

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİSAKKARİT ÜRETEN EKSTREMOFİLLERİN
BELİRLENMESİ VE EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ**

**Bahar GÜRLEYENDAĞ
(Kimyager)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
Yrd.Doç.Dr. Ebru TOKSOY ÖNER**

İSTANBUL 2006

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİSAKKARİT ÜREten EKSTREMOFİLLERİN
BELİRLENMESİ VE EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ**

Bahar GÜRLEYENDAĞ

(Kimyager)

(141100520040003)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

BİYOKİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN

Yrd.Doç.Dr. Ebru TOKSOY ÖNER

İSTANBUL 2006

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca yönlendirici ve yol gösterici olan, değerli görüş, öneri ve deneyimlerini benden esirgemeyen, bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan tez danışmanım ve hocam Kimya Mühendisliği Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru TOKSOY ÖNER'e, itina ve sabırla her zaman yanımda olduğu için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, Sayın Yrd. Doç. Dr. Parvaneh ASSA'ya ve tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen, Sayın Prof. Dr. Dilek KAZAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmamın Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, İleri Üretim ve Yönetim Teknolojileri Araştırma Birimi Laboratuvarlarında gerçekleşmesine olanak sağlayan ve desteklerini esirgemeyen, Mühendislik Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. A. Alp SAYAR'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarına katkıda bulunan Sayın Serpil ERASLAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım esnasında aynı laboratuvarı paylaştığım çalışma arkadaşlarıma sevgilerimi sunarım.

Hayatımın her anında olduğu gibi, tez çalışmam boyunca da anlayışları, sevgileri ve sabırlarıyla beni destekleyen değerli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
YENİLİK BEYANI	ix
SEMBOL LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiii
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER	3
II.1. MİKROBİYAL EKZOPOLİSAKKARİTLER	3
II.2. EKZOPOLİSAKKARİTLERİN KOMPOZİSYONU	5
II.2.1 Halofilik <i>Halomonas</i> Türleri Tarafından Sentezlenen Egzopolisakkaritlerin Kimyasal Kompozisyonu	7
II.3. EPS ÜRETEEN MİKROORGANİZMALAR	8
II.4. EKZOPOLİSAKKARİTLERİN ENDÜSTRİYEL AÇIDAN ÖNEMİ	9
II.4.1. Doğal Gıda Korunmasında Antimikrobiyal Bileşik Olarak EPS	9
II.4.2. Gıda Uygulamalarında EPS	10
II.4.3. Sağlık Alanında EPS	11
II.4.4. Biyofilm Oluşumunda EPS	12
II.5. EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ	13

BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMALARI	16
III.1. ARAŞTIRMA ARAÇ VE GEREÇLERİ	16
III.1.1. Araştırma İmkanları	16
III.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
III.1.3. Mikroorganizmalar	16
III.1.4. Kullanılan Besi Yerleri	17
III.1.5. Kullanılan Tamponlar	19
III.1.6. Kullanılan Çözeltiler.....	19
III.1.7. Kullanılan Cihaz ve Ekipman.....	20
III.2. ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ	21
III.3. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	21
III.3.1. Sterilizasyon	21
III.3.2. Ön kültür Hazırlanması	22
III.3.3. İzolatların Stoklara Alınması	23
III.3.4. Moleküler Tanılama Yöntemleri	24
III.3.4.1. Genomik DNA İzolasyonu	24
III.3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	25
III.3.4.3. 16S rDNA Bölgeleri İçin Sekanslama	
Reaksiyonu ve Saflaştırılması.....	28
III.3.4.4. PCR Ürünlerinin ABI 310 DNA Cihazı ile	
16S rDNA Dizisinin Belirlenmesi	29
III.3.4.5. ABI 310 DNA Cihazı ile Elde Edilen	
Verilerin Değerlendirilmesi	30
III.3.5. İzolatların Büyüme Miktarlarının Ölçümü	30
III.3.6. EPS Konsantrasyonunun Belirlenmesi	30
 BÖLÜM IV SONUÇLAR	 32
IV.1. İZOLATLARIN MOLEKÜLER TANILAMASI.....	32
IV.1.1. 16S rDNA Bölgelerinin Agaro Jel Elektroforezi	
İle Analizi	33
IV.1.2. İzolatların 16S rDNA PCR Ürünlerinin	
Saflaştırılması ve DNA Konsantrasyonlarının Ölçümü.....	35
IV.1.3. İzolatların 16S rDNA Dizi Analizleri	36
IV.2. HALOFİLİK BAKTERİ İZOLATLARININ EPS	
ÜRETİMLERİNİN BELİRLENMESİ VE OPTİMİZASYONU ..	36
IV.2.1. Halofilik Bakteri İzolatlarının Kompleks ve Minimal	
Besi Yerlerindeki Büyüme ve EPS Üretimlerinin	
Karşılaştırılması ve En İyi Üreticinin Belirlenmesi	37
IV.2.2. Optimum Büyümenin ve EPS Üretiminin Sağlandığı	
Pepton Konsantrasyonunun Belirlenmesi	40
IV.2.3. Optimum Büyümenin ve EPS Üretiminin Sağlandığı	
Karbon Kaynağının Belirlenmesi	43
IV.2.4. Optimum Büyümenin ve Üretim Sağlandığı	
Tuz Konsantrasyonunun Belirlenmesi	46

