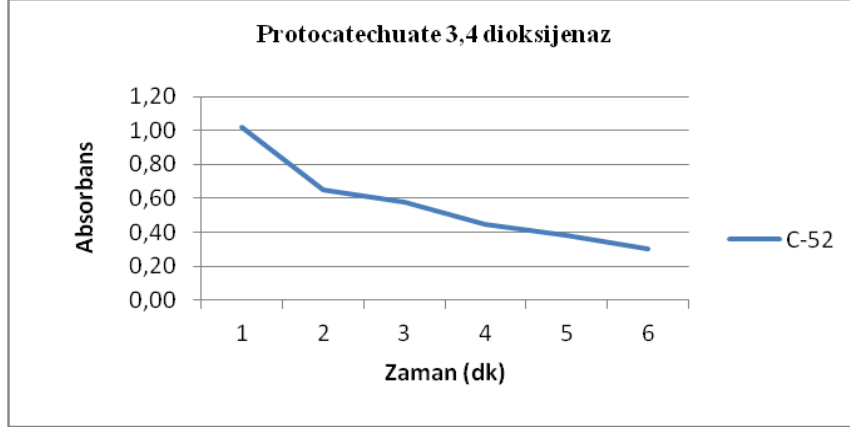
Şekil 4.9 İzolatların *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri

İzolatların naftalen ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile yapılan protokatekuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümlerinde ise sadece C-52 izolatının absorbans değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Şekil 4.10'da C-52 izolatının naftalen ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri gösterilmiştir.



Şekil 4.10 C-52 İzolatının naftalen ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri

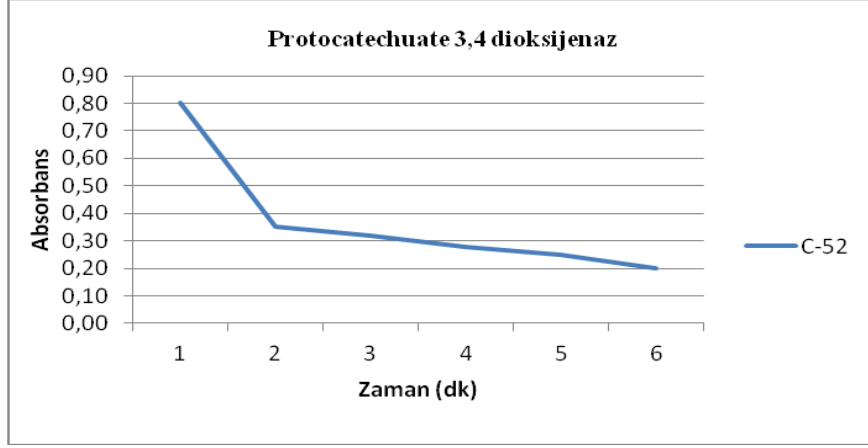
İzolatların fenantren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile yapılan protokatekuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümlerinde ise naftalen de olduğu gibi sadece C-52 izolatının absorbans değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Şekil 4.11'de C-52 izolatının fenantren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri gösterilmiştir. Diğer izolatlardan elde edilen ham enzim ekstrelerinde enzim aktivitesi belirlenmemiştir.



Şekil 4.11 C-52 İzolatının fenantren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri

İzolatların piren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile yapılan protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümlerinde ise naftalen, fenantren de olduğu gibi sadece C-52 izolatının absorbans değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Şekil 4.12’de C-52 izolatının piren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri gösterilmiştir.

Diğer izolatlardan elde edilen ham enzim ekstrelerinde ise protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzim aktivitesi belirlenmemiştir. Ayrıca spektrofotometrik ölçümlerin hiçbirinde *meta* yol enzimlerinin (katekol 2,3 dioksijenaz ve protokatekhuat 4,5 dioksijenaz). aktiviteleri ise spektrofotometrik yöntemde saptanmamıştır.



Şekil 4.12 C-52 İzolatının piren ile inkübasyonu sonucu elde edilen ham enzim ekstreleri ile protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enziminin spektrofotometrik ölçümleri

4.4.3 Spesifik Enzim Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Katekol 1,2 dioksijenaz, protokatekhuat 3,4 dioksijenaz (*orto* yol enzimleri) ve katekol 2,3 dioksijenaz, protokatekhuat 4,5 dioksijenaz (*meta* yol enzimleri) enzimleri ham enzim ekstreleri kullanılarak spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Spesifik enzim aktivitesi $\mu\text{mol ürün dk}^{-1} \text{ mg protein}$ olarak hesaplanmıştır. Farklı PAH'lar ile birlikte inkübe edilmiş olan izolatların ham enzim ekstrelerinin spesifik enzim aktiviteleri Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

p-hidroksibenzoikasit, naftalen, fenantren ve piren ile indüklenmiş izolatların hiçbirinde katekol 2,3 dioksijenaz, protokatekhuat 4,5 dioksijenaz (*meta* yol enzimleri) enzim aktivitesi saptanmamıştır. C-37 ve C-51 izolatları *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübasyonları sonucunda üremedikleri için enzim aktiviteleri belirlenememiştir. *p*-hidroksibenzoik asit ile inkübe edilen diğer izolatlardan elde edilen ham enzim ekstrelerinden C-52 izolatı dışındaki izolatların hepsinde, katekol 1,2 dioksijenaz (*orto* yol enzimi) aktivitesi belirlenmiştir. Spesifik enzim aktivitesi en çok $10,84 \pm 2,04$ aktivite ile C-27 izolatında belirlenmişken en düşük aktivite ise $2,38 \pm 0,48$ değeri ile C-46 izolatında belirlenmiştir. Ayrıca, C-24, C-27 ve C-52 izolatlarında, protokatekhuat 3,4 dioksijenaz (*orto* yol enzimi) aktivitesi saptanmıştır. Bu izolatlar arasında en yüksek

aktivite, $34,40 \pm 3,04$ deęeri ile C-27 izolatında belirlenmiř ve en dūřuk aktivite ise $13,21 \pm 2,51$ deęeri ile C-52 izolatında belirlenmiřtir.

Naftalen ile inkūbe edilmiř izolatlardan elde edilen ham enzim ekstrlerinde C-52 izolatu dıřındaki ekstrlerin tūmūnde katekol 1,2 dioksijenaz (*orto* yol enzimi) enzim aktivitesi saptanmıřtır. En yūksək deęeri $12,15 \pm 2,03$ ile CH izolatu gōsterirken en dūřuk deęeri ise $4,55 \pm 0,88$ deęeri ile C-37 izolatu gōstermiřtir. C-52 dıřındaki izolatların naftalen ile inkūbasyonu sonucunda elde edilen ham enzim ekstrlerinde ise protokatekuat 3,4 dioksijenaz enzim aktivitesi belirlenmemiřtir. C-52 izolatında spesifik enzim aktivitesi $14,67 \pm 1,18$ olarak saptanmıřtır.

İzolatların fenantren ile inkūbasyonları sonrası elde edilmiř olan ham enzim ekstrleri ile yapılan spektrofotometrik ōlūmlerde ise C-52 dıřındaki ekstrlerin tūmūnde katekol 1,2 dioksijenaz (*orto* yol enzimi) aktivitesi belirlenmiřtir. En yūksək spesifik enzim aktivitesi $9,77 \pm 2,12$ deęeri ile C-41 izolatında belirlenmiřken en dūřuk aktivite ise $3,52 \pm 0,31$ deęeri ile C-27 izolatında belirlenmiřtir. Ayrıca sadece C-52 izolatında $20,00 \pm 2,18$ deęeri ile protokatekuat 3,4 dioksijenaz enzim aktivitesi saptanmıřtır. İzolatların piren ile inkūbasyonu sonucunda elde edilen ham enzim ekstrleri ile yapılan ōlūmlerde, C-52 dıřındaki ekstrlerin tūmūnde katekol 1,2 dioksijenaz (*orto* yol enzimi) aktivitesi gōrūlmūřtir. Bunlar arasında en yūksək spesifik aktivite deęeri $12,21 \pm 2,01$ ile C-43 izolatında belirlenmiřken en dūřuk deęer ise $0,47 \pm 0,10$ ile CH izolatında belirlenmiřtir. Ayrıca C-52 izolatında $15,21 \pm 2,58$ deęeri ile protokatekuat 3,4 dioksijenaz enzim aktivitesi saptanmıřtır.

Meta yol enzimlerinin (katekol 2,3 dioksijenaz ve\veya protokatekuat 4,5 dioksijenaz) aktiviteleri ise hiēbir izolatda saptanmamıştır.

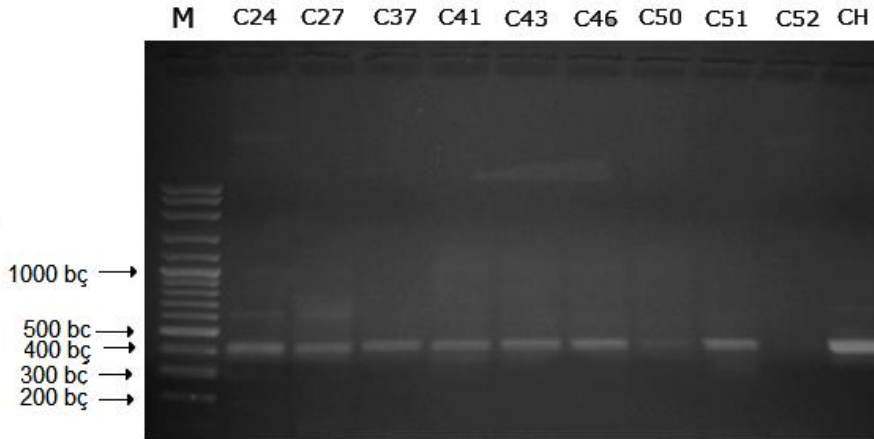
Çizelge 4.5 Farklı PAH'lar ile indüklenmiş izolatların ham enzim ekstratlarının spesifik enzim aktivitesi

İZOLATLAR	p-hidroksibenzoik asit				Naftalen				Fenantren				Piren			
	1,2CTD	2,3CTD	3,4PCD	4,5CD	1,2CTD	2,3CTD	3,4PCD	4,5PCD	1,2CTD	2,3CTD	3,4PCD	4,5PCD	1,2CTD	2,3CTD	3,4PCD	4,5PCD
C-24																
C-27																
C-37	7,64±1,72	ND	21,85±3,04	ND	6,53±0,51	ND	ND	ND	8,43±1,22	ND	ND	ND	9,28±1,32	ND	ND	ND
C-41	10,84±2,04	ND	34,40±2,95	ND	10,10±1,65	ND	ND	ND	3,52±0,31	ND	ND	ND	8,61±0,97	ND	ND	ND
C-43	-	-	-	-	4,55±0,88	ND	ND	ND	6,36±0,87	ND	ND	ND	4,46±0,12	ND	ND	ND
C-46	9,34±3,00	ND	ND	ND	10,03±2,75	ND	ND	ND	9,77±2,12	ND	ND	ND	11,28±1,74	ND	ND	ND
C-50	2,54±0,98	ND	ND	ND	10,47±3,15	ND	ND	ND	5,53±0,36	ND	ND	ND	12,21±2,01	ND	ND	ND
C-51	2,38±0,48	ND	ND	ND	9,72±1,84	ND	ND	ND	4,91±0,99	ND	ND	ND	7,19±1,45	ND	ND	ND
C-52	9,32±1,75	ND	ND	ND	11,42±2,42	ND	ND	ND	4,24±1,02	ND	ND	ND	7,39±1,32	ND	ND	ND
CH	-	-	-	-	8,20±1,24	ND	ND	ND	6,36±1,24	ND	ND	ND	5,83±0,99	ND	ND	ND
	ND	ND	13,21±2,51	ND	ND	ND	14,67±1,18	ND	ND	ND	20,00±2,18	ND	ND	ND	15,21±2,58	ND
	7,59±1,02	ND	ND	ND	12,15±2,03	ND	ND	ND	6,97±1,12	ND	ND	ND	0,47±0,10	ND	ND	ND

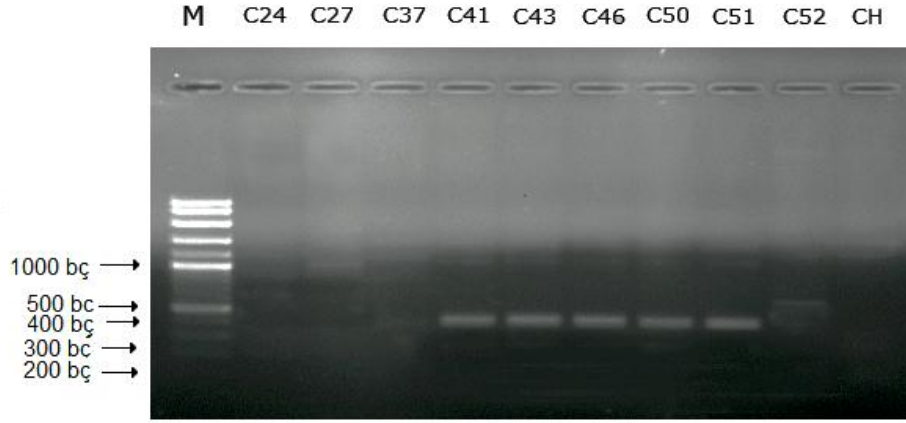
Spesifik aktivite $\mu\text{mol dk}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$

4.5 Dioksijenaz Enzimlerini Kodlayan Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu

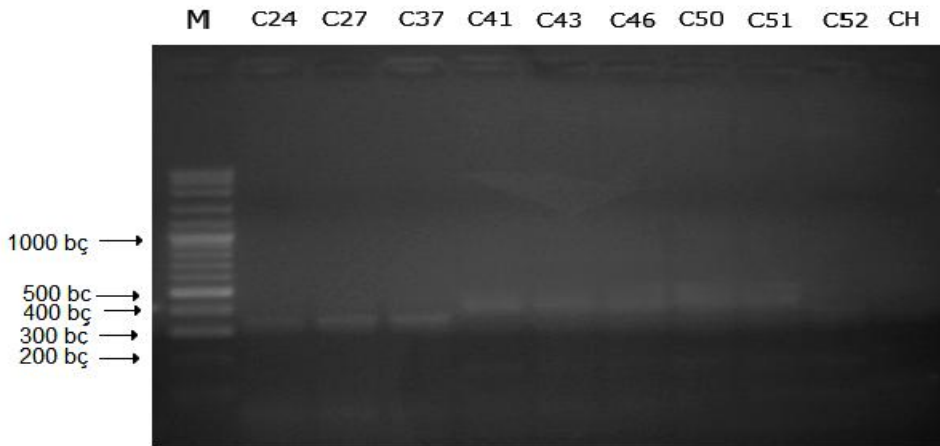
İzolatların katekol 1,2 dioksijenaz (1,2 CTD) ve katekol 2,3 dioksijenaz (2,3 CTD) ve protokatekhuat 3,4 dioksijenaz (3,4 PCD) enzim kodlayan gen bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılmıştır. PCR sonrası elde edilen ürünler %1'lik agaroz jellerde yürütülmüştür. Resim 4.9'da katekol 1,2 dioksijenaz kodlayan muhtemel gen bölgelerinin (444 bç) amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri verilmiştir. Resim 4.10'da katekol 2,3 dioksijenaz kodlayan muhtemel gen bölgelerinin (400 bç) amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri verilmiştir. Resim 4.11'de ise protokatekhuat 3,4 dioksijenaz kodlayan muhtemel gen bölgelerinin (330 bç) amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri verilmiştir.



Resim 4.9 Katekol 1,2 dioksijenaz kodlayan muhtemel gen bölgelerinin (444 bç) amplifikasyon ürünleri



Resim 4.10 Katekol 2,3 dioksijenaz kodlayan muhtemel gen bölgelerinin (400 bç) amplifikasyon ürünleri



Resim 4.11 Protokatekhuat 3,4 dioksijenaz kodlayan muhtemel gen bölgelerinin (330 bç) amplifikasyon ürünleri

Çizelge 4.6'da izolatlar ait olduğu düşünülen katabolik genlerin PCR amplifikasyon sonuçları gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgesi (444 bç) C-52 izolatı dışındaki tüm izolatlarda belirlenmiştir. C-24, C-27, C-37, C-52 ve CH izolatlarında katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgesi (400 bç) saptanmamıştır. C-41, C-43, C-46, C-50 ve C-51 izolatlarında ise katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgesi (400 bç) belirlenmiştir. Protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen

bölgesi (330 bç), C-41, C-43, C-46 ve C-50, C-51 izolatlarında saptanamamıştır. C-24, C-27, C-37, C-52 ve CH izolatlarında ise bu gen bölgesi belirlenmiştir.

Çizelge 4.6 İzolatlara ait katabolik genlerin PCR amplifikasyon sonuçları

İzolatlar	1,2 CTD Primerleri ^a 1. Gen Bölgesi (444 bç)	2,3 CTD Primerleri ^b 2. Gen Bölgesi (400 bç)	3,4 PCD Primerleri ^c 3. Gen Bölgesi (330 bç)
C-24	+	-	+
C-27	+	-	+
C-37	+	-	+
C-41	+	+	-
C-43	+	+	-
C-46	+	+	-
C-50	+	+	-
C-51	+	+	-
C-52	-	-	+
CH	+	-	+

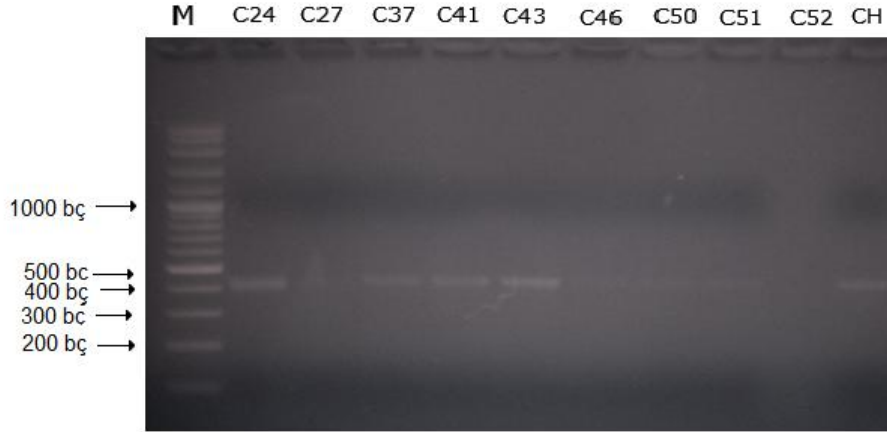
^a1,2 CTD primerleri (cat1 ve cat3 primerleri), ^b2,3 CTD primerleri (cat 2.3.1 ve cat 2.3.2 primerleri) ^c3,4 PCD primerleri (pro 3.4.2 ve pro 3.4.4 primerleri)

Katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan gen bölgeleri (444 bç) sadece C-52 izolatında belirlenmemiştir. Bu sonuç, katekol 1,2 dioksijenaz enzimi için yapılan rothera testleri ve spesifik enzim aktivitesi sonuçları ile paralellik göstermektedir. Katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodlayan gen bölgeleri (440 bç), C-41, C-43, C-46, C-50 ve C-51 izolatlarında belirlenmesine rağmen rothera testleri ve spesifik enzim aktivite ölçümlerinde bu enzim saptanamamıştır. Protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimini kodlayan gen bölgeleri (330 bç) ise C-24, C-27, C-37, C-52 ve CH izolatlarında belirlenmiştir. Bu sonuçların rothera testleri ve spesifik enzim aktivite ölçüm sonuçları ile uyumlu oldukları görülmüştür.

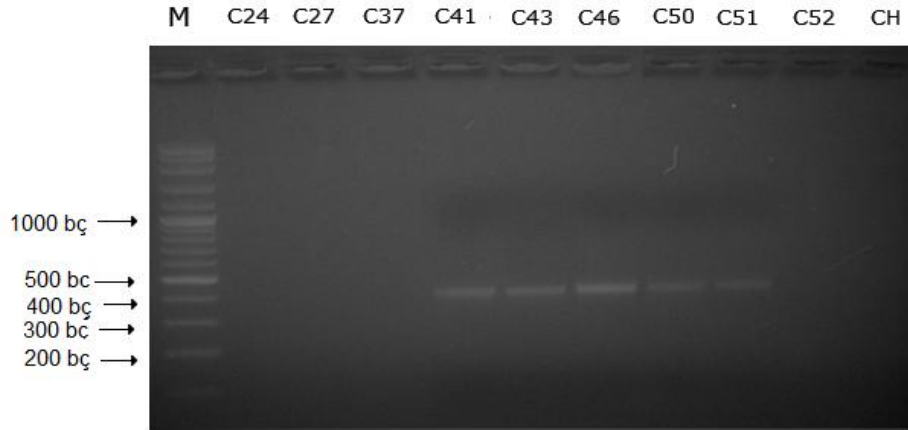
4.6 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Katekol 1,2 dioksijenaz, katekol 2,3 dioksijenaz ve protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimlerini kodlayan gen bölgelerinin saflaştırma işlemleri yapıldıktan sonra PCR ile

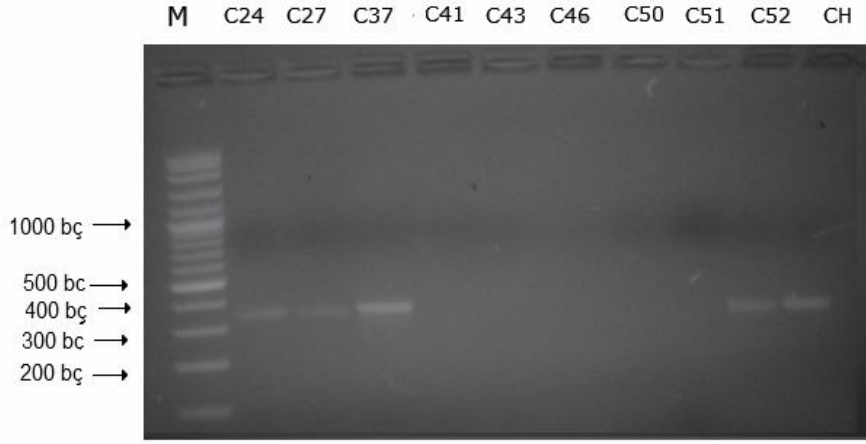
amplifikasyonları yapılmıştır. Amplifiye PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Resim 4.12, Resim 4.13 ve Resim 4.14'de PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri verilmiştir.



Resim 4.12 Katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan saflaştırılmış muhtemel gen bölgelerinin PCR amplifikasyon ürünleri (444 bç)



Resim 4.13 Katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodlayan saflaştırılmış muhtemel gen bölgelerinin PCR amplifikasyon ürünleri (400 bç)



Resim 4.14 Protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimini kodlayan saflaştırılmış muhtemel gen bölgelerinin PCR amplifikasyon ürünleri (330 bç)

4.7 Dioksijenaz Enzimlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Nükleotid Sekans Analizi

4.7.1 Katekol 1,2 Dioksijenaz Enzimini Kodlayan Gen Bölgelerinin Sekans Analizi Sonuçları

C-24, C-27, C-37, C-41, C-43, C-46, C-50 ve C-51 izolatlarının katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodladığı düşünülen ve saflaştırılmış olan gen bölgelerinin (444 bç) nükleotid sekans analizleri sırasında primerler iki bölgeye bağlanıp çift sekans okunduğundan bu örneklerin sekans analizleri değerlendirilememiştir. CH izolatına ait gen bölgesinin sekans analizi ise Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 Katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan gen bölgesinin dizi analizi sonrası belirlenen en yakın gen bankası temsilcileri.

Dizi analizi için izolatlar	Dizinin uzunluğu	Eşleşen baz sayısı	Gen bankasındaki en yakın karşılığı
CH	322	291/362	%80 <i>Halomonas organivorans</i>
	176	221/299	%73 <i>Pseudomonas stutzeri</i> JM300
	176	184/242	%76 <i>Pseudomonas chloritidismutans</i>

CH izolatına ait dizi analiz sonucu BLAST programı ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, sekans analizi yapılan gen bölgesi, *Halomonas organivorans* izolatının katekol 1,2 dioksijenaz *catA* geni ile %80 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *Pseudomonas* sp. 6978 katekol 1,2 dioksijenaz *catA* geni ile %72 benzerlik göstermiştir. *Pseudomonas* sp. katekol 1,2 dioksijenaz geni ile %76 oranında benzerlik saptanmıştır. *Pseudomonas stutzeri* JM300 izolatı katekol 1,2 dioksijenaz *catA* geni ile %73 oranında benzerlik belirlenmiştir. *Pseudomonas chloritidismutans* izolatı katekol 1,2 dioksijenaz *catA* geni ile %76 oranında sekans benzerliği göstermiştir. Diğer sonuçlar ise Ek 1’de gösterilmiştir.

4.7.2 Katekol 2,3 Dioksijenaz Enzimini Kodlayan Gen Bölgelerinin Sekans Analizi Sonuçları

Katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodladığı düşünülen saflaştırılmış olan gen bölgelerinin (400 bç) nükleotid sekans analiz sonuçları BLAST programı ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 kromozom II ve *Haloarcula hispanica* ATCC 33960 ait hücre bölünmesini kontrol eden gen bölgelerinin sekanslarıyla yüksek oranda (%94-96) benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Sonuçlar Ek 2’de gösterilmiştir.

4.7.3 Protokatekuat 3,4 Dioksijenaz Enzimini Kodlayan Gen Bölgelerinin Sekans Analizi Sonuçları

Protokatekuat 3,4 dioksijenaz enzimini kodlayan saflaştırılmış olan gen bölgelerinin (400 bç) nükleotid sekans analiz sonuçları BLAST programı ile değerlendirilmiştir. İzolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın gen bankası temsilcileri Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 İzolatların protokatekhuat dioksijenaz enzimini kodlayan gen bölgelerinin dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın gen bankası temsilcileri

İzolatlar	Dizinin uzunluğu	Eşleşen baz sayısı	Gen bankasındaki en yakın karşılığı
C-24	416	265/284	%93 <i>Pseudomonas putida</i> DSMZ 2112
	403	272/298	%91 <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23975
	389	266/293	%90 <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23975
C-27	432	281/303	%92 <i>Pseudomonas putida</i> DSMZ 2112
	421	283/310	%91 <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23975
	408	276/303	%91 <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23975
C-37	423	283/313	%91 <i>Pseudomonas putida</i> DSMZ 2112
	407	282/314	%89 <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23975
	392	278/313	%88 <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23975
C-52	435	283/304	%93 <i>Pseudomonas putida</i> DSMZ 2112
	423	282/307	%91 <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23975
	408	278/306	%90 <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23975
CH	462	284/297	%95 <i>Chromohalobacter</i> sp. HS2
	226	235/302	%77 <i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6978
	199	212/272	%77 <i>Pseudomonas</i> sp. IMT40

C-24 izolatına ait dizi analizi sonucuyla yapılan değerlendirmede *Pseudomonas putida* strain DSMZ 2112 protokatekhuat 3,4-dioksijenaz enziminin beta alt ünitesi (*pcaH*) genleri ile %93 sekans benzerliği gösterdiği görülmüştür. *Pseudomonas putida* ATCC 23975 protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta ve alfa alt ünite (*pcaH* ve *pcaG*) genleri ile %91 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. *Pseudomonas putida* ATCC 23975 protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta alt ünite (*pcaH*) geni ile %90 benzerlik gösterdiği görülmüştür. *Pseudomonas putida* *pcaH* geni ve *pcaG* geni ile %90 benzer olduğu görülmüştür. *Pseudomonas* sp. DSM 6978 protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta alt ünite (*pcaH*) geni ile %87 oranında sekans benzerliği gösterdiği belirlenmiştir.

C-27 izolatına ait dizi analizi sonucuyla yapılan değerlendirmede, *Pseudomonas putida* DSMZ 2112 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta alt ünite (*pcaH*) geni ile %92

oranında benzerlik göstermiştir. *Pseudomonas putida* ATCC 23975 protokatekhuat 3,4 dioksijenaz alfa ve beta alt ünite (*pcaH* ve *pcaG*) genleri ile %91 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. *Pseudomonas putida* ATCC 23975 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta alt ünite (*pcaH*) geni ile %91 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. *Pseudomonas putida* *pcaH* geni ve *pcaG* geni ile %90 oranında sekans benzerliği göstermiştir.

C-37 izolatına ait dizi analiz sonucunun değerlendirilmesinde ise *Pseudomonas putida* DSMZ 2112 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta alt ünite (*pcaH*) geni ile %91 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. *Pseudomonas putida* ATCC 23975 protokatekhuat 3,4 dioksijenaz alfa ve beta alt ünite (*pcaH* ve *pcaG*) genleri ile %89 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *Pseudomonas putida* izolatının ATCC 23975 protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta alt ünite (*pcaH*) genleri ile %88 oranında sekansların benzerlik gösterdiği görülmüştür.

C-52 izolatına ait dizi analiz sonucu BLAST programı ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda, *Pseudomonas putida* DSMZ 2112 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta alt ünite (*pcaH*) genleri ile %93 oranında benzerlik göstermiştir. *Pseudomonas putida* ATCC 23975 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz alfa ve beta alt ünite (*pcaH* ve *pcaG*) genleri ile %91 oranında benzerlik göstermiştir. *Pseudomonas putida* ATCC 23975 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta alt ünite (*pcaH*) genleri ile ise %90 oranında sekans benzerliği gösterdiği belirlenmiştir.

CH izolatına ait dizi analiz sonucu ile yapılan değerlendirmede; *Chromohalobacter* sp. HS2 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enziminin beta (*pcaH*) ve alfa alt ünite (*pcaG*) genleri ile %95 oranında benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. *Pseudomonas* sp. DSM 6978 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enziminin beta alt ünite (*pcaH*) genleri ile %77 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. *Pseudomonas* sp. IMT40 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enziminin beta (*pcaH*) ve alfa (*pcaG*) alt ünitelerine ait genler ile %77 oranında sekans benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Diğer sonuçlar Ek 3'de gösterilmiştir.

Dioksijenaz enzimlerini kodlayan gen bölgelerinin nükleotid sekans analizi sonuçları, izolatlarda katekol 1,2 dioksijenaz ve protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimlerini kodlayan gen bölgelerinin bulunduğunu göstermektedir. Sekans analizi sonuçları enzim aktivitelerinin spektrofotometrik ölçümleri ile paralellik göstermektedir. Bu durum, PAH parçalayabilen izolatların parçalanmasında katekol 1,2 dioksijenaz ve\veya protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimi veya enzimlerini kullanarak PAH'ları parçalayabildiklerini göstermektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

PAH'lar çeşitli sebeplerden dolayı, çevrede yaygın olarak bulunan organik kirleticilerdir. Potansiyel mutajen olmaları ve karsinojeniteleri nedeniyle çevre kirleticisi olarak büyük öneme sahiptirler. PAH bileşikleri yüksek toksisite göstermelerinden dolayı ciddi çevre problemlerinin ortaya çıkmasına sebep olurlar (Cerniglia and Heitkamp 1989). Diğer ekosistemler gibi aşırı tuzlu ortamlarda bu kirlilikten etkilenmektedir. PAH'lar ile kirlenmiş ortamlar aynı zamanda yüksek tuz konsantrasyonu içerir ve kontaminantların uzaklaştırılması için pek çok durumda biyolojik parçalanma primer mekanizmadır. Tuzlu habitatlarda PAH'lar bol miktarda bulunmalarına rağmen, böyle ortamlarda PAH bileşiklerini parçalayabilen halofilik mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmalar oldukça azdır (Peng *et al.* 2008).

Aşırı tuzluluk koşullarına dayanıklı enzimleri, zor şartlarda enerji üretimine olanak sağlayan özel proteinleri, aşırı koşullara karşı koyabilmek için sahip oldukları özel yapıları nedeniyle, halofilik mikroorganizmalar, biyoteknoloji alanında çalışan birçok araştırmacının ilgi odağı haline gelmiştir. Bu nedenle halofilik bakterilerin biyoteknolojik uygulamalarda, özellikle biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmasının büyük avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Bu grup mikroorganizmalar tuzlu koşullar altında çok fazla katabolik çeşitlilik göstermelerine rağmen kullandıkları metabolik yollar tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmada, daha önce İzmir Çamaltı Tuzla'sından izole edilen ve 16S rDNA analizleri ile tanımlanmış halofilik ve halotolerant izolatların, seçilen PAH'ları (*p*-hidroksibenzoik asit, naftalen, fenantren, ve piren) parçalayabilme yetenekleri belirlenerek, parçalama mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır.

PAH parçalayabilen izolatların hepsinin (C-24, C-27, C-37, C-41, C-43, C-46, C-50, C-51, C-52 ve CH) Gr (-) olarak boyandıkları belirlenmiştir. Birbir vd. (2001), Tuz

Gölü'nden izole ettikleri halofilik bakterilerin Gr (-) olduklarını bildirmişlerdir (Birbir *et al.* 2001). Bu durum *Archaea*'nın genel özelliklerine uymaktadır. CH izolatu (basil) hariç, diğer izolatların mikroskopik morfolojilerinin kok olduğu saptanmıştır. %20 SW besiyerinde 37 °C'de 7 gün inkübasyon sonrasında CH izolatının krem renginde, diğer izolatların ise kırmızı ya da turuncu tonlarında koloni oluşturdukları görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda *Halobacteriaceae* familyasının türlerinin çubuk, küre, pleomorfik, disk şeklinde farklı morfolojik yapılarda bulunduğu belirlenmiştir (Tindall 1992, Oren 2000a, Trigui *et al.* 2011).

Çalışmamızda PAH parçalayabilen izolatların tümü pH 5,0 ve 7,0'de, çok iyi üreme göstermiştir. C-37, C-51 ve C-52 izolatlarının ise pH 9,0'da da çok iyi üremesine rağmen C-24 ve C-27'nin bu pH'da üremesinin azaldığı görülmüştür. pH 11,0'de ise C-24, C-27, C-43, C-46, C-50 ve C-51 izolatlarının üremelerinde azalma saptanmıştır. Tüm izolatların 30 °C ve 37 °C'de çok iyi üreyebildikleri görülmüştür. İzolatlarda genellikle en iyi üreme %20-30 NaCl konsantrasyonlarında olmuştur. Ayrıca CH izolatının düşük NaCl konsantrasyonlarında da çok iyi gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum bu izolatın ılımlı halofilik olduğunu ve diğer izolatların ise halofilik olduklarını doğrulamaktadır. Bizim çalışma sonuçlarımıza benzer olarak Birbir vd. (2001, 2004)'nin yapmış oldukları çalışmalarda izole ettikleri halofilik izolatların %10, %15 ve %25 NaCl konsantrasyonlarında, pH 7,5'da 40 °C'de optimum gelişme gösterdiklerini belirlemişlerdir (Birbir *et al.* 2001, Birbir *et al.* 2004).

İzolatların farklı karbon kaynaklarını kullanabilme yetenekleri ile ilgili test sonuçları, tüm izolatların, glukoz, fruktoz, maltoz, mannitol, sükroz ve rafinoz kullanabilme yeteneğinde olduklarını göstermiştir. C-43, C-46 ve C-50 dışındaki diğer izolatların jelatini hidroliz edebildikleri görülmüştür. C-43, C-46, C-50 ve CH izolatları dışındaki izolatların oksidaz testi sonucu pozitif olarak saptanmıştır. İzolatların tümünde katalaz testi pozitif olarak belirlenmiştir. PAH parçalayabilen izolatların tümünde kazein, tween 80, DNAaz ve indol testlerinin sonuçları negatif olarak saptanmıştır. Birbir vd. (2001), Şereflikoçhisar Tuz Gölü'nden izole ettikleri halofilik bakterilerin %83'ünün oksidaz testinin ve %78'inin katalaz testinin pozitif sonuç verdiğini saptamıştır. Asker ve Ohta

(2002), *Haloferax alexandrinus* izolatu ile yapmış oldukları çalışmalarda nişasta ve kazein hidrolizi gerçekleşmediğini belirlemiştir (Birbir *et al.* 2001, Asker and Ohta 2002).

%15 NaCl içeren nişasta besiyerinde, C-43, C-46 ve CH izolatlarının nişastayı hidroliz edebildikleri saptanmıştır. NaCl içermeyen besiyerinde ise izolatların hiçbirinin nişastayı hidroliz edemedikleri görülmüştür. Bu durum ortam koşullarının nişasta hidrolizinden sorumlu enzim aktivitesi üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. %15 NaCl'lü ve NaCl'süz ortamda protein hidrolizi ve birchwoodksilan hidrolizi tüm izolatlarda negatif olarak görülmüştür.

PAH parçalayabilen bakterilerin belirlenmesinde, Zhao vd. (2009)'un yöntemi uygulanmıştır. Bu, eski yöntemlere göre daha hızlı, güvenilir ve ekonomik olduğu için tercih edilmiştir. Zhao vd. (2009)'un yöntemine göre, seçilen PAH'ları (*p*-hidroksibenzoik asit, naftalen, fenantren, piren) parçalayabilen 10 adet izolat belirlenmiştir. Bunlar; C-24, C-27, C-37, C-41, C-43, C-46, C-50, C-51, C-52, CH izolatlarıdır.

Daha önce yapılan bir çalışmada *Haloarcula* sp. D1 halofilik *Archaea* izolatının *p*-hidroksibenzoik asiti karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiği belirlenmiştir (Emerson *et al.* 1994). Naftalen, bakterilerin PAH'ları parçalayabilme yeteneklerinin incelenmesi için model bir bileşik olarak sıklıkla çalışmalarda kullanılmaktadır. Çünkü naftalen en basit ve en çok çözünebilen PAH'lardan biridir. Bugüne kadar, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* ve *Streptomyces* genusları gibi naftaleni karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen pek çok mikroorganizma izole edilmiştir (Seo *et al.* 2009). *Acidovorax*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* ve *Sphingomonas* gibi çeşitli genusların fenantreni parçalayabildikleri belirlenmiştir. Piren parçalayabilen suşlardan bazıları ise *Rhodococcus* sp., *Bacillus cereus*, *Burkholderia cepacia*, *Cycloclasticus* sp. P1, *Pseudomonas fluorescens*,

Pseudomonas stutzeri, *Sphingomonas* sp. VKM B-2434, *Sphingomonas paucimobilis* ve *Stenotrophomonas maltophilia* olarak saptanmıştır (Seo et al 2009).

Arulazhagan ve Vasudevan (2009) deniz suyu örneklerinden PAH parçalayabilen bakterileri izole etmişlerdir. Düşük molekül ağırlıklı PAH olarak fenantren, florin ve yüksek molekül ağırlıklı PAH olarak piren ve benzo(e)piren kullanmışlardır. Böylece elde ettikleri bakteriyel komunitelerin, hem düşük hem yüksek molekül ağırlıklı PAH'ları metabolize edebildiklerini belirlemişlerdir. İzole ettikleri bakteri komunitesinde bulunan türlerin de; *Ochrobactrum* sp., *Enterobacter cloacea*, *Stenotrophomonas maltophilia* olduklarını belirlemişlerdir (Arulazhagan and Vasudevan 2009). Bizim çalışmamızda ise, izolatların pek çoğunun düşük molekül ağırlıklı PAH olan *p*-hidroksibenzoik asit, naftalen, fenantren ve yüksek molekül ağırlıklı PAH olarak da pireni parçaladıkları belirlenmiştir.

Fu ve Oriel (1999), petrol atıkları ile kontamine olmuş aşırı tuzlu topraktan izole ettikleri *Haloferax* sp. D1227 izolatının aromatik hidrokarbonlardan benzoik asit, sinamik asit ve 3-fenilpropionik'i karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak üreyebildiğini göstermişlerdir (Fu and Oriel 1999). Tapilatu vd. (2010) ise kontamine olmamış tuzlu göllerden n-alkan parçalayabilen aşırı halofilik *Archaea* izole etmişlerdir. İzolatlarından biri (MSNC 2) *Haloarcula* sp., üçü ise *Haloferax* sp. (MSNC 4, MSNC 14, MSNC 16) şeklinde belirlenmiştir. Biyolojik parçalanma çalışmaları, 40 °C'de, 225 g/l NaCl içeren besiyerinde 30 gün içinde %32-95 (0,5 g/l) heptadekan parçalanmasının gerçekleştiğini göstermiştir. Çalışmamıza benzer olarak, bu izolatlardan MSNC 14 izolatının fenantreni parçalayabildiği de belirlenmiştir (Tapilatu *et al.* 2010).

Çalışmamızda en iyi üreme 80 ve 120 ppm PAH konsantrasyonlarında olmuştur. İzolatların tümü, molekül ağırlığı yüksek bir PAH olan pirenin 200 ppm'lik konsantrasyonunda hiç üreme göstermemiştir. 80 ppm'in altındaki PAH konsantrasyonlarında ise izolatların üremesinde azalma görülmüştür. Cuadros-Orellana vd. (2006), aşırı tuzlu beş bölgeden aldıkları örneklerden 44 yeni halofilik *Archaea*'nın

tek karbon kaynağı olarak 0,4 mM *p*-hidroksibenzoik asiti enerji kaynağı olarak kullanarak gelişebildiklerini belirlemişlerdir. Bu izolatlar arasında *Halobacteriaceae* üyelerinin, *p*-hidroksibenzoik asiti en iyi parçaladıklarını ileri sürmüşlerdir (Cuadros-Orellana *et al.* 2006). Çalışmamızda, C-24, C-27, C-37, C-41, C-43, C-46, C-50, C-51, C-52, CH izolatların çoğunun PAH'ları parçalayabildikleri belirlenmiştir. Tao vd. (2007), PAH ile kontamine olmuş olan topraktan izole ettikleri *Sphingomonas* sp. GY2B ile yapmış oldukları çalışmalarda fenantren biyotransformasyonunu incelemişlerdir. Bu izolatın tek karbon ve enerji kaynağı olarak fenantreni etkili bir şekilde kullanabildiğini belirlemişlerdir (Tao *et al.* 2007).

Aerobik bakteriyel sistemlerde PAH'ların parçalanmasında başlangıç basamağı, dioksijenaz enzimi ile oksidasyondur. Bunun sonucunda *cis*-dihidrodioller oluşur. Bunlar multikomponent enzim sisteminin erken biyoürünleridir. Bu nedenle PAH halkalarının aerobik bakteriler tarafından enzimatik parçalanması için moleküler oksijen varlığı gerekmektedir. Substratlardan *cis*-dihidrodiollerin oluşumundan sorumlu dioksijenazlar, en çok bakterilerde görülmektedir. Bunlar, protein ve hem içermeyen demir ile ilişkili olup, NADH gerektiren multikomponent enzim sistemlerini içerirler. Intradiol halka parçalama yolundaki enzimler, protokatekhuat 3,4-dioksijenaz ve/veya katekol 1,2-dioksijenaz iken ekstradiol halka parçalama yolundaki enzimler ise protokatekhuat 4,5-dioksijenaz ve/veya katekol 2,3-dioksijenazdır (Cerniglia 1992). Çalışmamızda bu anahtar enzimlerin varlığı, ham enzim ekstratları kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir (Caldini and Cenci 1997, Garcia *et al.* 2005, Song. 2009). Denediğimiz izolatların PAH'ları *orto* yolu kullanarak parçaladığı ve bu süreçte katekol 1,2-dioksijenaz ve/veya protokatekhuat 3,4-dioksijenaz enzimlerini kullandıkları saptanmıştır. *Meta* yol enzimlerinin (katekol 2,3 dioksijenaz ve protokatekhuat 4,5 dioksijenaz) aktiviteleri ise spektrofotometrik yöntemde belirlenmemiştir.

Song (2009), aromatik hidrokarbon parçalayabilen 15 bakteri izole ederek aromatik hidrokarbonları *orto* parçalama yoluyla parçalayabildiklerini, rothera reaksiyonu ile belirlenmiştir. Protokatekhuat 3,4 dioksijenaz ve katekol 1,2 dioksijenaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak bulunmuştur. *Pseudomonas fluorescens*

izolatında protokatekhuat 3,4 dioksijenaz aktivitesi, *Microbacterium esteraromaticum*'da ise katekol 1,2 dioksijenaz aktivitesinin izolatlar içinde en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Song 2009). Çalışmamızda da, benzer olarak, izolatların aromatik hidrokarbonları β -ketoadipate metabolik yolunun katekol veya protokatekhuat dalı ile *orto* parçalama yoluyla parçaladıkları rothera reaksiyonu ve spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir.

Chang vd. (2011), petrol ile kontamine olmuş bölgelerden aldıkları sediment ve toprak örneklerinden PAH biyoremediasyonu için potansiyel olarak kullanılacak üç suş izole etmişlerdir. *Staphylacoccus* sp. KW-07, *Pseudomonas* sp. CH-11 ve *Ochrobactrom* sp. CH-19 olarak tanımladıkları izolatların PCR amplifikasyon sonuçlarına göre, PAH parçalanmasında rol oynayan katekol dioksijenaz genlerinin (*nahH* genleri) *Staphylacoccus* sp. KW-07 ve *Ochrobactrom* sp. CH-19 izolatlarında kromozomal DNA'da, *Pseudomonas* sp. CH-11 izolatında ise plasmid DNA'sında yer aldığını belirlemişlerdir. Ayrıca, üç izolat arasında fenantren parçalanmasında en etkili suşun, *Staphylacoccus* sp. KW-07 olduğu görülmüştür (Chang *et al.* 2011).

Urszula vd. (2009), Çamurdan izole ettikleri *Stenotrophomonas maltophilia* suşu üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda, monosiklik hidrokarbonları parçalayabilen çeşitli dioksijenaz enzimlerini karakterize etmişlerdir. Farklı *Stenotrophomonas maltophilia* suşları arasında KB2 izolatında ilk kez üç farklı dioksijenaz enziminin aktivitesi saptanmıştır. Benzoat ve katekol ile üreyen hücrelerde katekol 1,2 dioksijenaz aktivitesi belirlenmiştir. Fenol ile inkübe edilen hücrelerde ise katekol 2,3 dioksijenaz aktivitesi saptanmıştır. *p*-hidroksibenzoik asit, protokatekhuat ve vanilik asit ile inkübasyon sonucunda ise protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzim aktivitesi belirlenmiştir (Urszula *et al.* 2009). Bizim çalışmamızda ise katekol 2,3 dioksijenaz enzim aktivitesi saptanmamış, ancak katekol 1,2 dioksijenaz ve protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzim aktivitesi görülmüştür.

Cao vd. (2008), *Pseudomonas putida* P8 izolatı ile yaptıkları çalışmada katabolik enzimlerin MS identifikasyonlarını yaparak, benzoat parçalanmasındaki *orto* veya *meta*

parçalama yolundaki indüksiyonu araştırmışlardır. Benzoat veya suksinat ile birlikte üretilen *Pseudomonas putida* P8 izolatından elde edilen proteinleri, 2-D jel elektroforezinde yürütmüşlerdir. Benzoat ile üretilen izolatlarda 8 farklı protein belirlenmişken bu proteinler suksinat ile üretilen izolatlarda belirlenememiştir. Bu durumun, indükleyici olarak seçilen PAH'a bağlı olarak enzimatik aktivitesinin etkilenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer durum çalışmamızda da görülmüştür: Seçilen PAH indüksiyonuna bağlı olarak spesifik enzim aktiviteleri de değişiklik göstermiştir. C-24, C-27 izolatlarında *p*-hidroksibenzoik asit indüklenmesi sonucunda protokatekhuat 3,4 dioksijenaz aktivitesi görülmüşken; naftalen, fenantren ve piren indüklenmesinde ise bu enzimin aktivitesi saptanmamıştır.

Cao vd. (2008) yaptıkları çalışmada, benzoat parçalanmasında rol alan 8 enzimi MS ile saptamışlardır. Bunlar arasında Cat B (EC 5.5.1.1), Pca I (EC 2.8.3.6) ve Pca F'nin (EC 2.3.1.174) *orto* parçalama enzimleri; Dmp C (EC 1.2.1.32), Dmp D (EC 3.1.1.-), Dmp E (EC 4.2.1.80), Dmp F (EC 1.2.1.10) ve Dmp G'nin (EC 4.1.3.) ise *meta* parçalama yolu enzimleri olduğunu belirlemişlerdir. Sonuç olarak benzoat ile üretilen *Pseudomonas putida* P8 izolatı, *orto* ve *meta* parçalama yolundaki katekol 1,2 dioksijenaz ve katekol 2,3 dioksijenaz enzim aktivitelerini göstermiştir (Cao *et al.* 2008).