IV.3. EPS ÜRETEN HALOFİLİK ARKEA İZOLATLARININ BELİRLENMESİ	49
IV.3.1. Farklı Sıcaklık ve Besi Yeri Ortamlarında Büyütülen Arkea İzolatlarının Büyüme Değerleri ve EPS Üretimlerinin Karşılaştırılması	49
IV.3.1.1. BG5 Arkea İzolatının EPS Üretimi	50
IV.3.1.2. BG13 Arkea İzolatının EPS Üretimi	51
BÖLÜM V. TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME	54
V.1. MOLEKÜLER TANILAMA ÇALIŞMALARI	54
V.2. HALOFİLİK BAKTERİ İZOLATLARININ EPS ÜRETİMİ İÇİN OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI	54
V.2.1. Besi Yerinin Önemi	55
V.2.2. Azot Kaynağının Büyüme ve EPS Üretimi Üzerine Etkisi	56
V.2.3. Karbon Kaynağının Büyüme ve EPS Üretimi Üzerine Etkisi	56
V.2.4. NaCl Konsantrasyonunun Büyüme ve EPS Üretimi Üzerine Etkisi	59
V.3. ARKEA İZOLATLARININ EPS ÜRETİMİ İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR	60
KAYNAKLAR	61
EKLER	73
ÖZGEÇMİŞ ..	89

ÖZET

POLİSAKKARİT ÜRETEK EKSTREMOFİLLERİN BELİRLENMESİ VE EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ

Mikrobiyal polisakkaritlerin değişik endüstriyel alanlardaki yaygın kullanımları göz önüne alınarak, farklı özelliklere sahip ekzopolisakkaritlerin belirlenmesi amacı ile İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole edilmiş ve yüksek tuz konsantrasyonlarında üreme kabiliyeti gösteren halofilik bakteri ve arkea izolatlarının ekzopolisakkarit (EPS) üretim kapasiteleri araştırılmıştır. Aynı zamanda, izolatların moleküler tanılamalarının ilk aşaması olarak, 16S rDNA bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve ABI 310 cihazı kullanılarak rDNA bölgelerinin DNA dizi analizi yapılmıştır.

Halofilik bakteri izolatlarının kompleks ve minimal besi yeri ortamındaki büyüme ve EPS üretim kapasitelerinin karşılaştırılması sonucu, MÜ6 izolatının en iyi üretici olduğu belirlenmiştir. Mikroorganizmaların büyüme ve EPS verimlerinin artırılması amacı ile minimal besi yerinin içerdiği karbon kaynağı, pepton ve tuz konsantrasyonları optimize edilmiştir. Azot kaynağı olarak peptonun büyüme ve ekzopolisakkarit üretimi üzerine etkisi karbon kaynağı olarak süktrozun kullanıldığı minimal besi yerinde araştırılmış ve optimum pepton konsantrasyonunun ‰0.5 olduğu belirlenmiştir. 2.5M(‰15) NaCl konsantrasyonunun ve karbon kaynağı olarak glukoz ve laktozun kullanılmasının halofilik bakteri izolatlarının büyümesi ve EPS üretim verimlerinin artırılması açısından gerekli olduğuna karar verilmiştir.