Garcia vd. (2005), aromatik bileşikleri parçalayabilen halofilik bakterilerin katabolik çeşitliliklerini araştırmışlardır. Aromatik bileşik olarak benzoik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, sinamik asit, salisiklik asit, fenilasetik asit, fenilpropionik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, *p*-aminosalisiklik asit, *p*-kresol ve fenol kullanmışlardır. Halka parçalayan dioksijenaz enzimlerin varlığını spektrofotometrik yöntem kullanarak belirlemişlerdir. Ayrıca, aromatik halkaları parçalayan dioksijenaz enzimlerini kodlayan gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonlarını yapmışlardır. Sonuçta, izolatların, bizim çalışmamıza benzer olarak β -ketoadipate yolundaki katekol 1,2 dioksijenaz ve protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimleriyle aromatik bileşikleri parçalayabildikleri belirlemişlerdir. Böylece, ılımlı halofilik bakterilerin yüksek tuzluluk koşullarında aromatik bileşikleri parçalayabildiklerini göstermişlerdir (Garcia *et al.* 2005). Garcia vd. (2005)'in çalışmasında *Halomonas organivorans* G16.1 izolatında, en yüksek katekol 1,2

dioksijenaz aktivitesi $360 \pm 15 \text{ nmol dk}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ olarak benzoik asit ile indüklenmesinde belirlenmiştir. En yüksek protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzim aktivitesi ise $900 \pm 69 \text{ nmol dk}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ değeri ile *p*-kumarik asit indüklenmesinde bulunmuştur. Çalışmamızda kullandığımız aromatik hidrokarbonlardan biri olan *p*-hidroksibenzoik asit indüklenmesinde ise katekol 1,2 dioksijenaz enzimi için spesifik enzim aktivitesi en çok $10,84 \pm 2,04 \text{ } \mu\text{mol dk}^{-1} \text{ mg protein}$ değeri ile C-27 izolatında, protokatekhuat 3,4 dioksijenaz (*orto* yol enzimi) enzimi için en yüksek değer, $34,40 \pm 3,04 \text{ } \mu\text{mol dk}^{-1} \text{ mg protein}$ değeri ile C-27 izolatında saptamıştır.

Çalışmamızda *p*-hidroksibenzoik asit indüklenmesi sonucunda, C-52 izolatı dışındaki izolatların hepsinde, katekol 1,2 dioksijenaz (*orto* yol enzimi) aktivitesi belirlenmiştir. C-24, C-27, C-52 izolatlarında ise protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzim aktivitesi belirlenmiştir.

PAH parçalayabildiklerini saptadığımız izolatlardan, DNA ekstraksiyonu yapılmış ve enzim kodlayan gen bölgeleri için spesifik primerler kullanılarak (Garcia *et al.* 2005) PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucunda oluşan ürünler %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Amplifikasyon sonuçlarına göre, katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgesi (444 bç) C-52 izolatı dışındaki tüm izolatlarda belirlenmiştir. C-24, C-27, C-37, C-52 ve CH izolatlarında katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgesi (400 bç) saptanmamıştır. C-41, C-43, C-46, C-50 ve C-51 izolatlarında ise katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgesi (400 bç) belirlenmiştir. Protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgesi (330 bç), C-41, C-43, C-46 ve C-50, C-51 izolatlarında saptanamamıştır. C-24, C-27, C-37, C-52 ve CH izolatlarında ise bu gen bölgesi belirlenmiştir. Bu gen bölgelerinin nükleotid sekans analizleri yapılmış ve sekans analiz sonuçları daha önce sekans analizleri yapılmış olan farklı mikroorganizmalar ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmamıza benzer olarak Garcia vd. (2005)'in çalışmasında da izolatlarda katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan (444 bç), katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodlayan (400

bç) ve protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimini kodlayan (330 bç) muhtemel gen bölgeleri PCR amplifikasyonu ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, katekol 1,2 dioksijenaz ve protokatekhuat 3,4 dioksijenaz gen bölgelerinin varlığı tespit edilerek sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. J21.8 izolatının katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan 444 bç'lik gen bölgesinin sekans analizi sonucunda *Halomonas venusta* ile %99,4 sekans benzerliği gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas* sp. EST1001, *Burkholderia* sp. TH2 ile yüksek oranda sekans benzerliği gösterdiği görülmüştür.

Çalışmamızda, katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgelerinin sekans analizlerinin yapılmasına rağmen, Sadece CH izolatına ait gen bölgesinin sekans analiz sonuçları değerlendirilmiştir. C-24, C-27, C-37, C-41, C-43, C-46, C-50 ve C-51 izolatlarının katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodladığı düşünülen saflaştırılmış olan gen bölgelerinin (444 bç) nükleotid sekans analizleri sırasında primerler iki bölgeye bağlanıp çift sekans okunduğu için bu örneklerin sekans analizleri değerlendirilememiştir.

Çalışmamızda, CH izolatında katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodladığı düşünülen gen bölgesi (444 bç) sekans analizi sonuçları BLAST programı kullanılarak değerlendirilmiştir. *Halomonas organivorans* izolatının katekol 1,2 dioksijenaz kodlayan *catA* geni (%80), *Pseudomonas* sp. 6978 izolatının katekol 1,2 dioksijenaz *catA* geni (%72), *Pseudomonas stutzeri* JM300 izolatının katekol 1,2 dioksijenaz *catA* geni (%73) ile yüksek oranda benzerlik göstermiştir.

Protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimlerini kodlayan muhtemel gen bölgelerinin (330 bç) nükleotid sekans analizi sonuçları, izolatlarda bu gen bölgelerinin bulunduğunu doğrulamaktadır. Sekans analizi sonuçları enzim aktivitelerinin spektrofotometrik ölçümleri ile paralellik göstermektedir. Bu durum, PAH parçalayabilen izolatların parçalanmasında protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimini kullanarak PAH'ları parçalayabildiklerini göstermektedir.

C-24 izolatına ait dizi analizi sonuçları, *Pseudomonas putida* strain DSMZ 2112 protokatekhuat 3,4-dioksijenaz enziminin beta alt ünitesi (*pcaH*) genleri ile %93 sekans benzerliği göstermiştir. C-27 izolatına ait dizi analiz sonucu, *Pseudomonas putida* DSMZ 2112 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta alt ünite (*pcaH*) geni ile %92 oranında benzerlik saptanmıştır. C-37 izolatına ait dizi analiz sonucunun değerlendirilmesinde ise *Pseudomonas putida* DSMZ 2112 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta alt ünite (*pcaH*) geni ile %91 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. C-52 izolatına ait dizi analizi, *Pseudomonas putida* DSMZ 2112 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz beta alt ünite (*pcaH*) genleri ile %93 oranında benzerlik göstermiştir. CH izolatına ait dizi analiz sonucu ile yapılan değerlendirmede *Chromohalobacter* sp. HS2 izolatının protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enziminin beta (*pcaH*) ve alfa alt ünite (*pcaG*) genleri ile %95 oranında benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Çalışmamızda, saflaştırılmış olan katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodladığı düşünülen gen bölgelerinin (400 bç) nükleotid sekans analiz sonuçları BLAST programı ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda; *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 kromozom II ve *Haloarcula hispanica* ATCC 33960 ait hücre bölünmesini kontrol eden gen bölgelerinin sekanslarıyla yüksek oranda (%94-96) benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu durum, katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodladığı düşünülen gen bölgelerinin aslında muhtemelen sadece bu enzimi kodlamadığından kaynaklanabilir. Ancak ileride yapılacak çalışmalarda katekol 2,3 dioksijenaz enzimini kodladığı düşünülen gen bölgelerinin (400 bç) klonlama çalışması yapılarak tekrar sekans analizlerinin gerçekleştirilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, halofilik izolatların PAH'ları β -ketoadipate metabolik yolunda rol oynayan katekol 1,2 dioksijenaz ve protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimlerini kullanarak *orto* parçalama yoluyla parçalayabildikleri belirlenmiştir. Katekol 1,2 dioksijenaz ve protokatekhuat 3,4 dioksijenaz enzimlerini kodlayan gen bölgeleri de saptanmıştır. Ancak, sonuçlarımıza göre, enzimi kodlayan gen bölgeleri izolatlarda

bulunmasına rağmen, enzim aktivitesinin görülmediği durumlar olmuştur. Bu durum, enzim aktivitesinin kullanılan PAH türünden etkilendiğini ve enzimlerin muhtemelen indüklenen proteinlerden olduğunu göstermektedir

Sonuç olarak; C-24, C-27, C-37, C-41, C-43, C-46, C-50, C-51, C-52 ve CH izolatlarının denenen PAH'ları parçalayabildikleri ve yüksek tuzluluk koşullarına sahip ortamlarda PAH'ların biyoremediasyonu için potansiyel olarak kullanılabilceği ortaya koyulmuştur.

Bütün bunlara ilave olarak, PAH'ları parçalayabilen izolatların plazmid veya gen fragmentlerinin, PAH parçalayabilme özelliği olmayan bakterilere transferi, çevrenin daha kısa sürede temizlenmesi için ve çevreci fenotipik karakterlere sahip yeni suşların ortaya çıkmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bunun da, biyoremediasyon çalışmalarıyla ekosistemdeki dengelerinin yeniden kurulmasına büyük katkılar sağlayacağı oldukça açıktır.

İleriye yönelik çalışmalarda, bu çalışmada kullanılan izolatlardan PAH'ların biyolojik parçalanmasında rol oynayan dioksijenaz enzimleri saflaştırılarak enzim yapısı aydınlatılabilir. PAH indüklenmesi sonucu ortaya çıkan protein profilleri belirlenerek bu proteinler tanımlanabilir. PAH'ların biyolojik parçalanması sonucu oluşan metabolitler belirlenebilir. Dioksijenaz enzimlerini kodlayan gen fragmentleri klonlama çalışmaları yapılarak yeni suşlar ortaya çıkarılarak biyoremediasyon çalışmalarında kullanılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Amoozegar, M.A., Malekzadeh, F. and Malik, K.A. (2003). Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of Microbiological Methods*, **52**: 353-359.
- Anonim (1985). Oil in the Sea-Inputs, Fates and Effects. National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, D.C.
- Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F. and Amann, R. (1999). Fluorescence in situ hybridization analysis of the procaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environmental Microbiology*, **1**:517-523.
- Arahal, D.R., Dewhurst, F.E., Paster, B.J., Volcani, B.E. and Ventosa, A. (1996). Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16 S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 3779-3786.
- Archana, C., Fazlurrahman, J., John, G., Oakeshott, R. and Jain, K. (2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation, *Indian Journal of Microbiology*, **48**: 95–113.
- Arulazhagan, P. and Vasudevan, N. (2009). Role of a moderately halophilic bacterial consortium in the biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, **58(2)**: 256–262.
- Arulazhagan, P. and Vasudevan, N. (2011). Role of nutrients in the utilization polycyclic aromatic hydrocarbons by halotolerant bacterial strain. *Journal of Environmental Science (China)*, **23(2)**: 282–287.
- Asker, D. and Ohta, Y. (2002). *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**: 729:738.

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2001). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs, U.S. Department of Health and Human Service, Atlanta, USA.
- Azam, F. and Cho, B.C.(1987). Bacterial Utilization of Organic Matter in the Sea. In: Fletcher M. (Eds) Ecology of Microbial Communities. Cambridge University Press, Cambridge, 261-268.
- Bamforth, S. M. and Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**: 723-736.
- Beşe, M. (1974). Mikrobiyolojide Kullanılan Biyokimyasal Testler ve Besiyeri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara Üniversitesi Yayınevi, Ankara, 298.
- Birbir, M., Kalli, N. and Johansson, C. (2001). Morphological characteristics and sensitivity of extremely halophilic isolates to antibiotics. Plants of the Balkan Paninsula: In to the Next Milleum, Gözükırmızı N., (Eds), II., 45-54.
- Birbir, M., Ogan, A., Calli, B. and Mertoğlu, B. (2004). Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine Turkey. **20**: 613-621.
- Borgne, S.L., Paniagua, D. and Vazquez-Duhalt, R. (2008). Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **15**: 74–92.
- Bostrom, E., Engen, S. and Eide, I. (1998). Mutagecity Testing of organic extracts of diesel exhoust particles after spiling with polycyclic aromotic hydrocarbons. *Archieves of Toxicology*, **72**: 645-649.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive metod for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-258.

- Bruce, R.M., Haber, L. and Mc Clure, P. (1998). Toxicological review of naphthalene Integrated Risk Information System (IRIS).
- Buchan, A., Collier, L.S., Neidle, E.I. and Moran, M.A. (2000). Key aromatic ring cleaving enzyme, protocatechuate 3,4 dioxygenase, in the ecologically important marine *Roseobacter* lineage. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 4662-4672.
- Bugg, T.D.H. (2003). Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron*, **59**: 7075-7101.
- Cao, B., Geng, A. and Chee, L. (2008). Induction of *ortho*- and *meta*- cleavage pathways in *Pseudomonas* in biodegradation of high Benzoat concentration: MS identification of catabolic enzymes, genomics and proteomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **81**: 99-107.
- Castellano, A., V., Cancio, J., L., Aleman, P., S. and Rodriguez, J., S. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air particles in the city of Las Palmas de Gran Canaria. *Environment International*, **29**: 475-480.
- Catterall, F.S., Combs, M.M., Ioannides, C. and Walton, K. (2000). Bioactivation of the carcinogen 11-methoxy-16, 17-dihydro-15-cyclopentalcyclopental [a] phenantrene. *Mutation Research*, **465**: 85-90.
- Cenci, G. and Caldini, G. (1997). Catechol dioxygenase expression in a *Pseudomonas fluorescens* strain exposed to different aromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **47**: 306-308.
- Cerniglia, C.E. (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Advances in Applied Microbiology*, **30**: 31-71.
- Cerniglia, C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, **3**: 351-368.

- Cerniglia, C.E. and Heitkamp, M.A. (1989). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the aquatic environment. *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, Eds), CRC Press, Boca Raton, FL.41–68.
- Cerniglia, C.E., White, G.L. and Heflich, R.H. (1985). Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Archives of Microbiology*, **143**:105-110.
- Chaga, G, Porath, J, and Illeni, T. (1993). Isolation and purification of amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*. *Biomedical Chromatography*, **7**: 256-261.
- Chang, C.H., Lee, J., Ko, B.G., Kim, S.K. and Chang, J.S. (2011). *Staphylococcus* sp. KW-07 contains nahH gene encoding catechol 2,3-dioxygenase for phenanthrene degradation test in soil microcosm, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **65**: 198-203.
- Chen, S. and Liao, C.M. (2006). Health risk assesment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources. *Science of the Total Environment*, **366**:112-123.
- Chen, Y.P., Glenn, A.R. and Dilworth, M.J. (1984). Uptake and oxidation of aromatic substrates by *Rhizobium leguminosarum* MNF 3841 and *Rhizobium trifolii* TA1, *FEMS Microbiology Letters*, **21**: 201–205.
- Cuadros-Orellana, S., Pohlschroder, M. and Durrant, L.R. (2006). Isolation and characterization of halophilic archaea able to grow in aromatic compounds. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **57**: 151–154.
- Cynthia, E., Romero-Arroyo, L., Mark, A., Schell, L., George, L., Games, L. and Ellen, Neidle. (1995). American society for microbiology *catM* encodes a LysR-Type transcriptional activator regulating catechol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* *Journal of Bacteriology*, **177**: 5891–5898.

- Dachs, J. and Eisenreichs S., J. (2000). Adsorption onto aerosol kurum carbon dominates gas-particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environmental Science and Technology*, **34**: 3690-3697.
- Dagley, S. (1975). A biochemical approach to some problems of environmental pollution. *Essays Biochemistry*, **11**: 81-138.
- Danson, M. and Hough, D.W. (1997). The structural basis of protein halophilicity. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **117A (3)**: 307-312.
- Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C.A. and Erarslan, A. (2004). Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. *Journal. of Applied Microbiology*, 96: 320-327.
- Dickhut, R.M., Canuel, E.A., Gustafson, K.E., Liu, K., Arzayus, K.M., Walker, S.E., Edgecombe, G., Gaylor, M.O. and Macdonald, E.H. (2000). Automotive sources of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Associated with Particulate Matter in the Chesapeake Bay Region. *Environmental Science and Technology*, **34**: 4635-4640.
- Emerson, D., Chauhan, S., Oriol, P. and Breznak, J.A. (1994). *Haloferax* sp. D1227, a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compounds. *Archives of Microbiology*, **161**: 445-452.
- EPA.(1993). Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. United States Environmental Protection Agency, EPA/600/R-93/089.
- Epstein, S.S., Bulon, I., Koplán, J., Small, M. and Mantel, N. (1964). Charge-transfer complex formation, carcinogenicity, and photodynamic ctivity in polycyclic compounds. *Nature*, 204(4960), 750-4 (C.A. 62:3196d).
- Esen, F., Taşdemir, Y. and Vardar, N. (2008). Atmospheric concentrations of PAHs, their possible sources and gas-to-particle partitioning at a residential site of Bursa, Turkey. *Atmospheric Research*, **88**: 243–255.

- Fairley, D.J., Boyd, D.R., Sharma, N.D., Allen, C.C.R., Morgan, P. and Larkin, M.J. (2002). Aerobic metabolism of 4 hydroxybenzoic acid in archaea via an unusual pathway involving an intramolecular migration. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 6246–6255.
- Fetzner, S., Muller, R. and Lingens, F. (1989). Degradation of 2-chlorobenzoate by *Pseudomonas cepacia* 2CBS. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **370**: 1173–1182.
- Finlayson-Pitts, B.J. and Pitts, J.N. (1998). Atmospheric chemistry: fundamentals and experimental techniques. John Wiley and Sons, New York.
- Franzmann, P.D., Wehmeyer, U. and Stackebrandt, E. (1988). *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Syst. Applied Microbiology*, **11**: 16–19.
- Frazer, R.W., Livingston, D.M., LaPorte, D.C. and Lipscomb, J.D. (1993). Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas putida* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes. *Journal of Bacteriology*, **175**: 6194–6202.
- Fu, W. and Oriel, P. (1999). Degradation of 3-phenylpropionic acid by *Haloferax* sp. D1227. *Extremophiles*, **3**: 45–53.
- Garcia, M.T., Ventosa, A. and Mellado, E. (2005). Catabolic versatility of aromatic compound degrading halophilic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **54**: 97–109.
- Gessesse, A. and Gashe, B.A. (1997). Production of alkaline xylanases by an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from an alkaline soda lake. *Journal of Applied Microbiology*, **83**: 402–406.
- Glatt, H., Abu-Shquara, E., Harvey, R.G. and Blum, J. (1994). Mutagenicity of K-region oxides and imines of chrysene, benzo [c] phenanthrene and benzo[g]chrysene in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, **308**: 135–141.

- Golomb, D.E. Barry, G., Fisher, P., Varanusupakul, Koledo, M. and Rooney, T. (2001). Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons near New England coastal waters. *Atmospheric Environment*, **35**: 6245-6258.
- Gonzales, C., Gutierrez, C. and Ramirez, C. (1978). *Halobacterium vallismortis* sp. nov. an amyolytic ve carbohydrate metabolizing extremely halophilic bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, **24**:710-715.
- Grant, W.B., Gemmell, R.T. and McGenity, T.J. (1998). Halophiles, In; Horikoshi K., Grant W.D. (Eds) *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environment*, Wiley, New York, 93-132
- Grant, W.D. and Ross, H.N. (1986). The ecology and taxonomy of halobacteria. *FEMS Microbiology Review*, **39**: 9-15.
- Gu, Y.S., Kim, I.S., Ahn, J.K., Park, D.C., Yeum, D.M., Ji, C. and Kim, S.B. (2002). Mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines as affected by muscle types/skin and cooking in pan-roasted mackerel. *Mutation Research*, **515**: 189-195.
- Hall, M. and Grover, P.L. (1990). Polycyclic aromatic hydrocorbanic metabolism. Activation of Humour Inhiration, Chemical Carcinogenesis Mutagenesis I. Er. Cooper, C.S., Grover, P.L. (Eds), Springer-verlag, KG Berlin.
- Halsall, C.J., Sweetman, A.J., Barrie, L.,A. and Jones, K.,C. (2001). Modeling the behaviour of PAHs during atmospheric transport from the UK to the Arctic. *Atmospheric Environment*, **35**: 255-267.
- Han, S., Eltis, L.D., Timmis, K.N., Muchmore, S.W. and Bolin, J.T. (1995). Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading pseudomonad. *Science*, **270**: 976-980.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M. (1993). Basic Labaratory and Culture Techniques in ; Labaratory Exercise in Microbiology, Harley, J.P. nd L.M. Prescott (Eds). 2nd Edn., W.C. Brown Publishers, Dubuque, 14-46.

- Harwood, C.S. and Parales, R.E. (1996). The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology*, **50**: 553–590.
- Hayaishi, O., Katagiri, M. and Rothberg, S.J. (1995). Mechanism of the pyrocatechase reaction. *Journal of American Chemical Society*, **77**: 5450.
- Hirsch, P., and Hoffmann, B. (1989). *Dichotomicrobium thermohalophilum*, gen. nov., spec. nov., budding prosthecate bacteria from the Solar Lake (Sinai) and some related strains. *Applied Microbiology*, **11**: 291–301.
- Hough, D.W. and Danson, M.J. (1989). Archaeobacteria: ancient organisms with commercial potential. *Letters in Applied Microbiology*, **9**: 33-39.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) Evaluations. 2002. Naphthalene, **82**: 367.
- Iwagami, S.G. (1999). Protein Purification and Genetic Characterization of a Streptomycete Protocatechuate 3,4 Dioxygenase. Master of Science, The University of British Columbia, Microbiology and Immunology, Columbia.
- Joshi, B and Walia, S. (1996). PCR amplification of catechol 2,3 dioxygenase gene sequences from naturally occurring hydrocarbon degrading bacteria isolated from petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *FEMS Microbiology Ecology*, **19**: 5-15.
- Kamekura, M. (1999). Alkaliphilic Microorganisms: J. Seckbah (Eds.), Enigmatic Microorganisms and Life in Extrem Environments, Kluwer Academic Publishers, Netherland, 479-485.
- Kamekura, M. and Kates, M. (1999). Structural diversity of membrane lipids in members of *Halobacteriaceae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **63** (6): 969-972.
- Kastner, M., Breuer-Jammali, M. and Mahro, B. (1998). Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic

- hydrocarbons (Pahs) and survival of Pah-degrading bacteria introduced into soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 359–362.
- Kates, M. (1993). Membrane lipids of extreme halophiles: biosynthesis, function and evolutionary significans. In *Halophilic Bacteria, Part II. Experientia*, Edited by R. H. Vreeland. Basel: Birkhäuser Verlag, 49: 1027- 1036.
- Keith, L.H. and Telliard, W.A. (1979). Priority pollutants. I. A perspective view. *Environmental Science and Technology*, **13**: 416–423.
- Kim, I.S., Ritchie, L., Setford, S., Taylor, J., Allen, M., Wilson, G., Heywoo Pahlavanpour B. and Saini, S. (2001). Quantitative immunoassay for determining polyaromatic hydrocarbons in electrical insulating oils. *Analytica Chimca Acta*, **450**: 13-25.
- Kleinsteuber, S., Riis, V., Fetzer, I., Harms, H. and Müller, S. (2006). Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 3531-3542.
- Kojima, Y., Itada, N. and Hayaishi, O.J. (1961). Metapyrocatachase: a new catechol-cleaving enzyme. *Biological Chemistry*, **236**: 2223.
- Kulichevskaya, I.S., Zvyagintseva, I.S., Tarasov, A.L. and Plakunov, V.K. (1992). The extremely halophilic archaeobacteria from some hypersaline ecotops. *Microbiology*, **46**: 51-56.
- Kunte, H.J., Trüper, G. and Stan-Lotter, H. (2001) Halophilic microorganisms. *Astrobiology: The quest for the conditions of life*. Gerda Horneck, Christa Baumstark-Khan (Eds.), Heidelberg: Springer-virlag, ISBN: 3-540-42101-7
- Kushner, D. (1985). The *Halobacteriaceae*. sp. En C. Woese and Wolfe, S. (Eds.), *The bacteria*. Vol 8. Academic Press, London, 171-214.
- Lease, C.W.M., Bentham, R.H., Gaskin, S.E. and Juhasz, A.L. (2011). Isolation and dentification of pyrene mineralizing *Mycobacterium spp.* from contaminated and

uncontaminated sources. *Applied and Environmental Soil Science*, Doi:101155/2011/409643, 11 pg.

- Lee, S.C., Ho, K.F., Chan, L.Y., Zielinska, B. and Chow, J.C. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and carbonyl compounds in urban atmosphere of Hong Kong. *Atmospheric Environment*, **35**: 5949-5960.
- Lee, W.J., Y.F. Wang, T-C. Lin and Y-Y. Chen. (1995). PAH characteristics in the ambient air of traffic source. *The Science of the Total Environment*, **159**: 185-200.
- Lefebvre, O., Vasudevan, N. and Moletta, R. (2005). Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reaktör. *Water Research* **39**: 1471-1480.
- Lima, A.L.C., Farrington, J.W. and Reddy, C.M. (2005). Combustion-derived polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment-a review. *Environmental Forensics*, **6**: 109-131.
- Litchfield, C.D. (2002). Halophiles. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **28**: 21-22.
- Liu, K. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from a coal fired pilot FBC system. *Journal of Hazardous Materials*, **84**: 175-188.
- Lundstedt, S. (2003). Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes. Umea University, Sweden, ISBN 91-7305-452-6.
- Ma, Y., Galinski, E.A., Grant, W.D., Oen, A. and Ventosa, A. (2010). Halophiles 2010: Life in Saline Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 6971-6981.
- Mallick, S., Chatterjee, S. and Dutta, T.K. (2007). A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y via *meta*-cleavage

of 2-hydroxy-1-naphthoic acid: formation of trans-2,3-dioxo-5-(2-hydroxyphenyl)-penta-4-enoic acid, *Microbiology*, **153**: 2104–2115.

Margesin, R. and Schinner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**: 650–663.

Margesin, R. and Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, **5**: 3–83.

Masih, A. and Taneja, A. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) concentrations and related carcinogenic potencies in soil at a semi-arid region of India. *Chemosphere*, **65**: 449-456.

Morgan, A.F. and Dean, H.F. (1985). Chromosomal map of *Pseudomonas putida* PPN, and a comparison of gene order with the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosomal map. *Journal of General Microbiology*, **131**: 885-96.

Mumtaz, M. and George, J. (1995). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. U.S. Department of Health and Human Services, USA.

Ngai, K.L., Neidle, E.L. and Ornston, L.H. (1990) Catechol and chlorocatechol 1,2-dioxygenases. *Methods of Enzymology*. **188**: 122–126.

Nicholson, C.A. and Fathepure, B.Z. (2004). Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 1222-1225.

Nishihara, T., Yamada, T., Takano, K., Osada, S., Nishikawa, J. and Imagawa, M. (2008). Characterization of *phe B* gene encoding catechol 2,3-dioxygenase. *Letters in Applied Microbiology*, **19**: 181-183.

Norris, J.P., Ribbons and D.W. (1971). *Methods in Microbiology*. Addison-Wesley Publishing Company, Academic press 733s. 6A, 1-52.

- Oh, J.M., Kang, E., Min, K.R., Kim, C.K., Kim, Y.C., Lim, J.Y., Lee, K.S., Min, K.H. and Kim, Y. (1997). Structure of catechol 2,3-dioxygenase gene encoded in TOM plasmid of *Pseudomonas cepacia* G4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **234**: 578-581.
- Ohlendorf, D.H., Lipscomb, J.D. and Weber, P.C. (1988). Structure and assembly of protocatechuate 3,4 dioxygenase. *Nature*, **336**: 403-405.
- Ololade, I.A. and Lajide, L. (2010). Exposure level and bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible marine organisms. *Journal of Environmental Indicators*, **5**: 69-88.
- Oren, A. (1994). The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiology. Reviews*, **13**: 415-440.
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology, Reviews*, **63**: 334-348.
- Oren, A. (2000). Life at High Salt Concentrations. In: The prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications, 3rd. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E. (Eds.). Springer-Verlag, New York (electronic publication).
- Oren, A. (2002a) Halophilic microorganism and their environments. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Oren, A. (2002b), Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **28**: 56-63.
- Oren, A. (2002c). Molecular ecology of extremely halophilic *Archaea* and *Bacteria*. *FEMS Microbial Ecology*, **39**: 1-7.

- Oren, A. and Rodriguez-Valera, F. (2001). The contribution of halophilic bacteria to the coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiology Ecology*, **36**: 123-130.
- Ornston, L.N. (1966) The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. II. Enzymes of the protocatechuate pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **241(16)**: 3787-3794.
- Ottow, J.C.G. and Zolg, W. (1974). Improved procedure and colorimetric test for the detection of ortho- and meta-cleavage of protocatechuate by *Pseudomonas* isolates. *Canadian Journal of Microbiology*, **20**: 1059-1061.
- Parke, D. 1997. Acquisition, reorganization, and merger of genes: novel management of the b-ketoadipate pathway in *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, **146**: 3–12.
- Patnaik, P. (1992). Health hazard, which includes toxic, corrosive, carcinogenic, and teratogenic properties, exposure limits. A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substances, Van Nostrand Reinhold, New York, 425–445.
- Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S. and Yao, Q.H. (2008). Microbial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**: 927–955.
- Post, F.J. and Collins, N.F. (1982). A preliminary investigation of the membrane lipid of *Halobacterium halobium* as a food additive. *Journal of Food Biochemistry*, **6**: 25-38.
- Pyrz, J.W., Roe, A.L., Stern, L.J. and Que, L. (1985). Biosynthesis of 3,5-dihydroxyphenylglycine. *Journal of American Chemical Society*, 107-614.
- Quesada, E., Ventosa, A., Rodriguez-Valera, F. and Ramos-Cormenzana. (1982). Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *Journal of Applied Bacteriology*, **53**: 155-61.

- Ravindra, K., Bencs, L., Wauters, E., Hoog, J., Felix, D., Roekens, E., Bleux, N., Berghmans, P. and Van Grieken, R. (2006). Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmospheric Environment*, **40**: 771-785.
- Ri-He, P., Ai-Sheng, X. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons, *FEMS Microbiology Reviews*, **32(6)**: 927-955.
- Rockne, K.J. and Strand, S.E. (2001). Anaerobic biodegradation of phenanthrene, naphthalene and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. *Water Research*. **35(1)**: 291-299.
- Rodriguez-Valera, F. (1988). Characteristics and Microbial Ecology of Hypersaline Environments. In: Halophilic Bacteria, F. Rodriguez-Valera (Eds.), V.I, CRC Press, Boca Raton, Florida, 3-30.
- Rodriguez-Valera, F. Ventosa, A.; Juez, G. and Imhoff, J.F. (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi pond saltern *Microbial Ecology*, **11**: 107-115.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. and Ramos-Cormenzana, A. (1979). Isolation of extreme halophiles from seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, **38**: 164-165.
- Roeßler, M. and Müller, V. (2001). Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental Microbiology*, **3**: 743-759.
- Romero-Steiner, S., Parales, R.E., Harwood, C.S. and Houghton, J.E. (1994). Characterization of the *pcaR* regulatory gene from *Pseudomonas putida*, which is required for the complete degradation of *p*-hydroxyBenzoat. *Journal of Bacteriology*, **176 (18)**: 5771-5779.
- Rothmel, R.K., Aldrich, T.L., Houghton, J.E., Coco, W.M., Ornston, L.N. and Chakrabarty, A.M. (1990). Nucleotide sequencing and characterization of

Pseudomonas putida catR: a positive regulator of the *catBC* operon is a member of the LysR family. *Journal of Bacteriology*, **172**: 922–931.

Saleha H. (2008). Literature overview: microbial metabolism of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons, *Remediation*, 131-161, DOI: 10.1002/rem.20165.

Saxena, P. and Thakur, I.S. (2005). Purification and characterization of catechol 1,2 dioxygenase of *Pseudomonas fluorescens* for degradation of 4-chlorobenzoic acid. *Indian Journal of Biotechnology*, **4**: 134-138.

Sellek, G.A. and Chaudhuri, J.B. (1999). Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Biotechnology*, **25**: 471-482.

Seo, J.S., Keum and Y.S., Li, Q.X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **6**: 278- 309.

Shahmohammadi, H.R., Asgarani, E., Teratı, H., Saito, T., Ohyama, Y., Gekko, K., Yamamoto, O. and Ide, H. (1998). protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance *Halobacterium salinarum* against DNA-damaging agents. *Journal of Radiation Research*, **39 (4)**: 251-262.

Shand, R.F. and Perez, A.M. (1999). Haloarchaeal growth physiology IN: J. Seckbah (Eds.) Enigmatic microorganisms and life in extreme environments, Kluwer Academic Publisher Dordrecht, 414-424.

Song, Y.J. (2009). Characterization of aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from pine litter. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, **37**: 333–339.

Stanier, R.Y. and Ingraham, J.L. (1954). Protocatechuic acid oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **210**: 799–808.

- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. and Doudoroff, M. (1966). The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology*, **43**: 159–271.
- Sugimoto, K., Senda, T., Aoshima, H., Masai, E., Fukuda, M. and Mitsui, Y. (1999). Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4,5-dioxygenase, under aerobic conditions. *Structure*, **7**: 953-965.
- Sutherland, J.B., Rafii, F., Khan, A.A., Cerniglia and C.E. (1995). Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*, Young, L.Y., Cerniglia, C.E., (Eds.), Wiley- Liss, New York, 269–306.
- Strachan, P.D., Freer, A.A. and Fewson, C.A. (1998). Purification and characterization of catechol 1,2- dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing of its catA gene. *Biochemhical Journal*, **333**: 741-747.
- Tao, X.Q., Lu, G.N., , Dang, Z., Yang, C. and Yi, X.Y. (2007). A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp.GY2B isolated from contaminated soils. *Process Biochemistry*, **42**: 401-408.
- Tapilatu, Y.H., Grossi, V., Acquaviva, M., Milton, C., Bertrand, J.C. and Cuny, P. (2010). Isolation of hydrocarbon degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). *Extremophiles*, **14**: 225-231.
- Temizkan, G., Yılmaz, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, A.T. ve Arda, N. (2004). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Temizkan, G., Arda, N., İstanbul Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği, Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEN), Nobel Tıp Kitabevleri, No.2.
- The International Programme on Chemical Safety, Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations (IPCS INCHEM). (1983). Naphthalene, Naphthalene Chronic Toxicity Summary, 45.

- Tindall, B. J. (1992). The family *Halobacteriaceae* .in the prokaryotes: A hand book on the biology of bacteria. Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications. 2nd Editions Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M.,Schleifer, H.Eds.,New York, Springer, 768-810.
- Torreblanca, M., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A, Kamekura, M. and Kates, M. (1986). Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. system. *Applied Microbiology*, **8**: 89-99.
- Trigui, H., Masmoudi,S., Brochier-Armanet, C., Maalej, S. and Dukan, S. (2011). Characterization of *Halorubrum sfaxence* sp. nov., a New Halophilic Archaeon Isolated from the Solar Saltern of Sfax in Tunisia. *International Journal of Microbiology*, Doi: 10.1155/2011/240191.
- Urszula, G., Izabela, G., Danuta, W and Sylwia, L. (2009). Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. *Brazilian Journal of Microbiology*, **40**: 285-291.
- Ventosa, A. and Nieto, J.J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and. Biotechnology*, **11**: 85-94.
- Vetting, M.W. and Ohlendorf, D.H. (2000). Crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. *Structure*, **8**: 429-440.
- Vetting, M.W., Earhart, C.A. and Ohlendorf, D.H. (1994). Crystallization and preliminary X-ray analysis of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Molecular Biology*, **236**: 372-373.
- Wang, C.L., You, S.L. and Wang, S.L. (2006). Purification and characterization of a novel catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a carbon source. *Process Biochemistry*, **41**: 1594-1601.

- Ward, D.M. and Brock, T.D. (1978). Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **35**: 353-359.
- Wheelis, M.L, and Stanier, R.Y. (1970). The genetic control of dissimilatory pathways in *Pseudomonas putida*. *Genetics*, **66**: 245-266.
- WHO. (1998). Regional Office for Europe. Copenhagen, Denmark.
- Wolfe, D.E. (1977). Fates and effects of petroleum hydrocarbons in marine organism and ecosystems. Pergamon Pres, Inc., Elmsford New York.
- Wu, M.L., Nie, M.Q., Wang, X.C. and Cao, W. (2010). Analysis of phenanthrene biodegradation by using FITIR, UV and GC-MS. *Spectrochimica Acta Part A*, **75**: 1047-1050.
- Young, C.H., Woo, S.H. and Park, J.M. (2006). Effects of intermediate metabolites on phenanthrene. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**: 969-973.
- Zhao, B., Wang, H., Mao, X. and Li, R. (2009). A rapid screening method for bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Letters in Applied Microbiology*, **49**: 408-410.
- Zheng, Z. and Obbard, J.P. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbon removal from soil by surfactant solubilization and *Phanerochaete chrysosporium* oxidation. *Journal of Environmental Quality*, **31**: 1842–1847.
- Zheng, Z. and Obbard, J.P. (2003) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal isolates from an oil contaminated refinery soil. *Environmental Science and Pollution Research*, **10**: 173–176.
- Zvyagintseva, I.S. and Tarasov, A.L. (1988). Extreme halophilic bacteria from saline soils. *Microbiology*, **56**: 664-668.
- Zylstra, G.J., Olsen, R.H. and Ballou, D.P. (1989). Genetic organization and sequence of the *Pseudomonas cepacia* genes for the alpha and beta subunits of protocatechuate 3,4-dioxygenase. *Journal of Bacteriology*, **171**: 5915-5921.

İnternet Kaynakları

- 1- <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/92-pahs.pdf> , 01.11.2010
2. www.atsdr.cdc.gov , 03.06.2010
- 3- [microbiol.unimelb.edu.au / staff/ mds/HaloHandbook](http://microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook) , 03.06.2010
- 4-www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook, 15.05.2010
- 5-http://en.wikipedia.org/wiki/File:4-Hydroxybenzoic_acid.svg, 07.12.2011
- 6-<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 08.08.2011

EKLER

İzolatların Dizi Analizi Sonrası Belirlenen BLAST Sonuçları

EK 1 Katekol 1,2 dioksijenaz enzimini kodlayan muhtemel gen bölgelerinin nükleotid sekans analizi sonuçları

CH

CGTCAGTGAGGGCGAGGCACGCATGGATGATGGCACGGATACCGACGCCGAGGTC
ATGTGGCTGACCGGGCAGGTCCGCGATACCGATGGCAACCCGATCCCTGACGCCCA
GGTCGAGATATGGCACGCCGATTCCAAGGGCAACTACTCCTTCTTCGATCCGTCCC
AGTCGGACTACAACCTGCGCCGGATCATCATGGTCGACGCGGAAGGGCGCTACCGG
GTGCGCAGCATCATTCTTCCGTTATGGCGTACCCCCGAAAGTCCGACCGACCA
GGTGCTGTGCGCCTTGGGCCGCCATGGCCAGCGCCCGGCGCATATTCACCTTCTTCAT
CTCTGCGCCGGGGTACCGTCATCTGACCCCCAGATAAAAACA

[Descriptions](#)

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem
BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FN997643.1	Halomonas organivorans partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase	322	322	93%	1e-84	80%	
AB047272.1	Pseudomonas sp. CA10 cat operon (catR, catB, catC, catA, ORFcat5, ORFcat6, ORFcat7, ORFcat8), complete cds	210	210	97%	5e-51	73%	
CP002824.1	Enterobacter aerogenes KCTC 2190, complete genome	203	203	92%	8e-49	73%	
EU169353.1	Uncultured bacterium clone 21-5-7 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	197	197	91%	3e-47	73%	
EU169380.1	Pseudomonas sp. 6978 clone 3 catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	196	196	96%	1e-46	72%	
EU169355.1	Uncultured bacterium clone 21-20-5 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	194	194	91%	4e-46	72%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU169354.1	Uncultured bacterium clone 24-16-3 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	194	194	91%	4e-46	72%	
EU169352.1	Uncultured bacterium clone 21-19-6 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	194	194	91%	4e-46	72%	
HM192766.1	Pseudomonas sp. 3.5.4 catechol 1,2-dioxygenase gene, partial cds	192	192	69%	1e-45	76%	
AY882595.1	Uncultured organism clone o-xyl catechol-1,2-dioxygenase (C12O) gene, partial cds	185	185	96%	2e-43	72%	
AE015451.1	Pseudomonas putida KT2440 complete genome	185	330	96%	2e-43	72%	
D37782.1	Pseudomonas putida gene for catechol 1,2-dioxygenase, complete cds	185	185	96%	2e-43	72%	
CP002727.1	Pseudomonas fulva 12-X, complete genome	183	183	96%	8e-43	71%	
CP002290.1	Pseudomonas putida BIRD-1, complete genome	181	337	96%	3e-42	72%	
EU169359.1	Uncultured bacterium clone 34-2-9 putative catechol 1,2-dioxygenase-like (catA) gene, partial sequence	179	179	91%	9e-42	72%	
AB286694.1	Uncultured bacterium C12O gene for catechol 1,2-dioxygenase, partial cds, clone: 116-T	179	179	70%	9e-42	76%	
CP002870.1	Pseudomonas putida S16, complete genome	178	325	93%	3e-41	72%	
CP001891.1	Klebsiella variicola At-22, complete genome	178	178	94%	3e-41	71%	
CP000964.1	Klebsiella pneumoniae 342, complete genome	178	178	94%	3e-41	71%	
AB286681.1	Uncultured bacterium C12O gene for catechol 1,2-dioxygenase, partial cds, clone: 103-T	176	176	70%	1e-40	75%	
AJ617556.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, isolate JM300	176	176	78%	1e-40	73%	
AJ880094.1	Pseudomonas chloritidismutans partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase	176	176	64%	1e-40	76%	
CP000094.2	Pseudomonas fluorescens Pf0-1, complete genome	174	314	78%	4e-40	73%	
FM209186.1	Pseudomonas aeruginosa LESB58 complete genome sequence	174	174	97%	4e-40	71%	
AE004091.2	Pseudomonas aeruginosa PAO1, complete genome	174	174	97%	4e-40	71%	
AJ633095.1	Pseudomonas balearica partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, isolate LS401	174	174	71%	4e-40	75%	
AJ633094.1	Pseudomonas balearica partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, strain SP1402	174	174	71%	4e-40	75%	
FJ237621.1	Pseudomonas sp. B3-1 catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, complete cds	172	172	96%	1e-39	71%	
CP000949.1	Pseudomonas putida W619, complete genome	172	172	93%	1e-39	71%	
AB286709.1	Uncultured bacterium C12O gene for catechol 1,2-dioxygenase, partial cds, clone: 131-N	172	172	70%	1e-39	75%	
CT573326.1	Pseudomonas entomophila str. L48 chromosome, complete sequence	172	172	96%	1e-39	71%	
AF363241.1	Pseudomonas putida CatA gene, complete cds	172	172	96%	1e-39	71%	
AY029000.1	Pseudomonas putida catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, complete cds	172	172	96%	1e-39	71%	
EU503129.1	Pseudomonas sp. XP-M2 catechol 1,2-dioxygenase gene,	170	170	97%	5e-39	71%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	complete cds						
EU169358.1	Uncultured bacterium clone 12-20-3 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	170	170	93%	5e-39	70%	
EU169342.1	Uncultured bacterium clone 1-4-7 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	170	170	96%	5e-39	71%	
EU169335.1	Uncultured bacterium clone 7-2-4 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	170	170	96%	5e-39	71%	
EU000396.1	Pseudomonas putida strain N6 catechol 1,2-dioxygenase gene, partial cds	170	170	96%	5e-39	71%	
AY658905.1	Synthetic construct Pseudomonas aeruginosa clone FLH047540.01F PA2507 gene, partial cds	170	170	97%	5e-39	71%	
CP002620.1	Pseudomonas mendocina NK-01, complete genome	168	168	97%	2e-38	71%	
GQ247562.1	Pseudomonas sp. YF1 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	168	168	98%	2e-38	71%	
CP000926.1	Pseudomonas putida GB-1, complete genome	168	447	96%	2e-38	71%	
CP000438.1	Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14, complete genome	168	168	97%	2e-38	71%	
U12557.1	Pseudomonas putida catBCA regulatory protein CatR (catR), muconate lactonizing enzyme (catB), muconolactone isomerase (catC) and catechol oxygenase (catA) genes, complete cds	168	168	93%	2e-38	71%	
EU169371.1	Uncultured bacterium clone 4-16-1 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	167	167	96%	6e-38	71%	
EU169367.1	Uncultured bacterium clone 12-20-4 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	167	167	96%	6e-38	71%	
EU169340.1	Uncultured bacterium clone 4-1-3 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	167	167	96%	6e-38	71%	
EU169336.1	Uncultured bacterium clone 10-3-4 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	167	167	96%	6e-38	71%	
EU169334.1	Uncultured bacterium clone 10-4-8 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	167	167	96%	6e-38	71%	
AJ617524.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, isolate LSMN2	167	167	64%	6e-38	75%	
D37783.1	Pseudomonas arvilla gene for catechol 1,2-dioxygenase, complete cds	167	167	96%	6e-38	71%	
EU169370.1	Uncultured bacterium clone 38-9-3 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	165	165	96%	2e-37	71%	
EU169369.1	Uncultured bacterium clone 35-9-4 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	165	165	96%	2e-37	71%	
AY882596.1	Uncultured organism clone m-xyl catechol-1,2-dioxygenase (C12O) gene, partial cds	165	165	81%	2e-37	72%	
HM192761.1	Pseudomonas sp. 1.4.4 catechol 1,2-dioxygenase gene, partial cds	161	161	66%	2e-36	74%	
EU169375.1	Uncultured bacterium clone 13-4-1 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	161	161	96%	2e-36	70%	
EU169366.1	Uncultured bacterium clone 26-5-4 putative catechol 1,2-	161	161	96%	2e-36	70%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	dioxygenase (catA) gene, partial cds						
EU169347.1	Uncultured bacterium clone 2-16-6 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	161	161	96%	2e-36	70%	
AB177762.1	Wautersia numazuensis phtR, phtA, phtB, phtC, phtD, phtE, phtF and C23Dt genes for phenol hydroxylase regulator protein, phenol hydroxylase components and catechol 2,3-dioxygenase, complete cds, strain: TE26	161	161	96%	2e-36	70%	
AJ617555.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, strain DSM 50238	161	161	64%	2e-36	74%	
AJ617523.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, isolate AN11	161	161	64%	2e-36	74%	
CP002881.1	Pseudomonas stutzeri ATCC 17588 = LMG 11199, complete genome	159	159	69%	9e-36	74%	
CP002622.1	Pseudomonas stutzeri DSM 4166, complete genome	159	159	69%	9e-36	74%	
CP000744.1	Pseudomonas aeruginosa PA7, complete genome	159	159	97%	9e-36	70%	
CP000712.1	Pseudomonas putida F1, complete genome	159	312	97%	9e-36	72%	
DQ026294.1	Pseudomonas sp. M1 phenol hydroxylase subunit (phcP), phenol hydroxylase subunit (phcO), phenol hydroxylase subunit (phcN), phenol hydroxylase subunit (phcM), phenol hydroxylase subunit (phcL), phenol hydroxylase subunit (phcK), transcriptional regulator (phcR), and catechol 1,2-dioxygenase (phcA) genes, complete cds	158	158	98%	3e-35	70%	
EU169341.1	Uncultured bacterium clone 1-11-3 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	156	156	96%	1e-34	70%	
AJ617516.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, isolate A95/69	156	156	79%	1e-34	72%	
EU169381.1	Pseudomonas sp. 6978 clone 4 catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	154	154	76%	4e-34	72%	
AB286714.1	Uncultured bacterium C12O gene for catechol 1,2-dioxygenase, partial cds, clone: 136-N	154	154	70%	4e-34	73%	
AB286682.1	Uncultured bacterium C12O gene for catechol 1,2-dioxygenase, partial cds, clone: 104-TLN	154	154	70%	4e-34	73%	
EU169368.1	Uncultured bacterium clone 32-2-8 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	152	152	96%	1e-33	70%	
AB286710.1	Uncultured bacterium C12O gene for catechol 1,2-dioxygenase, partial cds, clone: 132-N	152	152	70%	1e-33	73%	
CP000090.1	Ralstonia eutropha JMP134 chromosome 1, complete sequence	152	152	92%	1e-33	70%	
CP000076.1	Pseudomonas fluorescens Pf-5, complete genome	152	152	81%	1e-33	71%	
AJ633076.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase	152	152	62%	1e-33	74%	
AJ617519.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, strain ATCC 17591	152	152	64%	1e-33	73%	
EU169383.1	Ralstonia eutropha JMP134 catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	150	150	76%	5e-33	72%	
EU169373.1	Uncultured bacterium clone 36-16-8 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	150	150	94%	5e-33	70%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU169363.1	Uncultured bacterium clone 33-3-6 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	150	150	69%	5e-33	73%	
CP000304.1	Pseudomonas stutzeri A1501, complete genome	150	150	69%	5e-33	73%	
CP000489.1	Paracoccus denitrificans PD1222 chromosome 1, complete sequence	150	150	76%	5e-33	71%	
HM192764.1	Pseudomonas putida strain TX2 catechol 1,2-dioxygenase gene, partial cds	149	149	66%	2e-32	74%	
GQ848198.1	Pseudomonas putida strain DOT-T1E salicylate degradation gene cluster, partial sequence	149	287	94%	2e-32	69%	
EU169357.1	Uncultured bacterium clone 25-17-5 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	149	149	94%	2e-32	69%	
EU169337.1	Uncultured bacterium clone 11-4-5 putative catechol 1,2-dioxygenase (catA) gene, partial cds	149	149	94%	2e-32	69%	
AB286706.1	Uncultured bacterium C12O gene for catechol 1,2-dioxygenase, partial cds, clone: 128-L	149	149	70%	2e-32	73%	
AJ633075.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase	149	149	64%	2e-32	73%	
AJ633074.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase	149	149	64%	2e-32	73%	
AJ633073.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase	149	149	64%	2e-32	73%	
AJ633071.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase	149	149	64%	2e-32	73%	
AJ617525.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, isolate ST27MN2	149	149	64%	2e-32	73%	
AJ617522.1	Pseudomonas stutzeri partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase, isolate AN10	149	149	64%	2e-32	73%	
HM192767.1	Pseudomonas putida strain 3.5.8 catechol 1,2-dioxygenase gene, partial cds	147	147	67%	5e-32	73%	