Arkea izolatlarının ise Brown ve Haloarcula besi yeri ortamlarında ve 37°C ve 39°C olmak üzere iki farklı sıcaklıktaki büyüme ve EPS üretimleri araştırılmıştır.

İzolatlar, katı besi yeri ortamında koloni oluştururken, sıvı ortamdaki büyümeleri farklılık göstermiştir. BG5 izolatu bütün koşullarda büyümüştür. Ancak Brown besi yerinde BG13 izolatu için uygun sıcaklık 39°C iken BG1 ve BG6 izolatları her iki sıcaklıkta ve sıvı besi yeri ortamında da büyüme göstermemiştir. Arkea izolatlarının EPS üretimlerinin daha uzun bir süreçte analiz edilmesinin gerekliliği anlaşılmıştır.

Haziran, 2006

Bahar GÜRLEYENDAĞ

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF POLYSACCHARIDE-PRODUCING EXTREMOPHILES AND EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION

Considering the widespread use of microbial polysaccharides in various industrial applications, halophilic bacteria and archaea isolated from Çamaltı Saltern Area in İzmir, Turkey were screened for their polysaccharide-producing abilities with the aim of finding exopolysaccharides (EPS) with novel and valuable properties. To initiate the molecular identification studies, the DNA sequence of the PCR amplified 16S rDNA region of the isolates were determined using ABI 310 Automated DNA Sequencer.

Growth and EPS production capacities of the halophilic bacterial isolates were compared in both complex and minimal media and MÜ6 was identified as the best EPS producer strain. To improve the growth and EPS production yields, the peptone and salt concentrations as well as the carbon source within the minimal medium was optimized. Effect of peptone as nitrogen source on both growth and EPS yields was analyzed in minimal media with sucrose as carbon source and %0.5 was found to be the optimum peptone concentration. A salinity level of 2.5M(15%) NaCl and use of both glucose and lactose as carbon sources were found to be necessary for optimum yields.

Archaeal isolates, on the other hand, were analyzed for their growth and EPS production abilities in both Brown and Haloarcula Complex media at temperatures of 37°C and 39°C. All archaeal isolates formed colonies on solid agar plates, however, they showed different growth characteristics in liquid media. Isolate BG5 did grow

under all conditions. Whereas BG13 showed good growth only in Brown medium at 39°C, BG1 and BG6 failed to grow under all conditions in liquid media. Prolonged fermentation periods were determined to be essential for analyzing the EPS production of archaeal isolates.

June, 2006

Bahar GÜRLEYENDAĞ

YENİLİK BEYANI

POLİSAKKARİT ÜRETEN EKSTREMOFİLLERİN BELİRLENMESİ VE EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ

Ekstremofillerin biyolojide ve birçok organizmanın evriminde önemli bakış açısı sağladığı ve yeni biyoteknolojik prosesleri kullanmak için önemli bir kaynak olduğu yaygın olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle lipidlerinin, enzimlerinin ve biyopolimerlerinin bu ekstrem şartlara adaptasyonu sağlayacak bazı farklı özelliklerinin olduğu düşünülmektedir. Gıda, ilaç, tarım ve atık su arıtımı gibi değişik endüstrilerde birçok uygulaması olan yeni mikrobiyal polisakkaritlere son yıllarda artan bir ilgi duyulmaktadır.

Bu tez kapsamında yapılan moleküler çalışmalar, ülkemiz kaynaklarından izole edilmiş halofilik mikroorganizmaların tanımları üzere yapılan araştırmaların bir parçası olacaktır. Aynı zamanda, bu tez kapsamında yapılmış olan çalışmalardan alınmış olan sonuçlar doğrultusunda, ekstremofillerden ekzopolisakkarit sentezinin optimizasyonu yapılmış, önemli olan parametreler ortaya konulmuştur. Türkiye’den izole edilmiş halofilik mikroorganizmalar ile ekzopolisakkarit üretimi üzerine daha önce literatürde bir çalışma olmamasından dolayı, elde edilen ekzopolisakkaritlerin çeşitli özelliklerinin belirlenmesi bu alanda yapılan çalışmalara bilimsel olarak katkıda bulunacaktır ve ülkemiz kaynaklı üretilmiş ekzopolisakkaritlerin farklı biyoteknolojik uygulamalarda potansiyel kullanımlarının anlaşılmasını sağlayacaktır. Ekzopolisakkaritlerin yeni özelliklerinin endüstride sağlayacağı avantajlar, ekstremofillerin endüstrideki potansiyel uygulamalarında önemli bir nokta oluşturabilir.