> [emb|FN997643.1|](#) Halomonas organivorans partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase

Length=974

Score = 322 bits (356), Expect = 1e-84
 Identities = 291/362 (80%), Gaps = 13/362 (4%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 20   CGCATGGATGATGGCACGGATACCGACGCCGAGGTCATGTGGCTGACCGGGCAGGTCCGC 79
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 363   CGCATGGACGACGGCACCGATAGCGACGCCGAGGCGATGTGGCTGACCGCCAGGTGCGC 422

Query 80   GATACCGATGGCAACCCGATCCCTGACGCCAGGTCGAGATATGGCACGCCGATTCCAAG 139
          || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 423   GACACCGACGGCCAGCCGGTGGCCGGGGCCAAGGTCGAGATCTGGCACGCCGACTCCAAG 482

Query 140  GGCAACTACTCCTTCTTCGATCCGTCCAGTCGACTACAACCTGCGCCG---GATCATC 196
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 483   GGCGGCTACTCCTTCTTCGACCCGTGCGAGGCCGAGTACAACCTGCGCCGCTCGATCATC 542

Query 197  ATGGTCGACGCGGAAGGGCGCTACCGGGTGCAGCATCATTCCTTCCGGTTATGGCGTA 256
  
```



```

Query 232 CATCATTCCTTCCGGTTATGGCGTACCCCCGAAAGTCCGACCGACCAGGTGCT--GTCG 289
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 189 CATCGTGCCGTCCGGCTACGGCTGCTCGCCGGATGGTCCGACCGAGGAAGTGCATCT 248

Query 290 GCCTTGGGCCGCCATGGCCAGCGCCCGGCGCATATTCACTTCTTCATCTCTGCGCCGGG 348
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 249 GC--TCGGCCGTCACGGGCAGCGTCCGGCGCATATTCACTTCTTCATCTCCGCGCCGGG 305

```

> [emb|AJ880094.1|](#) Pseudomonas chloritidis mutans partial catA gene for catechol 1,2-dioxygenase
Length=312

Score = 176 bits (194), Expect = 1e-40
Identities = 184/242 (76%), Gaps = 0/242 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 113 GTCGAGATATGGCACGCCGATTCGAAGGGCAACTACTCCTTCTTCGATCCGTCGCCAGTCCG 172
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 70 GTCGACCTGTGGCACGCAAACACCAAGGGCAACTATTCCTACTTCGACAAGAGCCAGTCC 129

Query 173 GACTACAACCTGCGCCGATCATCATGGTCGACGCGGAAGGGCGCTACCGGGTGCAGCAGC 232
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 130 GACTACAACCTGCGTCGGCGCATCGTCACCGACGAGAACGGCTGTACCGCGCGCGCAGC 189

Query 233 ATCATTCTTCCGGTTATGGCGTACCCCCGAAAGTCCGACCGACCAGGTGCTGTCCGGCC 292
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 190 ATCGTGCCTTCCGGCTATGGCTGCTCGCCCGACGGTCCGACCGAGGAGGTGCTCGACACC 249

Query 293 TTGGGCCGCCATGGCCAGCGCCCGGCGCATATTCACTTCTTCATCTCTGCGCCGGGGTAC 352
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 250 CTCGGCCGCCACGGCCAGCGTCCGGCGCATATCCATTTCTTCATCTCCGCGCCGGGGTAT 309

Query 353 CG 354
      ||
Sbjct 310 CG 311

```

> [gb|CP002824.1|](#) Enterobacter aerogenes KCTC 2190, complete genome
Length=5280350

Features in this part of subject sequence:
[hemagglutinin domain-containing protein](#)
[catechol 1,2-dioxygenase](#)

Score = 203 bits (224), Expect = 8e-49
Identities = 259/352 (74%), Gaps = 11/352 (3%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 17 GCACGCATGGATGATGGCACGGATACCGACGCCGAGGTCATGTGGCTGACCGGGCAGGTC 76
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 4265061 GCCCGCATGGATGATGGCACCGA---CGCCGCGAAGTGTGTGGCTGCACGGCCAGGTT 4265005

Query 77 CGCGATACCGATGGCAACCCGATCCCTGACGCCCCAGGTCGAGATATGGCACGCCGATTCC 136
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 4265004 AAAGATAGCCAGGGCCAGCCGATCGCTAACGCCATCGTTGATATCTGGCACGCCAATACC 4264945

Query 137 AAGGGCAACTACTCCTTCTTCGATCCCGTCCAGTCCGACTACAACCTGCGCCGGATCATC 196
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 4264944 CTGGGTAATTACTCGTTCTTCGATCAGAGCCAGAGCGACTACAACCTGCGTCG--TCGTA 4264887

Query 197 ATGGT--CGACGCGGAAGGGCGCTACCGGGTGCAGCAGCATCATTCTTCCGGTTATGGCG 254
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 4264886 TTCGCACCGGCGCGATGGCCGCTATAGCGTGCAGCAGCATGCCATCCGGCTACGGCT 4264827

Query 255 TACCCCGGAAAGTCCGACCGACCAGGTGCTG--TCGGCCTTGGGCCCATGGCCAGCG 312
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 4264826 GCCCGCCGATGGTCCAACCCAGAGTTGCTGGATCAG--TTAGGCCGCCACGGCAACCG 4264769

Query 313 CCCGGCGCATATTCACTTCTTCATCTCTGCGCCGGGTACCGTCATCTGACC 364
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 4264768 TCCGGCACACATTCACTTCTTCGTTCTCCGCGCCGGGCATAAACATCTGACC 4264717

```



```

Sbjct  919  GATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGT  978
Query  181  ATCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTTGTCACAGTTGACGTTG  240
      |||
Sbjct  979  ATCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTTGTCACAGTTGACGTTG  1038
Query  241  AAAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGAATAAGGGCCCCAAAGGCGGCTCATACTATGAG  300
      |||
Sbjct  1039  AAAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGAATAAGGGCCCCAAAGGCGGCTCATACTATGAG  1098
Query  301  TACGAATTTTCGATTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGTATTTT  343
      |||
Sbjct  1099  TACGAATTTTCGATTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGTACTTC  1141

```

[gb|AY596298.1|](#) Haloarcula marismortui ATCC 43049 chromosome II, complete sequence
 Length=288050

Features in this part of subject sequence:
[cell division control protein 6 homolog 1](#)

Score = 569 bits (308), Expect = 3e-159
 Identities = 331/342 (97%), Gaps = 1/342 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query  2      AGCGCATGTTGCGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGAATTAA  61
      |||
Sbjct  50613  AGCGCATG-TGAGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGAATTAA  50555
Query  62      CTCGCTTGCCAACACAGAGCAAAGTACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG  121
      |||
Sbjct  50554  CTCGCTTGCCAACACAGAGTAAAGTACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG  50495
Query  122     ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA  181
      |||
Sbjct  50494  ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTATGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA  50435
Query  182     TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTTGTCACAGTTGACGTTGA  241
      |||
Sbjct  50434  TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTTGTCACAGTTGACGTTGA  50375
Query  242     AAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGAATAAGGGCCCCAAAGGCGGCTCATACTATGAGT  301
      |||
Sbjct  50374  AAGGATTCCTGGACGTAGATGAACAGAATAAGGGCCCCAAAGGGGCTCATACTATGAGT  50315
Query  302     ACGAATTTTCGATTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGTATTTT  343
      |||
Sbjct  50314  ACGAATTTTCGATTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGTACTTC  50273

```

C-43

AGCGCATGCTGCGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGA
 ATTAAGTTCGCTTGCCAACACAGAGCAAAGTACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGA
 GCGGGAGGATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATG
 GCTGCAAAGCGTATCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTT
 GTCACAGTTGACGTTGAAAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGAATAAGGGCCCC
 AAAGGCGGCTCATACTATGAGTACGAATTTTCGATTCGCGCAGATTTGGCACAGGA
 AGTATTTCTTCGACCCCAGCGGTAAA

[Descriptions](#)

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP002922.1	Haloarcula hispanica ATCC 33960 chromosome II, complete sequence	614	614	95%	2e-172	99%	
AY596298.1	Haloarcula marismortui ATCC 43049 chromosome II, complete sequence	564	564	95%	2e-157	96%	

[gb|CP002922.1|](#) Haloarcula hispanica ATCC 33960 chromosome II, complete sequence
Length=488918

Features in this part of subject sequence:

[cell division control protein 6](#)

Score = 614 bits (332), Expect = 2e-172
Identities = 339/342 (99%), Gaps = 1/342 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      AGCGCATGCTGCGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAGTTCGCGACGAATTAA 60
            |||
Sbjct 801    AGCGCATG-TGCGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAGTTCGCGACGAATTAA 859

Query 61     CTCGCTTGCCAACACAGAGCAAACACTGACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG 120
            |||
Sbjct 860     CTCGCTTGCCAACACAGAGCAAACACTGACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG 919

Query 121    ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA 180
            |||
Sbjct 920     ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA 979

Query 181    TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTGACACCGGTTGTACAGTTGACGTTGA 240
            |||
Sbjct 980     TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTGACACCGGTTGTACAGTTGACGTTGA 1039

Query 241    AAGGGTTCTCTAGACGTAGACGAACAGATAAGGGCCCCAAAGGCGGCTCATACTATGAGT 300
            |||
Sbjct 1040    AAGGGTTCTCTAGACGTAGACGAACAGATAAGGGCCCCAAAGGCGGCTCATACTATGAGT 1099

Query 301    ACGAATTTTCGATTTCGCGCAGATTTGGCACAGGAAGTATTTC 342
            |||
Sbjct 1100    ACGAATTTTCGATTTCGCGCAGATTTGGCACAGGAAGTACTTC 1141
  
```

[gb|AY596298.1|](#) Haloarcula marismortui ATCC 43049 chromosome II, complete sequence
Length=288050

Features in this part of subject sequence:

[cell division control protein 6 homolog 1](#)

Score = 564 bits (305), Expect = 2e-157
Identities = 330/342 (96%), Gaps = 1/342 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      AGCGCATGCTGCGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAGTTCGCGACGAATTAA 60
            |||
Sbjct 50613   AGCGCATG-TGAGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAGTTCGCGACGAATTAA 50555
  
```

```

Query 61      CTCGCTTGCCAACACAGAGCAAACACTGACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG 120
          |||
Sbjct 50554    CTCGCTTGCCAACACAGAGTAAACTGACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG 50495

Query 121     ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA 180
          |||
Sbjct 50494    ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTATGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA 50435

Query 181     TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTTGTCACAGTTGACGTTGA 240
          |||
Sbjct 50434    TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTTGTCACAGTTGACGTTGA 50375

Query 241     AAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGAATAAGGGCCCCAAAGGCGGCTCATACTATGAGT 300
          |||
Sbjct 50374    AAGGATTCCTGGACGTAGATGAACAGAATAAGGGCCCCAAAGGGGGCTCATACTATGAGT 50315

Query 301     ACGAATTTTCGATTTCGCGCAGATTTGGCACAGGAAGTATTTTC 342
          |||
Sbjct 50314    ACGAATTTTCGATTTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGTACTTC 50273

```

C-46

AGCGCATGTGCGACAGGCGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGAATT
 AACTCGCTTGCCAACACAGAGCAGAACTGACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGC
 GGGAGGATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCT
 GCAAAGCGTATCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTTGTC
 ACAGTTGACGTTGAAAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGAATAAGGGCCCCAAA
 GGCGGCTCATACTATGAGTACGAATTTTCGATTTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGT
 ATTTCTTCGATCCCAGCCAGTAACNT

[Descriptions](#)

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem
 BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP002922.1	Haloarcula hispanica ATCC 33960 chromosome II, complete sequence	614	614	94%	2e-172	99%	
AY596298.1	Haloarcula marismortui ATCC 43049 chromosome II, complete sequence	564	564	94%	2e-157	96%	

```

>  gb|CP002922.1| Haloarcula hispanica ATCC 33960 chromosome II, complete
sequence
Length=488918

```

Features in this part of subject sequence:

[cell division control protein 6](#)

Score = 614 bits (332), Expect = 2e-172
 Identities = 339/342 (99%), Gaps = 2/342 (1%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1      AGCGCATGTGCGACAGGC-GACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGAATTAAC 59
          |||
Sbjct 801     AGCGCATGTGCGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGAATTAAC 860

```


GCGGGAGGATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATG
 GCTGCAAAGCGTATCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTT
 GTCACAGTTGACGTTGAAAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGAATAAGGGCCCC
 AAAGGCGGCTCATACTATGAGTACGAATTTTCGATTCGCGCGGATTTGGCACAGGA
 AGTATTTCTTCGACCCAGCGGTAAC

T

[Descriptions](#)

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP002922.1	Haloarcula hispanica ATCC 33960 chromosome II, complete sequence	614	614	94%	2e-172	99%	
AY596298.1	Haloarcula marismortui ATCC 43049 chromosome II, complete sequence	564	564	94%	2e-157	96%	

[gb|CP002922.1|](#) Haloarcula hispanica ATCC 33960 chromosome II, complete sequence
 Length=488918

Features in this part of subject sequence:
[cell division control protein 6](#)

Score = 614 bits (332), Expect = 2e-172
 Identities = 339/342 (99%), Gaps = 1/342 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1      AGCGCATGTGCGACAGGCAGACGAGATGGTTGAGCGACGATAAAAGTTCGCGACGAATTAA 60
|
Sbjct 801    AGCGCATGTGCGACAGGCAGACGAGATGGTTGAGCG-CGATAAAAGTTCGCGACGAATTAA 859

Query 61     CTCGCTTGCCAACACAGAGCAAACACTGACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG 120
|
Sbjct 860     CTCGCTTGCCAACACAGAGCAAACACTGACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG 919

Query 121    ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA 180
|
Sbjct 920     ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA 979

Query 181    TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTTGTACAGTTGACGTTGA 240
|
Sbjct 980     TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTTGTACAGTTGACGTTGA 1039

Query 241    AAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGAATAAGGGCCCCAAAGGCGGCTCATACTATGAGT 300
|
Sbjct 1040    AAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGAATAAGGGCCCCAAAGGCGGCTCATACTATGAGT 1099

Query 301    ACGAATTTTCGATTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGTATTTTC 342
|
Sbjct 1100    ACGAATTTTCGATTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGTACTTTC 1141
  
```

[gb|AY596298.1|](#) Haloarcula marismortui ATCC 43049 chromosome II, complete sequence
 Length=288050

Features in this part of subject sequence:
[cell division control protein 6 homolog 1](#)

Score = 564 bits (305), Expect = 2e-157
 Identities = 330/342 (96%), Gaps = 1/342 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1      AGCGCATGTGCGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGAATTAA 60
          |||
Sbjct 50613  AGCGCATGTGAGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCG-CGATAAAAGTGCAGCGACGAATTAA
50555

Query 61     CTCGCTTGCCAACACAGAGCAAAGTACTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG 120
          |||
Sbjct 50554  CTCGCTTGCCAACACAGAGTAAAGTACTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG
50495

Query 121    ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA 180
          |||
Sbjct 50494  ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTATGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA
50435

Query 181    TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTTGTCACAGTTGACGTTGA 240
          |||
Sbjct 50434  TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTTGTCACAGTTGACGCTGA
50375

Query 241    AAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGAATAAGGGCCCCAAAGGCGGCTCATACTATGAGT 300
          |||
Sbjct 50374  AAGGATTCCTGGACGTAGATGAACAGAATAAGGGCCCCAAAGGGGGCTCATACTATGAGT
50315

Query 301    ACGAATTTTCGATTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGTATTT 342
          |||
Sbjct 50314  ACGAATTTTCGATTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGTACTTC 50273
  
```

C-51

AGCGCATGTGCGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGAA
 TTAAGTTCGCTTGCCAACACAGAGCAGAACTGACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGA
 GCGGGAGGATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATG
 GCTGCAAAGCGTATCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTCATGACCGGTT
 GTCACAGTTGACGTTGAAAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGAATAAGGGCCCC
 AAAGGCGGCTCATACTATGAGTACGAATGGTTTCGATTCGCGCGGATTTGGCACAGG
 AAGTATTTTCGTTTCGATCCCAGCGGTAACGT

[Descriptions](#)

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
CP002922.1	Haloarcula hispanica ATCC 33960 chromosome II, complete sequence	610	610	94%	2e-171	98%	
AY596298.1	Haloarcula marismortui ATCC 43049 chromosome II, complete sequence	560	560	94%	2e-156	96%	

[gb|CP002922.1|](#) Haloarcula hispanica ATCC 33960 chromosome II, complete sequence
Length=488918

Features in this part of subject sequence:
[cell division control protein 6](#)

Score = 610 bits (330), Expect = 2e-171
Identities = 339/343 (99%), Gaps = 2/343 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      AGCGCATGTGCGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGAATTAAC 60
            |||
Sbjct 801    AGCGCATGTGCGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGAATTAAC 860

Query 61     TCGCTTGCCAACACAGAGCAGAAGTACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG 120
            |||
Sbjct 861    TCGCTTGCCAACACAGAGCA-AACTGACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG 919

Query 121    ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA 180
            |||
Sbjct 920    ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA 979

Query 181    TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTATGACCGGTTGTACAGTTGACGTTGA 240
            |||
Sbjct 980    TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTATGACCGGTTGTACAGTTGACGTTGA 1039

Query 241    AAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGATAAAGGGCCCAAGGCGGCTCATACTATGAGT 300
            |||
Sbjct 1040   AAGGGTTCCTAGACGTAGACGAACAGATAAAGGGCCCAAGGCGGCTCATACTATGAGT 1099

Query 301    ACGAATGGTTTCGATTTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGTATTTTC 343
            |||
Sbjct 1100   ACGAATT-TTCGATTTCGCGCGGATTTGGCACAGGAAGTACTTTC 1141
    
```

[gb|AY596298.1|](#) Haloarcula marismortui ATCC 43049 chromosome II, complete sequence
Length=288050

Features in this part of subject sequence:
[cell division control protein 6 homolog 1](#)

Score = 560 bits (303), Expect = 2e-156
Identities = 330/343 (96%), Gaps = 2/343 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      AGCGCATGTGCGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGAATTAAC 60
            |||
Sbjct 50613  AGCGCATGTGAGACAGGCAGACGAGATTGTTGAGCGCGATAAAAGTTCGCGACGAATTAAC 50554

Query 61     TCGCTTGCCAACACAGAGCAGAAGTACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG 120
            |||
Sbjct 50553  TCGCTTGCCAACACAGAGTA-AACTGACTCTCTACTCCCTATTACTGTTGGAGCGGGAGG 50495

Query 121    ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTACGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA 180
            |||
Sbjct 50494  ATGAAACGCCGTCCAAGCGTAACCGAATTTATGAGCGGTATGTAATGGCTGCAAAGCGTA 50435

Query 181    TCGATGCGGATGTGCGGACTGACAGAACGATTATGACCGGTTGTACAGTTGACGTTGA 240
            |||
    
```


Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds				111		
L14836.1	<i>Pseudomonas putida</i> (ATCC 23975) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta and alpha subunits (pcaH and pcaG) genes, complete cds	403	403	98%	3e-109	91%	
DQ841290.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain ATCC 23975 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	389	389	96%	8e-105	90%	
AJ295623.1	<i>Pseudomonas putida</i> pcaH gene and pcaG gene	389	389	96%	8e-105	90%	
CT573326.1	<i>Pseudomonas entomophila</i> str. L48 chromosome, complete sequence	376	376	96%	5e-101	89%	
CP000949.1	<i>Pseudomonas putida</i> W619, complete genome	374	374	95%	2e-100	89%	
CP002727.1	<i>Pseudomonas fulva</i> 12-X, complete genome	340	340	98%	3e-90	86%	
Y18527.1	<i>Pseudomonas</i> sp. pobA, pobR, pcaQ, pcaH and pcaG genes	333	333	92%	5e-88	87%	
DQ841293.1	<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6978 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	327	327	88%	2e-86	87%	
CP000076.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5, complete genome	298	298	96%	1e-77	83%	
AF302797.2	<i>Pseudomonas</i> sp. IMT40 ferulyl-CoA synthetase gene, partial cds; and para-hydroxy Benzoat hydroxylase (pobA), PobR (pobR), PcaQ (pcaQ), protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds	286	286	90%	7e-74	84%	
CP002620.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01, complete genome	284	284	98%	2e-73	82%	
CP002881.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 = LMG 11199, complete genome	280	280	95%	3e-72	82%	
CP000304.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501, complete genome	280	280	95%	3e-72	82%	
CP002622.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 4166, complete genome	275	275	95%	1e-70	82%	
FM209186.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 complete genome sequence	259	259	90%	9e-66	81%	
CP000438.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome	259	259	90%	9e-66	81%	
AE004091.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, complete genome	259	259	90%	9e-66	81%	
CP000744.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7, complete genome	257	257	95%	3e-65	80%	
CP001157.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ, complete genome	250	250	98%	5e-63	79%	
CP000075.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a, complete genome	244	244	95%	2e-61	79%	
CP002585.1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421, complete genome	233	233	98%	4e-58	78%	
AE016853.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000, complete genome	233	233	95%	4e-58	79%	
U96339.1	<i>Pseudomonas putida</i> NCIMB 9869 plasmid pRA500 p-cresol degradative pathway genes, p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase (pchA) gene, partial cds, and p-cresol methylhydroxylase, cytochrome subunit (pchC), unknown (pchX), p-cresol methylhydroxylase,	228	228	90%	2e-56	79%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	flavoprotein subunit (pchF), protocatechuate-3,4-dioxygenase, beta subunit (pcaH) and protocatechuate-3,4-dioxygenase, alpha subunit (pcaG) genes, complete cds						
CP000058.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola 1448A, complete genome	206	206	98%	5e-50	76%	
CP000490.1	<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222 chromosome 2, complete sequence	159	159	95%	7e-36	73%	
CP000285.1	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043, complete genome	154	154	97%	3e-34	73%	
AY457919.1	Marine alpha proteobacterium Y4I putative Zn-dependent hydrolase gene, partial cds; putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and conserved hypothetical protein gene, partial cds	141	141	94%	2e-30	72%	
AF253466.1	Alpha proteobacterium Y3F putative Zn-dependent hydrolase gene, partial cds; LysR-type transcriptional regulator (pcaQ), gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), and protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and hypothetical protein gene, partial cds	140	140	94%	6e-30	72%	
CP000781.1	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2, complete genome	138	138	89%	2e-29	72%	
DQ318103.1	Uncultured bacterium clone EP38 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	134	134	93%	3e-28	71%	
EU155151.1	<i>Chromohalobacter</i> sp. HS2 LysR-type transcriptional regulator (pcaQ), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG), AraC family of transcriptional regulator (pobR), p-hydroxyBenzoate hydroxylase (pobA), LysR-type transcriptional regulator (catR), muconate cycloisomerase (catB), muconolactone delta-isomerase (catC), catechol 1,2-dioxygenase (catA), Benzoate 1,2-dioxygenase large subunit (benA), Benzoate 1,2-dioxygenase small subunit (benB), electron transfer component of Benzoate 1,2-dioxygenase (benC), Benzoate diol dehydrogenase (benD), and Benzoate membrane transport protein (benE) genes, complete cds; and unknown genes	127	127	97%	4e-26	71%	
AY457916.1	Marine alpha proteobacterium SE45 putative shikimate dehydrogenase (aeroE2) gene, partial cds; and putative TetR family transcriptional regulator (tetR), putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative enol-lactone hydrolase (pcaD), putative gamma carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG), conserved hypothetical protein, and putative AraC type	122	122	97%	2e-24	71%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	transcriptional regulator (pobR) genes, complete cds						
CP002910.1	Klebsiella pneumoniae KCTC 2242, complete genome	118	118	94%	2e-23	71%	
AP006725.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044 DNA, complete genome	114	114	94%	2e-22	70%	
CP000647.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578, complete sequence	114	114	94%	2e-22	70%	
CP000032.1	Ruegeria pomeroyi DSS-3 megaplasmid, complete sequence	113	113	98%	9e-22	70%	
AY457918.1	Silicibacter pomeroyi putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative para-hydroxyBenzoat hydroxylase (pobA), putative gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and conserved hypothetical protein gene, partial cds	113	113	98%	9e-22	70%	
CP001875.2	Pantoea ananatis LMG 20103, complete genome	111	111	99%	3e-21	70%	
AP012032.1	Pantoea ananatis AJ13355 DNA, complete genome	105	105	99%	1e-19	69%	
DQ318058.1	Uncultured bacterium clone CL50 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	105	105	97%	1e-19	69%	
FN543502.1	Citrobacter rodentium ICC168, complete genome	104	104	90%	4e-19	70%	
BA000040.2	Bradyrhizobium japonicum USDA 110 DNA, complete genome	93.3	93.3	90%	8e-16	68%	
GU180198.1	Streptomyces viridosporus T7A putative protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit mRNA, partial cds	89.7	89.7	52%	1e-14	74%	
CU914168.1	Ralstonia solanacearum strain IPO1609 Genome Draft	89.7	89.7	99%	1e-14	69%	
DQ318057.1	Uncultured bacterium clone CL51 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	89.7	89.7	98%	1e-14	68%	
CP001068.1	Ralstonia pickettii 12J chromosome 1, complete sequence	87.8	87.8	99%	3e-14	69%	
FP885895.1	Ralstonia solanacearum str. CMR15 chromosome, complete genome	86.0	86.0	56%	1e-13	73%	
DQ841288.1	Cupriavidus necator strain JD6 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	86.0	86.0	97%	1e-13	68%	
AL646052.1	Ralstonia solanacearum GMI1000 chromosome complete sequence	80.6	80.6	67%	5e-12	71%	

 [gb|CP002290.1|](#) Pseudomonas putida BIRD-1, complete genome
Length=5731541

Features in this part of subject sequence:
[PcaH](#)

Score = 439 bits (486), Expect = 5e-120
Identities = 272/287 (95%), Gaps = 3/287 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 10 CGTGATGGCTACTACAGCT-CCGCACCATCAGCACGGGACCGTACC-ATGGCGCAACGGC 67
||||| ||||||||| ||||||||| ||| ||||||| |||||||||


```

Sbjct 286 |||||
AAGTCGATCGCCAACCCGCAAGCCGTGCAGCAGTTGATCGCCAAGCTCGACATGAGCGAC 345
Query 247 GCCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTCGATATCGTCCT 290
|||||
Sbjct 346 GCCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTTTACATCGTGCT 389

```

> [gb|L14836.1|PSECAHG](#) Pseudomonas putida (ATCC 23975) protocatechuate 3,4-dioxygenase
beta and alpha subunits (pcaH and pcaG) genes, complete cds
Length=1599

Score = 403 bits (446), Expect = 3e-109
Identities = 272/298 (91%), Gaps = 5/298 (2%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 3 CTGAC-GAC-GTGATGGCTACTACAGCT-CCGCACCATCAGCACGGGACCGTACCA-TGG 58
|||||
Sbjct 640 CTGACCGACAGCGACGGCTACTACAGCTTCCGCACCATCAAGCCGGGCCCGTACCCCTGG 699
Query 59 CGCAACGGCC-GAACGACTGGCGCCCGGCGCACATCCACTTCGCCATCAGCGGCCGTCG 117
|||||
Sbjct 700 CGCAACGGCCCGAACGACTGGCGCCCGGCGCACATCCACTTCGGCATCAGCGGCCGTCG 759
Query 118 ATGCCACCAAGCTGATTACCCAGCTGTACTTCGAGGGTGACCCGCTGATCCCGATGTGC 177
|||
Sbjct 760 ATGCGACCAAGCTGATCACCCAGTTTATTTTCGAGGGTGACCCGCTGATCCCGATGTGC 819
Query 178 CCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCGCAAGCCGTGCAGCAGTTGATCGCCAAGCTCGAC 237
|||||
Sbjct 820 CCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCCTGAAGCTGTACAGCAGTTGATCGCCAAGCTCGAC 879
Query 238 ATGAGCAACGCCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTCGATATCGTCCTGCGCG 295
|||||
Sbjct 880 ATGAACAACGCCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTTGACATCGTGCTGCGCG 937

```

> [gb|DQ841290.1|](#) Pseudomonas putida strain ATCC 23975 protocatechuate 3,4-dioxygenase
b-subunit (pcaH) gene, partial cds
Length=395

Score = 389 bits (430), Expect = 8e-105
Identities = 266/293 (91%), Gaps = 5/293 (2%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 3 CTGAC-GAC-GTGATGGCTACTACAGCT-CCGCACCATCAGCACGGGACCGTACCA-TGG 58
|||||
Sbjct 97 CTGACCGACAGCGACGGCTACTACAGCTTCCGCACCATCAAGCCGGGCCCGTACCCCTGG 156
Query 59 CGCAACGGCC-GAACGACTGGCGCCCGGCGCACATCCACTTCGCCATCAGCGGCCGTCG 117
|||||
Sbjct 157 CGCAACGGCCCGAACGACTGGCGCCCGGCGCACATCCACTTCGGCATCAGCGGCCGTCG 216
Query 118 ATGCCACCAAGCTGATTACCCAGCTGTACTTCGAGGGTGACCCGCTGATCCCGATGTGC 177
|||
Sbjct 217 ATGCGACCAAGCTGATCACCCAGTTATATTTTCGAGGGTGACCCGCTGATCCCGATGTGC 276
Query 178 CCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCGCAAGCCGTGCAGCAGTTGATCGCCAAGCTCGAC 237
|||||
Sbjct 277 CCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCCTGAAGCTGTACAGCAGTTGATCGCCAAGCTCGAC 336
Query 238 ATGAGCAACGCCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTCGATATCGTCCT 290
|||||
Sbjct 337 ATGAACAACGCCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTTGACATCGTGCT 389

```

C-27

TGACTGACCGACCGATGATGGCTACTACAAGCTCCCGCACCCCATCAAGAACCGGA
 CCCGTACCCCTGGCGCAACGGCCCGAAACGACTGGCGCCCGGCGCACATCCACTTC
 GCCATCAGCGGCCCGTCGATCGCCACCAAGCTGATTACCCAGCTGTACTTCGAGGG
 TGACCCGCTGATCCCGATGTGCCCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCGCAAGCCG
 TGCAGCAGTTGATCGCCAAGCTCGACATGAGCAACGCCAACCCGATGGACTGCCTG
 GCCTACCGCTTCGACATCGTCCTGCGCAGCAA

[Descriptions](#)

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem
 BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP002870.1	Pseudomonas putida S16, complete genome	484	484	99%	1e-133	95%	
CP002290.1	Pseudomonas putida BIRD-1, complete genome	455	455	98%	7e-125	94%	
CP000712.1	Pseudomonas putida F1, complete genome	453	453	99%	2e-124	93%	
AE015451.1	Pseudomonas putida KT2440 complete genome	448	448	99%	1e-122	93%	
CP000926.1	Pseudomonas putida GB-1, complete genome	432	432	98%	7e-118	92%	
DQ841291.1	Pseudomonas putida strain DSMZ 2112 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	432	432	97%	7e-118	92%	
EF434422.1	Uncultured bacterium clone qLB(3) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	428	428	93%	9e-117	93%	
EF434440.1	Uncultured bacterium clone qEP5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	423	423	93%	4e-115	93%	
EF434450.1	Uncultured bacterium clone qFR1 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	421	421	93%	1e-114	93%	
L14836.1	Pseudomonas putida (ATCC 23975) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta and alpha subunits (pcaH and pcaG) genes, complete cds	421	421	99%	1e-114	91%	
EF434456.1	Uncultured bacterium clone qFR14 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	412	412	93%	7e-112	92%	
EF434454.1	Uncultured bacterium clone qFR5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	412	412	93%	7e-112	92%	
EF434453.1	Uncultured bacterium clone qFR4 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	412	412	93%	7e-112	92%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
DQ841290.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain ATCC 23975 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	408	408	97%	9e-111	91%	
AJ295623.1	<i>Pseudomonas putida</i> pcaH gene and pcaG gene	403	403	99%	4e-109	90%	
CP000949.1	<i>Pseudomonas putida</i> W619, complete genome	381	381	99%	1e-102	88%	
CT573326.1	<i>Pseudomonas entomophila</i> str. L48 chromosome, complete sequence	381	381	99%	1e-102	88%	
CP002727.1	<i>Pseudomonas fulva</i> 12-X, complete genome	352	352	98%	6e-94	86%	
DQ841293.1	<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6978 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	340	340	96%	4e-90	86%	
Y18527.1	<i>Pseudomonas</i> sp. pobA, pobR, pcaQ, pcaH and pcaG genes	340	340	98%	4e-90	85%	
CP000076.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5, complete genome	313	313	98%	5e-82	84%	
EF434448.1	Uncultured bacterium clone qFEU7 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	304	304	83%	3e-79	87%	
AF302797.2	<i>Pseudomonas</i> sp. IMT40 ferulyl-CoA synthetase gene, partial cds; and para-hydroxy Benzoat hydroxylase (pobA), PobR (pobR), PcaQ (pcaQ), protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds	300	300	96%	3e-78	82%	
CP002620.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01, complete genome	288	288	97%	2e-74	82%	
CP002881.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 = LMG 11199, complete genome	280	280	95%	3e-72	81%	
CP002622.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 4166, complete genome	277	277	95%	4e-71	81%	
CP000744.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7, complete genome	271	271	97%	2e-69	81%	
CP000304.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501, complete genome	271	271	84%	2e-69	83%	
FM209186.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 complete genome sequence	266	266	97%	7e-68	80%	
CP000438.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome	266	266	97%	7e-68	80%	
AE004091.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, complete genome	266	266	97%	7e-68	80%	
CP001157.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ, complete genome	259	259	98%	1e-65	79%	
AE016853.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000, complete genome	241	241	97%	3e-60	79%	
CP000075.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a, complete genome	233	233	98%	4e-58	78%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
U96339.1	Pseudomonas putida NCIMB 9869 plasmid pRA500 p-cresol degradative pathway genes, p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase (pchA) gene, partial cds, and p-cresol methylhydroxylase, cytochrome subunit (pchC), unknown (pchX), p-cresol methylhydroxylase, flavoprotein subunit (pchF), protocatechuate-3,4-dioxygenase, beta subunit (pcaH) and protocatechuate-3,4-dioxygenase, alpha subunit (pcaG) genes, complete cds	228	228	88%	2e-56	78%	
CP002585.1	Pseudomonas brassicacearum subsp. brassicacearum NFM421, complete genome	226	226	97%	6e-56	77%	
CP000058.1	Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A, complete genome	217	217	98%	3e-53	76%	
CP000285.1	Chromohalobacter salexigens DSM 3043, complete genome	167	167	98%	5e-38	74%	
CP000490.1	Paracoccus denitrificans PD1222 chromosome 2, complete sequence	154	154	85%	3e-34	74%	
AY457919.1	Marine alpha proteobacterium Y4I putative Zn-dependent hydrolase gene, partial cds; putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and conserved hypothetical protein gene, partial cds	141	141	79%	2e-30	74%	
AF253466.1	Alpha proteobacterium Y3F putative Zn-dependent hydrolase gene, partial cds; LysR-type transcriptional regulator (pcaQ), gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), and protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and hypothetical protein gene, partial cds	138	138	92%	2e-29	72%	
EU155151.1	Chromohalobacter sp. HS2 LysR-type transcriptional regulator (pcaQ), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG), AraC family of transcriptional regulator (pobR), p-hydroxyBenzoat hydroxylase (pobA), LysR-type transcriptional regulator (catR), muconate cycloisomerase (catB), muconolactone delta-isomerase (catC), catechol 1,2-dioxygenase (catA), Benzoat 1,2-dioxygenase large subunit (benA), Benzoat 1,2-dioxygenase small subunit (benB), electron transfer component of Benzoat 1,2-dioxygenase (benC), Benzoat diol dehydrogenase (benD), and Benzoat membrane transport protein (benE)	132	132	94%	1e-27	72%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	genes, complete cds; and unknown genes						
CP002910.1	Klebsiella pneumoniae KCTC 2242, complete genome	129	129	86%	1e-26	72%	
CP000781.1	Xanthobacter autotrophicus Py2, complete genome	129	129	81%	1e-26	72%	
DQ318103.1	Uncultured bacterium clone EP38 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	129	129	78%	1e-26	72%	
CP000032.1	Ruegeria pomeroyi DSS-3 megaplasmid, complete sequence	125	125	97%	1e-25	70%	
AY457918.1	Silicibacter pomeroyi putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative para-hydroxyBenzoat hydroxylase (pobA), putative gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and conserved hypothetical protein gene, partial cds	125	125	97%	1e-25	70%	
AP006725.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044 DNA, complete genome	123	123	86%	5e-25	71%	
CP000647.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578, complete sequence	123	123	86%	5e-25	71%	
AY457916.1	Marine alpha proteobacterium SE45 putative shikimate dehydrogenase (aeroE2) gene, partial cds; and putative TetR family transcriptional regulator (tetR), putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative enol-lactone hydrolase (pcaD), putative gamma carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG), conserved hypothetical protein, and putative AraC type transcriptional regulator (pobR) genes, complete cds	116	116	96%	7e-23	71%	
CP001875.2	Pantoea ananatis LMG 20103, complete genome	111	111	97%	3e-21	70%	
AP012032.1	Pantoea ananatis AJ13355 DNA, complete genome	102	102	97%	2e-18	69%	
FN543502.1	Citrobacter rodentium ICC168, complete genome	96.9	96.9	87%	7e-17	70%	
DQ318057.1	Uncultured bacterium clone CL51 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	96.9	96.9	81%	7e-17	69%	
BA000040.2	Bradyrhizobium japonicum USDA 110 DNA, complete genome	95.1	95.1	83%	2e-16	69%	
DQ841288.1	Cupriavidus necator strain JD6 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial	93.3	93.3	96%	9e-16	69%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	cds						
	Ralstonia eutropha JMP134 protocatechuate						
DQ841280.1	3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	93.3	93.3	96%	9e-16	69%	
CP000264.1	Jannaschia sp. CCS1, complete genome	93.3	93.3	96%	9e-16	68%	
GU180198.1	Streptomyces viridosporus T7A putative protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit mRNA, partial cds	91.5	91.5	42%	3e-15	75%	
CU914168.1	Ralstonia solanacearum strain IPO1609 Genome Draft	91.5	91.5	86%	3e-15	69%	
GU560880.1	Uncultured bacterium clone FMa24N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	87.8	87.8	92%	4e-14	69%	
CP001068.1	Ralstonia pickettii 12J chromosome 1, complete sequence	86.0	86.0	93%	1e-13	69%	
FP885895.1	Ralstonia solanacearum str. CMR15 chromosome, complete genome	84.2	84.2	93%	4e-13	69%	
AL646052.1	Ralstonia solanacearum GMII000 chromosome complete sequence	75.2	75.2	62%	2e-10	70%	

> [gb|DQ841291.1|](#) Pseudomonas putida strain DSMZ 2112 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds
Length=395

Score = 432 bits (478), Expect = 7e-118
Identities = 281/303 (93%), Gaps = 7/303 (2%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1   TGACTGACCGACCGATGATGGCTACTACAAGCTCCCGCACCCCATCAAGAACCGGACCCG 60
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 94   TGCTGACCGACCG-TGACGGCTATTACA-GCTTCCGCACC--ATCAAG--CCGGGCCG 147

Query 61   TACCCCTGGCGCAACGGCCCGAAACGACTGGCGCCCGGCGCACATCCACTTCGCCATCAG 120
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 148  TACCCATGGCGCAACGGCCCGAA-CGACTGGCGCCCGGCGCATATCCACTTCGCCATCAG 206

Query 121  CGGCCCGTCGATCGCCACCAAGCTGATTACCCAGCTGTACTTCGAGGGTGACCCGCTGAT 180
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 207  CGGCCCATCGATCGCCACCAAGCTGATCACCCAGTTGTACTTCGAAGGTGACCCGCTGAT 266

Query 181  CCCGATGTGCCCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCGCAAGCCGTGCAGCAGTTGATCGC 240
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 267  CCCGATGTGCCCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCGCAAGCCGTGCAGCAGTTGATCGC 326

Query 241  CAAGCTCGACATGAGCAACGCCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTCGACATCGT 300
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 327  CAAGCTCGACATGAGCGACGCCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTTTACATCGT 386

Query 301  CCT 303
          ||
Sbjct 387  GCT 389
    
```


[protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit](#)

Score = 259 bits (286), Expect = 1e-65
 Identities = 245/307 (80%), Gaps = 7/307 (2%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 4      CTGACCGACCGATGATGGCTACTACAAGCTCCCGCACCCCATCAAGAACCGGACCCGTAC 63
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3871638 CTGACCGAC-GCCGACGGCTACTACTA-CTTCCGCACC--ATCAAG--CCGGGCCCTAC 3871585

Query 64     CCCTGGCGCAACGGCCCCGAAACGACTGGCGCCCCGGCGCACATCCACTTCGCCATCAGCGG 123
            || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3871584 CCGTGGCGCAACGGCCCCAA-CGAGTGGCGCCCGTCGCACATCCACGTGTCCATCAGCGG 3871526

Query 124    CCCGTCGATCGCCACCAAGCTGATTACCCAGCTGTACTTCGAGGGTGACCCGCTGATCCC 183
            || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3871525 CCCGTCGATCGCCACCAAGCTGATCACCAGATGTACTTCGAGGGCGACCCGCTGTTCC 3871466

Query 184    GATGTGCCCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCGCAAGCCGTGCAGCAGTTGATCGCCAA 243
            || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3871465 AAAGTGCCCGATCATCCGCGCCATCGCCAACCCGCGCCGCGCCGAGACCCTGATCGGCCG 3871406

Query 244    GCTCGACATGAGCAACGCCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTCGACATCGTCCT 303
            || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3871405 TCTGGACCTGAGCAGCAACGTGCCGATGGATTGCCTGGCGTACCGCTTCAATATCGTGCT 3871346

Query 304    GCGCAGC 310
            ||| |||
Sbjct 3871345 GCGCGGC 3871339
  
```

C-37

CGGTGCCTGACCCGAACCGTGATGGCTAACTACATGCTTACGCACCATCAAAGACT
 CGGGACTCGTACCCATGGCGCAACGGCCCCGAACGACTGGCGCCCCGGCGCACATCCA
 CTTCGCCATCAGCGGCCCGTCGATCGCCACCAAGCTGATTACCCAGCTGTACTTCGA
 GGGTGACCCGCTGATCCCGATGTGCCCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCGCAAG
 CCGTGCAGCAGTTGATCGCCAAGCTCGACATGAGCAACGCCAACCCGATGGACTGC
 CTGGCCTACCGCTTCGATATCGTCCTGCGCGGCAA

[Descriptions](#)

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem
 BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP002870.1	Pseudomonas putida S16, complete genome	479	479	99%	6e-132	94%	
CP002290.1	Pseudomonas putida BIRD-1, complete genome	452	452	99%	8e-124	92%	
CP000712.1	Pseudomonas putida F1, complete genome	452	452	99%	8e-124	92%	
AE015451.1	Pseudomonas putida KT2440 complete genome	443	443	99%	4e-121	92%	
CP000926.1	Pseudomonas putida GB-1, complete genome	425	425	99%	1e-115	91%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EF434422.1	Uncultured bacterium clone qLB(3) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	423	423	93%	4e-115	92%	
DQ841291.1	Pseudomonas putida strain DSMZ 2112 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	423	423	99%	4e-115	91%	
EF434440.1	Uncultured bacterium clone qEP5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	417	417	93%	2e-113	92%	
EF434450.1	Uncultured bacterium clone qFR1 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	416	416	93%	6e-113	92%	
EF434456.1	Uncultured bacterium clone qFR14 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	407	407	93%	3e-110	91%	
EF434454.1	Uncultured bacterium clone qFR5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	407	407	93%	3e-110	91%	
EF434453.1	Uncultured bacterium clone qFR4 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	407	407	93%	3e-110	91%	
L14836.1	Pseudomonas putida (ATCC 23975) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta and alpha subunits (pcaH and pcaG) genes, complete cds	407	407	99%	3e-110	89%	
AJ295623.1	Pseudomonas putida pcaH gene and pcaG gene	403	403	99%	4e-109	89%	
DQ841290.1	Pseudomonas putida strain ATCC 23975 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	392	392	99%	7e-106	88%	
CP000949.1	Pseudomonas putida W619, complete genome	389	389	99%	8e-105	88%	
CT573326.1	Pseudomonas entomophila str. L48 chromosome, complete sequence	385	385	99%	1e-103	88%	
CP002727.1	Pseudomonas fulva 12-X, complete genome	343	343	97%	3e-91	85%	
Y18527.1	Pseudomonas sp. pobA, pobR, pcaQ, pcaH and pcaG genes	338	338	90%	1e-89	87%	
DQ841293.1	Pseudomonas sp. DSM 6978 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	336	336	87%	4e-89	87%	
CP000076.1	Pseudomonas fluorescens Pf-5, complete genome	306	306	94%	8e-80	83%	
EF434448.1	Uncultured bacterium clone qFEU7 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	300	300	81%	3e-78	86%	
AF302797.2	Pseudomonas sp. IMT40 ferulyl-CoA synthetase gene, partial cds; and para-hydroxy Benzoat hydroxylase (pobA), PobR (pobR), PcaQ (pcaQ), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), and protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds	289	289	87%	6e-75	83%	
CP002620.1	Pseudomonas mendocina NK-01, complete genome	284	284	90%	2e-73	82%	
CP002881.1	Pseudomonas stutzeri ATCC 17588 = LMG 11199, complete genome	282	282	90%	9e-73	82%	
CP000304.1	Pseudomonas stutzeri A1501, complete genome	282	282	89%	9e-73	82%	
CP002622.1	Pseudomonas stutzeri DSM 4166, complete genome	277	277	90%	4e-71	82%	
FM209186.1	Pseudomonas aeruginosa LESB58 complete genome sequence	260	260	87%	3e-66	81%	
CP000438.1	Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14, complete	260	260	87%	3e-66	81%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	genome						
AE004091.2	Pseudomonas aeruginosa PAO1, complete genome	260	260	87%	3e-66	81%	
CP000744.1	Pseudomonas aeruginosa PA7, complete genome	259	259	90%	1e-65	80%	
CP001157.1	Azotobacter vinelandii DJ, complete genome	251	251	93%	1e-63	79%	
CP000075.1	Pseudomonas syringae pv. syringae B728a, complete genome	248	248	90%	2e-62	79%	
CP002585.1	Pseudomonas brassicacearum subsp. brassicacearum NFM421, complete genome	241	241	94%	3e-60	78%	
AE016853.1	Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000, complete genome	241	241	90%	3e-60	79%	
U96339.1	Pseudomonas putida NCIMB 9869 plasmid pRA500 p-cresol degradative pathway genes, p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase (pchA) gene, partial cds, and p-cresol methylhydroxylase, cytochrome subunit (pchC), unknown (pchX), p-cresol methylhydroxylase, flavoprotein subunit (pchF), protocatechuate-3,4-dioxygenase, beta subunit (pcaH) and protocatechuate-3,4-dioxygenase, alpha subunit (pcaG) genes, complete cds	228	228	87%	2e-56	78%	
CP000058.1	Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A, complete genome	206	206	90%	5e-50	76%	
CP000490.1	Paracoccus denitrificans PD1222 chromosome 2, complete sequence	158	158	87%	2e-35	73%	
CP000285.1	Chromohalobacter salexigens DSM 3043, complete genome	158	158	87%	2e-35	74%	
AY457919.1	Marine alpha proteobacterium Y4I putative Zn-dependent hydrolase gene, partial cds; putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and conserved hypothetical protein gene, partial cds	143	143	78%	5e-31	73%	
AF253466.1	Alpha proteobacterium Y3F putative Zn-dependent hydrolase gene, partial cds; LysR-type transcriptional regulator (pcaQ), gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), and protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and hypothetical protein gene, partial cds	138	138	78%	2e-29	73%	
DQ318103.1	Uncultured bacterium clone EP38 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	131	131	78%	3e-27	72%	
CP002910.1	Klebsiella pneumoniae KCTC 2242, complete genome	127	127	88%	4e-26	71%	
EU155151.1	Chromohalobacter sp. HS2 LysR-type transcriptional regulator (pcaQ), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG), AraC family of transcriptional regulator (pobR), p-hydroxyBenzoat hydroxylase (pobA), LysR-type transcriptional regulator (catR), muconate	125	125	87%	1e-25	71%	

Sequences producing significant alignments:


Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	cycloisomerase (catB), muconolactone delta-isomerase (catC), catechol 1,2-dioxygenase (catA), Benzoat 1,2-dioxygenase large subunit (benA), Benzoat 1,2-dioxygenase small subunit (benB), electron transfer component of Benzoat 1,2-dioxygenase (benC), Benzoat diol dehydrogenase (benD), and Benzoat membrane transport protein (benE) genes, complete cds; and unknown genes						
CP000781.1	Xanthobacter autotrophicus Py2, complete genome	125	125	87%	1e-25	71%	
DQ841287.1	Geodermatophilus sp. B1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	123	123	78%	5e-25	73%	
AP006725.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044 DNA, complete genome	122	122	88%	2e-24	71%	
CP000647.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578, complete sequence	122	122	88%	2e-24	71%	
DQ318099.1	Uncultured bacterium clone EP36 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	118	118	88%	2e-23	71%	
DQ318098.1	Uncultured bacterium clone AF5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	118	118	88%	2e-23	71%	
DQ318096.1	Uncultured bacterium clone EP15 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	118	118	88%	2e-23	71%	
CP000032.1	Ruegeria pomeroyi DSS-3 megaplasmid, complete sequence	114	114	87%	3e-22	70%	
AY457918.1	Silicibacter pomeroyi putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative para-hydroxyBenzoat hydroxylase (pobA), putative gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and conserved hypothetical protein gene, partial cds	114	114	87%	3e-22	70%	
AY457916.1	Marine alpha proteobacterium SE45 putative shikimate dehydrogenase (aeroE2) gene, partial cds; and putative TetR family transcriptional regulator (tetR), putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative enol-lactone hydrolase (pcaD), putative gamma carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG), conserved hypothetical protein, and putative AraC type transcriptional regulator (pobR) genes, complete cds	113	113	78%	9e-22	71%	
GU560771.1	Uncultured bacterium clone FMa33N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	111	111	59%	3e-21	73%	
DQ318121.1	Uncultured bacterium clone EP49B protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	111	111	88%	3e-21	70%	
DQ318058.1	Uncultured bacterium clone CL50 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	111	111	78%	3e-21	70%	
GU560805.1	Uncultured bacterium clone FMB36 protocatechuate 3,4-	107	107	53%	4e-20	76%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence						
EF434431.1	Uncultured bacterium clone qY4 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	107	107	75%	4e-20	71%	
EF434417.1	Uncultured bacterium clone qCSA6 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	107	107	75%	4e-20	72%	
DQ318070.1	Uncultured bacterium clone CL70 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	107	107	88%	4e-20	70%	
DQ318061.1	Uncultured bacterium clone CL54 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	107	107	78%	4e-20	70%	
DQ318097.1	Uncultured bacterium clone CL35 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	98.7	98.7	70%	2e-17	72%	
FN543502.1	Citrobacter rodentium ICC168, complete genome	96.9	96.9	78%	7e-17	70%	
DQ318060.1	Uncultured bacterium clone EP46 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	96.9	96.9	78%	7e-17	69%	
BA000040.2	Bradyrhizobium japonicum USDA 110 DNA, complete genome	95.1	95.1	78%	2e-16	69%	
AP012032.1	Pantoea ananatis AJ13355 DNA, complete genome	93.3	93.3	91%	9e-16	68%	
CP001875.2	Pantoea ananatis LMG 20103, complete genome	93.3	93.3	91%	9e-16	68%	
GU560768.1	Uncultured bacterium clone Ua47N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	93.3	93.3	53%	9e-16	74%	
DQ318102.1	Uncultured bacterium clone CL31 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	93.3	93.3	53%	9e-16	74%	
DQ318057.1	Uncultured bacterium clone CL51 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	93.3	93.3	78%	9e-16	69%	
GU180198.1	Streptomyces viridosporus T7A putative protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit mRNA, partial cds	89.7	89.7	39%	1e-14	75%	
CU914168.1	Ralstonia solanacearum strain IPO1609 Genome Draft	89.7	89.7	88%	1e-14	69%	
BA000012.4	Mesorhizobium loti MAFF303099 DNA, complete genome	89.7	89.7	78%	1e-14	70%	
CP002623.1	Roseobacter litoralis Och 149, complete genome	86.0	86.0	78%	1e-13	68%	
CP001068.1	Ralstonia pickettii 12J chromosome 1, complete sequence	86.0	86.0	92%	1e-13	69%	
DQ841288.1	Cupriavidus necator strain JD6 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	84.2	84.2	78%	4e-13	68%	
DQ841280.1	Ralstonia eutropha JMP134 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	84.2	84.2	78%	4e-13	68%	
DQ318100.1	Uncultured bacterium clone EP14 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	84.2	84.2	87%	4e-13	68%	
GU560880.1	Uncultured bacterium clone FMa24N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	82.4	82.4	70%	2e-12	70%	
CP000264.1	Jannaschia sp. CCS1, complete genome	82.4	82.4	78%	2e-12	68%	
GU560742.1	Uncultured bacterium clone SS100a15N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	80.6	80.6	73%	5e-12	68%	
EF434429.1	Uncultured bacterium clone qY2 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	80.6	80.6	73%	5e-12	68%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FP885895.1	Ralstonia solanacearum str. CMR15 chromosome, complete genome	78.8	78.8	86%	2e-11	68%	
GU560881.1	Uncultured bacterium clone Ua33N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	78.8	78.8	70%	2e-11	69%	
EF434451.1	Uncultured bacterium clone qFR2 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	75.2	75.2	73%	2e-10	68%	
AL646052.1	Ralstonia solanacearum GMI1000 chromosome complete sequence	75.2	75.2	56%	2e-10	70%	
EF434416.1	Uncultured bacterium clone qCSA4 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	73.4	73.4	45%	8e-10	72%	
DQ318075.1	Uncultured bacterium clone EP66 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	73.4	73.4	71%	8e-10	67%	
CP002226.1	Ketogulonigenium vulgare Y25 plasmid pYP12, complete sequence	68.0	68.0	78%	3e-08	66%	
GU560883.1	Uncultured bacterium clone SS10b60 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	68.0	68.0	47%	3e-08	70%	
GU560882.1	Uncultured bacterium clone FMa29N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	68.0	68.0	47%	3e-08	70%	
GU560828.1	Uncultured bacterium clone FMc41 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	68.0	68.0	47%	3e-08	70%	
GU560802.1	Uncultured bacterium clone SS100c27 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	68.0	68.0	47%	3e-08	70%	
GU560801.1	Uncultured bacterium clone SS100b37 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	62.6	62.6	47%	1e-06	69%	
GU560800.1	Uncultured bacterium clone FMb5 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	62.6	62.6	47%	1e-06	69%	
CP001115.1	Deinococcus deserti VCD115 plasmid 1, complete sequence	55.4	55.4	16%	2e-04	83%	
GU560898.1	Uncultured bacterium clone SS10a32 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	51.8	51.8	45%	0.003	69%	
GU560877.1	Uncultured bacterium clone FMb49 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	51.8	51.8	16%	0.003	81%	
GU560823.1	Uncultured bacterium clone FMb65 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	51.8	51.8	35%	0.003	70%	

 [gb|DQ841291.1|](#) Pseudomonas putida strain DSMZ 2112 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds
Length=395

Score = 423 bits (468), Expect = 4e-115
Identities = 285/313 (91%), Gaps = 8/313 (3%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1   CGGTGCCTGACCCGAACCGTGATGGCTAACTACATGCTTACGCACCATCAAAGACTCGGG 60
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 91   CGGTGTCTGACCG--ACCGTGACGGCTAT-TACA-GCTTCGCGACCATCAAGC---CGGG 143

Query 61  ACTCGTACCCATGGCGCAACGGCCGAACGACTGGCGCCGGCGCACATCCACTTCGCCA 120

```


Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
CP002870.1	Pseudomonas putida S16, complete genome	500	500	96%	2e-138	96%	
CP002290.1	Pseudomonas putida BIRD-1, complete genome	464	464	94%	1e-127	94%	
CP000712.1	Pseudomonas putida F1, complete genome	464	464	94%	1e-127	94%	
AE015451.1	Pseudomonas putida KT2440 complete genome	455	455	94%	7e-125	94%	
CP000926.1	Pseudomonas putida GB-1, complete genome	446	446	96%	4e-122	92%	
EF434422.1	Uncultured bacterium clone qLB(3) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	435	435	88%	6e-119	95%	
DQ841291.1	Pseudomonas putida strain DSMZ 2112 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	435	435	93%	6e-119	93%	
EF434450.1	Uncultured bacterium clone qFR1 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	432	432	89%	8e-118	94%	
EF434440.1	Uncultured bacterium clone qEP5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	430	430	88%	3e-117	94%	
EF434456.1	Uncultured bacterium clone qFR14 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	423	423	89%	4e-115	93%	
EF434454.1	Uncultured bacterium clone qFR5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	423	423	89%	4e-115	93%	
EF434453.1	Uncultured bacterium clone qFR4 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	423	423	89%	4e-115	93%	
L14836.1	Pseudomonas putida (ATCC 23975) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta and alpha subunits (pcaH and pcaG) genes, complete cds	423	423	94%	4e-115	91%	
AJ295623.1	Pseudomonas putida pcaH gene and pcaG gene	414	414	94%	2e-112	91%	
DQ841290.1	Pseudomonas putida strain ATCC 23975 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	408	408	94%	9e-111	90%	
CP000949.1	Pseudomonas putida W619, complete genome	401	401	96%	1e-108	89%	
CT573326.1	Pseudomonas entomophila str. L48 chromosome, complete sequence	387	387	94%	3e-104	89%	
CP002727.1	Pseudomonas fulva 12-X, complete genome	358	358	94%	1e-95	87%	
Y18527.1	Pseudomonas sp. pobA, pobR, pcaQ, pcaH and pcaG genes	343	343	94%	3e-91	86%	
DQ841293.1	Pseudomonas sp. DSM 6978 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	336	336	85%	5e-89	88%	
CP000076.1	Pseudomonas fluorescens Pf-5, complete genome	318	318	94%	1e-83	84%	
EF434448.1	Uncultured bacterium clone qFEU7 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	300	300	79%	3e-78	87%	
AF302797.2	Pseudomonas sp. IMT40 ferulyl-CoA synthetase gene, partial cds; and para-hydroxy Benzoat hydroxylase (pobA), PobR (pobR), PcaQ (pcaQ), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), and protocatechuate 3,4	300	300	94%	3e-78	83%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds						
CP002620.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01, complete genome	289	289	94%	6e-75	82%	
CP002881.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 = LMG 11199, complete genome	282	282	93%	9e-73	81%	
CP000304.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501, complete genome	282	282	93%	9e-73	81%	
CP002622.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 4166, complete genome	279	279	93%	1e-71	81%	
CP001157.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ, complete genome	269	269	96%	6e-69	80%	
FM209186.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 complete genome sequence	266	266	94%	7e-68	80%	
CP000744.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7, complete genome	266	266	94%	7e-68	80%	
CP000438.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome	266	266	94%	7e-68	80%	
AE004091.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, complete genome	266	266	94%	7e-68	80%	
CP000075.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a, complete genome	255	255	93%	1e-64	79%	
AE016853.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000, complete genome	250	250	96%	5e-63	79%	
CP002585.1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421, complete genome	246	246	93%	6e-62	79%	
U96339.1	<i>Pseudomonas putida</i> NCIMB 9869 plasmid pRA500 p-cresol degradative pathway genes, p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase (pchA) gene, partial cds, and p-cresol methylhydroxylase, cytochrome subunit (pchC), unknown (pchX), p-cresol methylhydroxylase, flavoprotein subunit (pchF), protocatechuate-3,4-dioxygenase, beta subunit (pcaH) and protocatechuate-3,4-dioxygenase, alpha subunit (pcaG) genes, complete cds	233	233	85%	4e-58	79%	
CP000058.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A, complete genome	221	221	94%	3e-54	77%	
CP002568.1	<i>Polymorphum gilvum</i> SL003B-26A1, complete genome	170	170	96%	4e-39	74%	
CP000285.1	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043, complete genome	159	159	91%	7e-36	74%	
AP009384.1	<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571 DNA, complete genome	138	138	85%	2e-29	72%	
DQ318103.1	Uncultured bacterium clone EP38 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	138	138	90%	2e-29	72%	
EU155151.1	<i>Chromohalobacter</i> sp. HS2 LysR-type transcriptional regulator (pcaQ), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG), AraC family of transcriptional regulator (pobR), p-hydroxyBenzoat hydroxylase (pobA), LysR-type transcriptional regulator (catR), muconate cycloisomerase (catB), muconolactone delta-isomerase (catC), catechol 1,2-dioxygenase (catA), Benzoat 1,2-dioxygenase large subunit (benA), Benzoat 1,2-dioxygenase small subunit (benB), electron transfer component of Benzoat 1,2-dioxygenase (benC), Benzoat	131	131	95%	4e-27	71%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	diol dehydrogenase (benD), and Benzoat membrane transport protein (benE) genes, complete cds; and unknown genes						
CP002910.1	Klebsiella pneumoniae KCTC 2242, complete genome	127	127	89%	4e-26	72%	
CP000781.1	Xanthobacter autotrophicus Py2, complete genome	125	125	85%	2e-25	71%	
AP006725.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044 DNA, complete genome	123	123	89%	5e-25	72%	
CP000647.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578, complete sequence	123	123	89%	5e-25	72%	
DQ318099.1	Uncultured bacterium clone EP36 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	122	122	85%	2e-24	71%	
DQ318098.1	Uncultured bacterium clone AF5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	122	122	85%	2e-24	71%	
DQ318058.1	Uncultured bacterium clone CL50 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	118	118	89%	2e-23	70%	
CP000629.1	Agrobacterium radiobacter K84 chromosome 2, complete sequence	116	116	85%	8e-23	71%	
DQ318096.1	Uncultured bacterium clone EP15 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	116	116	85%	8e-23	70%	
CP000943.1	Methylobacterium sp. 4-46, complete genome	114	114	89%	3e-22	70%	
EF434431.1	Uncultured bacterium clone qY4 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	114	114	76%	3e-22	71%	
DQ841287.1	Geodermatophilus sp. B1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	114	114	85%	3e-22	72%	
EF434417.1	Uncultured bacterium clone qCSA6 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	113	113	73%	1e-21	73%	
AY457918.1	Silicibacter pomeroyi putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative para-hydroxyBenzoat hydroxylase (pobA), putative gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and conserved hypothetical protein gene, partial cds	113	113	94%	1e-21	69%	
CP002447.1	Mesorhizobium ciceri biovar biserrulae WSM1271, complete genome	109	109	90%	1e-20	70%	
AF253465.2	Sagittula stellata putative LysR-type transcriptional regulator (pcaQ), putative para-hydroxyBenzoat hydroxylase (pobA), putative gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG), and hypothetical protein genes, complete cds	109	109	55%	1e-20	76%	
DQ318061.1	Uncultured bacterium clone CL54 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	109	109	89%	1e-20	70%	
FP885906.2	Ralstonia solanacearum str. PSI07 chromosome, complete genome	107	107	89%	4e-20	70%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
GU560805.1	Uncultured bacterium clone FMb36 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	107	107	50%	4e-20	76%	
DQ318121.1	Uncultured bacterium clone EP49B protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	107	107	85%	4e-20	70%	
DQ318097.1	Uncultured bacterium clone CL35 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	107	107	85%	4e-20	71%	
DQ318060.1	Uncultured bacterium clone EP46 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	107	107	89%	4e-20	69%	
FN543502.1	Citrobacter rodentium ICC168, complete genome	105	105	85%	1e-19	71%	
CP001193.1	Rhizobium leguminosarum bv. trifolii WSM2304 plasmid pRLG202, complete sequence	105	105	85%	1e-19	69%	
CP001875.2	Pantoea ananatis LMG 20103, complete genome	104	104	93%	5e-19	69%	
GU560771.1	Uncultured bacterium clone FMa33N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	102	102	66%	2e-18	72%	
DQ318070.1	Uncultured bacterium clone CL70 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	102	102	85%	2e-18	70%	
CP002279.1	Mesorhizobium opportunistum WSM2075, complete genome	100	100	90%	6e-18	70%	
AP012032.1	Pantoea ananatis AJ13355 DNA, complete genome	100	100	93%	6e-18	69%	
GU560768.1	Uncultured bacterium clone Ua47N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	100	100	51%	6e-18	75%	
CP001644.1	Ralstonia pickettii 12D chromosome 1, complete sequence	100	100	84%	6e-18	70%	
CP001624.1	Rhizobium leguminosarum bv. trifolii WSM1325 plasmid pR132502, complete sequence	100	100	85%	6e-18	68%	
DQ318102.1	Uncultured bacterium clone CL31 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	100	100	51%	6e-18	75%	
CU695238.1	Ralstonia solanacearum strain MolK2 Genome Draft	98.7	98.7	89%	2e-17	70%	
BA000012.4	Mesorhizobium loti MAFF303099 DNA, complete genome	96.9	96.9	85%	7e-17	70%	
BA000040.2	Bradyrhizobium japonicum USDA 110 DNA, complete genome	95.1	95.1	85%	3e-16	68%	
DQ318057.1	Uncultured bacterium clone CL51 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	95.1	95.1	85%	3e-16	68%	
DQ841288.1	Cupriavidus necator strain JD6 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	93.3	93.3	85%	9e-16	69%	
DQ841280.1	Ralstonia eutropha JMP134 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	93.3	93.3	85%	9e-16	69%	
CP001349.1	Methylobacterium nodulans ORS 2060, complete genome	91.5	91.5	89%	3e-15	69%	
AP008980.1	Terrabacter sp. DBF63 plasmid pDBF1 genes, complete and partial cds	91.5	91.5	67%	3e-15	72%	
CP000830.1	Dinoroseobacter shibae DFL 12, complete genome	89.7	89.7	45%	1e-14	74%	
DQ318100.1	Uncultured bacterium clone EP14 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	89.7	89.7	85%	1e-14	69%	
CP002782.1	Sinorhizobium meliloti AK83 chromosome 2, complete sequence	87.8	87.8	81%	4e-14	68%	

Sbjct 392 ACGG 395



> [gb|DQ841290.1](#) Pseudomonas putida strain ATCC 23975 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds Length=395

Score = 408 bits (452), Expect = 9e-111
Identities = 278/306 (91%), Gaps = 5/306 (2%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 16 GCCTGAACGACCGTGATGGCTACTACAAGCTTCCGCACCATGCAAGACCGGGACCGTACC 75
          ||||| |||| | || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 95 GCCTGACCGACAGCGACGGCTACTACA-GCTTCCGCACCAT-CAAG-CCGGGCCCGTACC 151

Query 76 CATGGCGCAACGGCCCGAACGACTGGCGCCCGGCGCACATCCACTTCGCCATCAGCGGCC 135
          | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 152 CCTGGCGCAACGGCCCGAACGACTGGCGCCCGGCGCACATCCACTTCGCCATCAGCGGCC 211

Query 136 CGTCAGATCGCCACCAAGCTGATTACCCAGCTGTACTTCAGAGGGTGACCCGCTGATCCC 195
          |||| | || | ||||| ||||| ||||| || || || || || || || || || || || ||
Sbjct 212 CGTC-GATTGCGACCAAGCTGATCACCCAGTTATATTTTC-GAGGGTGACCCGCTGATCCC 269

Query 196 GATGTGCCCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCGCAAGCCGTGCAGCAGTTGATCGCCAA 255
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||
Sbjct 270 GATGTGCCCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCGCAAGCTGTACAGCAGTTGATCGCCAA 329

Query 256 GCTCGACATGAGCAACGCCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTCGATATCGTACT 315
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || || || || || || ||
Sbjct 330 GCTCGACATGAACAACGCCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTTGACATCGTGCT 389

Query 316 GCGCGG 321
          | |||
Sbjct 390 CCACGG 395
```



> [gb|DQ841293.1](#) Pseudomonas sp. DSM 6978 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds Length=395

Score = 336 bits (372), Expect = 5e-89
Identities = 244/277 (88%), Gaps = 4/277 (1%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 45 CTCCGCACCATGCAAGACCGGGACCGTACCCATGGCGCAACGGCCCGAACGACTGGCGC 104
          ||||| |||| | || || || || || || || || || || || || || || || || ||
Sbjct 123 CTCCGCACCAT-CAAGCCCGGCCCC-TACCCGTGGCGCAACGGCCCGAACGACTGGCGT 180

Query 105 CCGCGCACATCCACTTCGCCATCAGCGGCCCGTCAGATCGCCACCAAGCTGATTACCCA 164
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 181 CCGCGCACATCCACTTCTCCATCAGCGGCCCGTC-GATCGCCACCCGCTGATCACCCA 239

Query 165 GCTGTACTTCAGAGGGTGACCCGCTGATCCCGATGTGCCGATCGTCAAGTCGATCGCCA 224
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 240 GCTGTACTTC-GAGGGTGACCCGCTGATCCCGATGTGCCGATCGTCAAGTCGATCGCCA 298

Query 225 ACCCGCAAGCCGTGCAGCAGTTGATCGCCAAGCTCGACATGAGCAACGCCAACCCGATGG 284
          |||| | ||||| ||||| || || || || || || || || || || || || || || ||
Sbjct 299 ACCCGAAGCCGTGCAGACGCTGATCGCGGCCCTGGACATGGGCATGGCCAACCCCATGG 358

Query 285 ACTGCCTGGCCTACCGCTTCGATATCGTACTGCGCGG 321
          ||||| ||||| ||||| |||| | || | || |
Sbjct 359 ACTGCCTGGCCTACCGCTTCGACATCGTGCTCCACGG 395
```



> [gb|CP000285.1](#) Chromohalobacter salexigens DSM 3043, complete genome Length=3696649

Features in this part of subject sequence:
[protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit](#)

Score = 159 bits (176), Expect = 7e-36
Identities = 222/298 (74%), Gaps = 10/298 (3%)

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP000744.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7, complete genome	235	235	88%	1e-58	80%	
DQ841293.1	<i>Pseudomonas</i> sp. DSM 6978 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	226	226	98%	6e-56	77%	
CP000438.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14, complete genome	223	223	88%	7e-55	79%	
AE004091.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, complete genome	223	223	88%	7e-55	79%	
CP002881.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 = LMG 11199, complete genome	217	217	88%	3e-53	78%	
CP000076.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5, complete genome	217	217	88%	3e-53	79%	
CP002622.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 4166, complete genome	214	214	88%	4e-52	78%	
FM209186.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 complete genome sequence	214	214	88%	4e-52	78%	
CP002620.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01, complete genome	208	208	98%	1e-50	77%	
CP000304.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501, complete genome	205	205	88%	2e-49	77%	
AF302797.2	<i>Pseudomonas</i> sp. IMT40 ferulyl-CoA synthetase gene, partial cds; and para-hydroxy Benzoat hydroxylase (pobA), PobR (pobR), PcaQ (pcaQ), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), and protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds	199	199	88%	8e-48	77%	
CP001157.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ, complete genome	192	192	96%	1e-45	75%	
CT573326.1	<i>Pseudomonas entomophila</i> str. L48 chromosome, complete sequence	190	190	88%	4e-45	76%	
EF434448.1	Uncultured bacterium clone qFEU7 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	188	188	69%	1e-44	80%	
CP002870.1	<i>Pseudomonas putida</i> S16, complete genome	187	187	96%	5e-44	75%	
U96339.1	<i>Pseudomonas putida</i> NCIMB 9869 plasmid pRA500 p-cresol degradative pathway genes, p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase (pchA) gene, partial cds, and p-cresol methylhydroxylase, cytochrome subunit (pchC), unknown (pchX), p-cresol methylhydroxylase, flavoprotein subunit (pchF), protocatechuate-3,4-dioxygenase, beta subunit (pcaH) and protocatechuate-3,4-dioxygenase, alpha subunit (pcaG) genes, complete cds	181	181	96%	2e-42	74%	
Y18527.1	<i>Pseudomonas</i> sp. pobA, pobR, pcaQ, pcaH and pcaG genes	179	179	98%	7e-42	74%	
CP000712.1	<i>Pseudomonas putida</i> F1, complete genome	178	178	96%	3e-41	75%	
CP000926.1	<i>Pseudomonas putida</i> GB-1, complete genome	176	176	96%	9e-41	75%	
CP002727.1	<i>Pseudomonas fulva</i> 12-X, complete genome	174	174	98%	3e-40	74%	
DQ841291.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain DSMZ 2112 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	174	174	96%	3e-40	75%	
AE015451.1	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 complete genome	172	172	96%	1e-39	74%	
CP002290.1	<i>Pseudomonas putida</i> BIRD-1, complete genome	170	170	96%	4e-39	74%	
L14836.1	<i>Pseudomonas putida</i> (ATCC 23975) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta and alpha subunits (pcaH and pcaG) genes, complete cds	170	170	96%	4e-39	74%	
CP002568.1	<i>Polymorphum gilvum</i> SL003B-26A1, complete genome	167	167	60%	5e-38	81%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
DQ841290.1	Pseudomonas putida strain ATCC 23975 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	167	167	96%	5e-38	74%	
AE016853.1	Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000, complete genome	165	165	86%	2e-37	74%	
CP000490.1	Paracoccus denitrificans PD1222 chromosome 2, complete sequence	163	163	88%	6e-37	74%	
EF434440.1	Uncultured bacterium clone qEP5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	158	158	91%	2e-35	74%	
EF434422.1	Uncultured bacterium clone qLB(3) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	158	158	91%	2e-35	74%	
CP000075.1	Pseudomonas syringae pv. syringae B728a, complete genome	158	158	96%	2e-35	73%	
CP000949.1	Pseudomonas putida W619, complete genome	156	156	88%	8e-35	74%	
AJ295623.1	Pseudomonas putida pcaH gene and pcaG gene	156	156	96%	8e-35	73%	
EF434456.1	Uncultured bacterium clone qFR14 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	154	154	91%	3e-34	74%	
EF434454.1	Uncultured bacterium clone qFR5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	154	154	91%	3e-34	74%	
EF434453.1	Uncultured bacterium clone qFR4 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	154	154	91%	3e-34	74%	
DQ841288.1	Cupriavidus necator strain JD6 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	154	154	98%	3e-34	73%	
DQ841280.1	Ralstonia eutropha JMP134 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds	154	154	98%	3e-34	73%	
EF434450.1	Uncultured bacterium clone qFR1 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	150	150	91%	4e-33	73%	
DQ318060.1	Uncultured bacterium clone EP46 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	150	150	97%	4e-33	74%	
DQ318058.1	Uncultured bacterium clone CL50 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	150	150	87%	4e-33	75%	
CP000058.1	Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A, complete genome	149	149	97%	1e-32	72%	
CP000943.1	Methylobacterium sp. 4-46, complete genome	140	140	98%	6e-30	72%	
BA000040.2	Bradyrhizobium japonicum USDA 110 DNA, complete genome	140	140	88%	6e-30	73%	
DQ318103.1	Uncultured bacterium clone EP38 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	140	140	94%	6e-30	73%	
DQ318097.1	Uncultured bacterium clone CL35 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	140	140	70%	6e-30	75%	
CP002585.1	Pseudomonas brassicacearum subsp. brassicacearum NFM421, complete genome	136	136	88%	8e-29	72%	
AY457919.1	Marine alpha proteobacterium Y4I putative Zn-dependent hydrolase gene, partial cds; putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit	136	136	97%	8e-29	72%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	(pcaG) genes, complete cds; and conserved hypothetical protein gene, partial cds						
DQ318069.1	Uncultured bacterium clone CL59 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	136	136	97%	8e-29	71%	
GU560742.1	Uncultured bacterium clone SS100a15N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	134	134	70%	3e-28	75%	
GU560801.1	Uncultured bacterium clone SS100b37 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	132	132	93%	9e-28	72%	
GU560879.1	Uncultured bacterium clone SS10a35 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	131	131	69%	3e-27	74%	
GU560878.1	Uncultured bacterium clone SS10a40 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	131	131	69%	3e-27	74%	
GU560802.1	Uncultured bacterium clone SS100c27 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	131	131	70%	3e-27	74%	
GU560800.1	Uncultured bacterium clone FMb5 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	131	131	70%	3e-27	74%	
AF253466.1	Alpha proteobacterium Y3F putative Zn-dependent hydrolase gene, partial cds; LysR-type transcriptional regulator (pcaQ), gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), and protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and hypothetical protein gene, partial cds	131	131	97%	3e-27	71%	
DQ318099.1	Uncultured bacterium clone EP36 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	131	131	87%	3e-27	73%	
DQ318098.1	Uncultured bacterium clone AF5 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	131	131	87%	3e-27	73%	
DQ318096.1	Uncultured bacterium clone EP15 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	131	131	87%	3e-27	73%	
DQ318057.1	Uncultured bacterium clone CL51 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	131	131	87%	3e-27	73%	
GU560881.1	Uncultured bacterium clone Ua33N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	129	129	56%	1e-26	78%	
GU560883.1	Uncultured bacterium clone SS10b60 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	127	127	60%	4e-26	76%	
EF434429.1	Uncultured bacterium clone qY2 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	127	127	60%	4e-26	76%	
GU560882.1	Uncultured bacterium clone FMa29N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	125	125	70%	1e-25	74%	
GU560880.1	Uncultured bacterium clone FMa24N1 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	125	125	56%	1e-25	77%	
GU560828.1	Uncultured bacterium clone FMc41 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	125	125	70%	1e-25	74%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
EF434417.1	Uncultured bacterium clone qCSA6 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	125	125	59%	1e-25	77%	
AL939128.1	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segment 25/29	125	125	60%	1e-25	76%	
FP885895.1	Ralstonia solanacearum str. CMR15 chromosome, complete genome	122	122	56%	2e-24	77%	
CP000781.1	Xanthobacter autotrophicus Py2, complete genome	122	122	88%	2e-24	71%	
EF434451.1	Uncultured bacterium clone qFR2 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	122	122	70%	2e-24	73%	
FN821996.1	Streptomyces sp. L-49973 GE81112 biosynthetic gene cluster, strain L-49973	120	120	53%	6e-24	77%	
CP002910.1	Klebsiella pneumoniae KCTC 2242, complete genome	118	118	88%	2e-23	71%	
AP010950.1	Azospirillum sp. B510 plasmid pAB510d DNA, complete genome	118	118	58%	2e-23	76%	
CP001644.1	Ralstonia pickettii 12D chromosome 1, complete sequence	118	118	53%	2e-23	77%	
AY457918.1	Silicibacter pomeroyi putative LysR type transcriptional regulator (pcaQ), putative para-hydroxyBenzoat hydroxylase (pobA), putative gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC), putative protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and putative protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds; and conserved hypothetical protein gene, partial cds	118	118	99%	2e-23	70%	
FP885906.2	Ralstonia solanacearum str. PSI07 chromosome, complete genome	116	116	53%	7e-23	77%	
DQ318062.1	Uncultured bacterium clone EP76 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	116	116	53%	7e-23	76%	
FP885897.1	Ralstonia solanacearum str. CFBP2957 chromosome, complete genome	113	113	53%	9e-22	76%	
AP006725.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044 DNA, complete genome	113	113	88%	9e-22	70%	
CP000647.1	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578, complete sequence	113	113	88%	9e-22	70%	
CP002819.1	Ralstonia solanacearum Po82, complete genome	109	109	50%	1e-20	77%	
CP001349.1	Methylobacterium nodulans ORS 2060, complete genome	109	109	56%	1e-20	76%	
CP000377.1	Silicibacter sp. TM1040, complete genome	109	109	88%	1e-20	70%	
EF434431.1	Uncultured bacterium clone qY4 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	107	107	52%	4e-20	76%	
CP000264.1	Jannaschia sp. CCS1, complete genome	107	107	64%	4e-20	74%	
DQ318059.1	Uncultured bacterium clone EP70 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	107	107	53%	4e-20	76%	
GU560805.1	Uncultured bacterium clone FMb36 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit-like (pcaH) gene, partial sequence	105	105	53%	1e-19	76%	
GU180198.1	Streptomyces viridosporus T7A putative protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit mRNA, partial cds	105	105	57%	1e-19	74%	
AL646052.1	Ralstonia solanacearum GMI1000 chromosome complete	105	105	53%	1e-19	75%	

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
	sequence						
	Sagittula stellata putative LysR-type transcriptional regulator (pcaQ), putative para-hydroxyBenzoat hydroxylase (pobA), putative gamma-carboxymuconolactone decarboxylase (pcaC),	105	105	52%	1e-19	75%	
AF253465.2	protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH), protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit (pcaG), and hypothetical protein genes, complete cds						
FN543502.1	Citrobacter rodentium ICC168, complete genome	104	104	54%	5e-19	74%	
CP000759.1	Ochrobactrum anthropi ATCC 49188 chromosome 2, complete sequence	104	104	84%	5e-19	70%	
BA000012.4	Mesorhizobium loti MAFF303099 DNA, complete genome	104	104	60%	5e-19	74%	
AE007870.2	Agrobacterium tumefaciens str. C58 linear chromosome, complete sequence	102	102	86%	2e-18	70%	
EF434416.1	Uncultured bacterium clone qCSA4 protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit (pcaH) gene, partial cds	102	102	94%	2e-18	69%	
DQ898639.1	Sinorhizobium meliloti strain 41 pSymB megaplasmid B316 genomic sequence	102	102	53%	2e-18	75%	

[gb|CP000285.1|](#) Chromohalobacter salexigens DSM 3043, complete genome
Length=3696649

Features in this part of subject sequence:
[protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit](#)

Score = 462 bits (512), Expect = 4e-127
Identities = 284/297 (96%), Gaps = 4/297 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 9      CTGAGCGACGACGAGGGCTG-TACCGTT-CCGCACCATCAAGCC-GGTCCGTACCCCTGG 65
          |||
Sbjct 351614 CTGAGCGACGACGAGGGCTGGTACCGTTTC CGCACCATCAAGCCCGGCCCGTACCCCTGG 351673

Query 66     CC-AACGACATCAACAGCTGGCGGCGCGGCACATCCACGTCTCGGTGATGGGGCCGTCG 124
          |||
Sbjct 351674 CCCAACGACATCAACAGCTGGCGGCGCGGCACATACACGTCTCGGTGATGGGGCCGTCG 351733

Query 125    ATCTCCACGCGCCTGATCACCCAGATGTACTTCGAGGGCGACCCGCTGATTCCGCTGTGC 184
          |||
Sbjct 351734 ATCTCCACGCGCCTGATTACCCAGATGTACTTCGAGGGCGACCCGCTGATTCCGCTGTGC 351793

Query 185    CCCATCGTGCAGACCCTGCGCGATCCCGAAGCCGTCAAGACCATGGTCGGTCTGCTCGAC 244
          |||
Sbjct 351794 CCCATCGTGCAGACCCTGCGCGATCCCGAAGCCGTCAAGACCATGGTCGGTCTGCTCGAC 351853

Query 245    ATGGCGCGCAGCCGCTCGATGGATTGCCTGGCCTACCGTTTCGACATCGTCTCCGC 301
          |||
Sbjct 351854 ATGGCGCGCAGCCGCTCGATGGATTGCCTGGCCTACCGTTTCGACATCGTCTCCGC 351910
  
```

[emb|FN869568.1|](#) Halomonas elongata DSM 2581, complete genome
Length=4061296

Features in this part of subject sequence:
[protocatechuate 3,4-dioxygenase, beta subunit](#)

Score = 293 bits (324), Expect = 5e-76
Identities = 236/280 (84%), Gaps = 4/280 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 14      CGACGACGAGGGCTG-TACCGTTC-CGCACCATCAAGCC-GGTCCGTACCCCTGGC-CAA 69
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3470997 CGACGAGCAGGGCTGGTATCGTTTTTCGCACCATCAAGCCCGGCCCTATCCGTGGGGCAA 3470938

Query 70      CGACATCAACAGCTGGCGGCCGGCGCACATCCACGTCTCGGTGATGGGGCCGTTCGATCTC 129
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3470937 CGGCATCAATACCTGGCGCCCGGCGCACATCCACGTGTCTGGTATGGGGCCCATCGATTTTC 3470878

Query 130     CACGCGCCTGATCACCCAGATGTACTTTCGAGGGCGACCCGCTGATTCGGCTGTGCCCAT 189
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3470877 CACCCGTCTGATCACCCAGATGTATTTTCGAAGGTGACCCGCTGATTCGGCTGTGCCCGAT 3470818

Query 190     CGTGCAGACCCTGCGCGATCCCGAAGCCGTCGAAGACCATGGTCCGGTCTCGACATGGC 249
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3470817 CGTGCAGACCCTCAAGGACCCCGAGGCCGTCGAGACCATGATCGGCCGTCTCGACATGGC 3470758

Query 250     GCGCAGCCGCTCGATGGATTGCCTGGCCTACCGTTTCGAC 289
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3470757 GCGCAGCCGTCCCATGGACTGCCTGGCGTATCGGTTCGAC 3470718

```

[gb|DQ841293.1](#) Pseudomonas sp. DSM 6978 protocatechuate 3,4-dioxygenase b-subunit (pcaH) gene, partial cds
 Length=395

Score = 226 bits (250), Expect = 6e-56
 Identities = 235/302 (78%), Gaps = 6/302 (2%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 3      CGAGCGCTGAGCGACGACGAGGGCTGTACCGT--TCCGCACCATCAAGCC-GGTCCGTAC 59
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 91      CGCGCGCTGACCGACAACGAAGCCCGCTACGTCTTCCGCACCATCAAGCCCGGCCCTAC 150

Query 60     CCCTGGC-CAACGACATCAACAGCTGGCGGCCGGCGCACATCCACGTCTCGGTGATGGGG 118
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 151     CCGTGGCGCAACGGCCGAACGACTGGCGTCCGGCGCACATCCACTTCTCCATCAGCGGC 210

Query 119    CCGTCGATCTCCACGCGCCTGATCACCCAGATGTACTTCGAGGGCGACCCGCTGATTCGG 178
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 211    CCGTCGATCGCCACCCGCTGATCACCCAGCTGTACTTCGAGGGTGACCCGCTGATCCCG 270

Query 179    CTGTGCCCATCGTGCAGACCCTGCGCGATCCCGAAGCCGTCGAAGACCATGGTCCGGTCTG 238
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 271    ATGTGCCCGATCGTCAAGTTCGATCGCCAACCCCGAAGCCGTGCAGACGCTGATCGCGCGC 330

Query 239    CTCGACATGGCGCGCAGCC-GCTCGATGGATTGCCTGGCCTACCGTTTCGACATCGTCTC 297
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 331    CTGGACATGG-GCATGGCCAACCCCATGGACTGCCTCGCCTACCGCTTCGACATCGTGCT 389

Query 298    CC 299
           ||
Sbjct 390    CC 391

```

[gb|AF302797.2|AF302797](#) Pseudomonas sp. IMT40 ferulyl-CoA synthetase gene, partial cds;
 and para-hydroxy Benzoat hydroxylase (pobA), PobR (pobR), PcaQ (pcaQ), protocatechuate 3,4 dioxygenase beta subunit (pcaH), and protocatechuate 3,4 dioxygenase alpha subunit (pcaG) genes, complete cds
 Length=7171

Score = 199 bits (220), Expect = 8e-48
 Identities = 212/272 (78%), Gaps = 6/272 (2%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 34      TTCCGCACCATCAAGCCGGTCC-GTACCCTGGC-CAACGACATCAACAGCTGGCGGCCG 91
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 4297     TTCCGCACCATCAAGCCGGGCCGTACCCCTGGCGCAACGGTCCGAACGACTGGCGGCCG 4356

Query 92      GCGCACATCCACGTCTCGGTGATGGGGCCGTTCGATCTCCACGCGCCTGATCACCCAGATG 151
           ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 4357     GCGCACATCCACTTTTCCATTACCGGTCCGTTCGATCTCGACGCGGCTGATCACCCAGCTC 4416

```

```

Query 152 TACTTCGAGGGCGACCCGCTGATTCCGCTGTGCCCCATCGTGCAGACCCTGCGCGATCCC 211
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 4417 TACTTCGAAGGGGATCCGTTGATTCCGAAGTGTCATCGTCAAGTCCAT-CGCCAACC 4475

Query 212 -GAAGCCGTCAAGACCATGGTCGGTCGTCTCGACATGGCGCGCAGCC-GCTCGATGGATT 269
          || || || ||| || || || || || ||| || || || || ||| || ||| ||
Sbjct 4476 GGATGCGGTGCAGACGCTGATCGCCCGCTGGACAT-GAGCATGGCCAACCCGATGGACT 4534

Query 270 GCCTGGCCTACCGTTTCGACATCGTCCTCCGC 301
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 4535 GCCTGGCCTACCGTTTCGACATCGTCCTCCGC 4566

```

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevim Feyza ERDOĞMUŞ

Doğum Yeri ve Tarihi : Afyon/19.02.1981

Yabancı Dili : İngilizce

İletişim (Telefon/e-posta) : 0 505 494 99 06/feyzakus@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Afyon Anadolu Öğretmen Lisesi/1999

Lisans : Dokuz Eylül Üniversitesi/1999-2004

Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi/2004-2007

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Afyon Kocatepe Üniversitesi/2005-devam ediyor

Yayımları (SCI ve diğer) :

SCI MAKALE

1. Bulut, S., Erdoğan, S.F., Konuk, M., Cemek, M. (2010). The organochlorine pesticide residues in the drinking waters of Afyonkarahisar, Turkey, *Ekoloji*, **19**: 74, 24-31.
2. Bulut, S., Uysal, K., Cemek, M., Gök, V., Kuş, S.F., Karaçalı, M. Nutritional evaluation of seasonal changes in muscle fatty acid composition of Common carp (*Cyprinus carpio*) in Karamık Lake, Turkey, *International Journal of Food Properties*, DOI: 10.1080/10942911003664891.

DİĞER MAKALE

1. Korcan, S.E., Fidan, S., Erdoğan, S.F., Konuk, M. (2010). Lanaset Blue 2R'nin dekolorizasyonda Pb ve Cd'un *Pleurotus* türleri üzerine olan etkisi, *BiyoTeknoloji Elektronik Dergisi*, **1**: 1-6.
2. Özkara, A., Akyıl, D., Erdoğan, S.F., Konuk, M. (2011). Evaluation of germination, root growth and cytological effects of wastewater of sugar factory (Afyonkarahisar) using *Hordeum vulgare* bioassays, *Environmental Monitoring and Assessment*, DOI 10.1007/s10661-011-1936-7.

TEBLİĞ veya BİLDİRİ

1. Bulut, S., Cemek, M., Gök, V., Karaçalı, M., Kuş, S.F., Eber Gölü'nde Yaşayan *Esox lucius* (L: 1758)'un Kas Dokusu Yağ Asidi Kompozisyonunun Mevsimsel Değişimi, 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Adnan Menderes Üniversitesi, Kuşadası/AYDIN.
2. Bulut, S., Cemek, M., Gök, V., Kuş, S.F., Karaçalı, M., Karamık Gölü'nde Yaşayan *Cyprinus carpio* (L: 1758)'un Kas Dokusu Yağ Asidi Kompozisyonunun Mevsimsel Değişimi", 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Adnan Menderes Üniversitesi, Kuşadası/AYDIN.
3. Kuş, S.F., Bulut, S., Konuk, M., Afyonkarahisar İli İçme Sularında Organoklorlu Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi, VII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 10-13 Eylül 2007, İnönü Üniversitesi, MALATYA.
4. Erdoğan, S.F., Bulut, S., Konuk, M., Cemek, M., Karamık Gölü Suyunda Organoklorlu Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2008, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.
5. Bulut, S., Erdoğan, S.F., Konuk, M., Cemek, M., Akkaya, L., Birdane, O.Y., Eber Gölü ve Akşehir Gölü'ndeki (Afyonkarahisar) Organoklorlu Pestisit Kalıntı Miktarları, IX. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 07-10 Ekim 2009, Nevşehir.
6. Özkara, A., Akyıl, D., Erdoğan, S.F., Konuk, M., Afyon Şeker Fabrikası Atık Suyunun *Hordeum vulgare* L. Çimlenme Yüzdesi, Kök Ucu Uzunluğu ve Mitotik İndeks Üzerine Olan Etkisi", 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Denizli.
7. Erdoğan, S.F., Korcan, S.E., Fidan, S., Cığerci, İ.H., Konuk, M., Üç Farklı *Pleurotus* Türünün Lcc ve MnP Enzim Aktiviteleri Üzerine Bazı Ağır Metallerin Etkisinin Agar Besiyerinde Belirlenmesi, 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 26-29 Ekim 2010, Antalya.
8. Erdoğan, S.F., Korcan, S.E., Fidan, S., Konuk, M., Lanaset Blue 2R'nin Dekolorizasyonu Üzerine Pb ve Cd Etkisinin *Pleurotus* Türlerinde Spektrofotometrik olarak Belirlenmesi, 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 26-29 Ekim 2010, Antalya.
9. Erdoğan, S.F., Akyıl, D., Özkara, A., Korcan, S.E., Konuk, M., Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Mikrobiyal Biodegradasyonu, 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 26-29 Ekim 2010, Antalya.

ARAŞTIRMA PROJESİ

1. Afyonkarahisar İli ve Çevresinde Yer Alan Eber Gölü, Karamık Gölü, Akşehir Gölü Suları ve Balıkları ile İçme Suyunda Organoklorlu Pestisitlerin Belirlenmesi (Tübitak Projesi ÇAYDAG 105Y135)(tamamlandı)
2. Afyonkarahisar İli İçme Suları ile Eber ve Karamık Gölü Sularındaki Organoklorlu Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi (AKU-BAP FENED-016)(tamamlandı)
3. Bazı Mikroorganizmaların Aromatik Hidrokarbonları (fenantren, piren, naftalen) Parçalama Yeteneklerinin Araştırılması (AKU-BAP 10 FENED-11)