Haziran, 2006

**Yrd. Doç. Dr.
Ebru TOKSOY ÖNER**

Bahar GÜRLEYENDAĞ

SEMBOL LİSTESİ

kg	: Kilogram
g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
l	: Litre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
g/l	: Gram/litre
µg/ml	: Mikrogram/mililitre
M	: Molar
pmol	: Pikomol
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
atm	: Atmosfer
%	: Yüzde
‰	: Binde
dak	: Dakika
∞	: Sonsuz
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
w/v	: Ağırlık/hacim
v/v	: Hacim/hacim

KISALTMALAR

rDNA	: Ribozamal deoksiribonükleik asit
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Taq DNA Polimeraz	: <i>Thermus aquaticus</i> 'dan elde edilen termostabil enzim
TBE	: Tris Borat tamponu
EPS	: Ekzopolisakkarit
pH	: Asitlik derecesi
dNTP	: Deoksiribonükleosid trifosfat
bç	: Baz çifti
T_m	: DNA erime ısı
ABI	: Applied Biosystem, DNA dizileme cihaz markası
ProSeq	: Processor of Sequences
YPGS Besi Yeri	: Maya özütü-pepton-glukoz-mineral tuzlardan oluşan besi yeri
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tools
<i>H.</i>	: Halomonas
<i>Lb.</i>	: Lactobacillus
<i>Lc.</i>	: Lactococcus

ŞEKİL LİSTESİ

		<u>Sayfa No</u>
Şekil IV.1	Halofilik Bakterilerin F27 ve U1492r Primerleri İle Elde Edilen 16S rDNA PCR Ürünlerinin Jel Elektroforez Analizi	33
Şekil IV.2	Arkea İzolatlarının A21f ve A958r Primerleri İle Elde Edilen 16S rDNA PCR Ürünlerinin Jel Elektroforez Analizi	34
Şekil IV.3	Halofilik Bakteri İzolatlarının Zamana Karşı Büyüme Profilleri	37
Şekil IV.4	Halofilik Bakteri İzolatları Tarafından Üretilen EPS Miktarlarının Zamana Karşı Profili	38
Şekil IV.5	Farklı Pepton Konsantrasyonlarında Büyütülen MÜ6 İzolatının EPS Üretiminin Grafik İle Gösterimi	42
Şekil IV.6	Farklı Karbon Kaynakları İçeren Besi Yerlerinde Büyütülen MÜ6 Kültürlerinin Zamana Karşı Büyüme Profilleri	43
Şekil IV.7	Farklı Karbon Kaynakları İçeren Besi Yerlerinde Büyütülen MÜ6 Kültürlerinin Zamana Karşı Büyüme Profilleri	45
Şekil IV.8	Farklı Karbon Kaynağı İçeren Minimal Besi Yerlerinde Üretilen EPS Miktarlarının Zamana Karşı Profilleri	45
Şekil IV.9	BG5 Arkea İzolatının Zamana Karşı Büyüme Profili	50
Şekil IV.10	BG5 Arkea İzolatın İçin Hesaplanan EPS Değerleri	51
Şekil IV.11	BG5 Arkea İzolatının Zamana Karşı Büyüme Profili	51
Şekil IV.12	BG5 Arkea İzolatın İçin Hesaplanan EPS Değerleri	52
Şekil IV.13	Arkea İzolatlarının 39°C’de Gösterdikleri Büyüme Profilleri	52

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo II.1 Ekzopolisakkaritlerin İçerdiği Substitüentler	6
Tablo.II.2 <i>Halomonas eurihalina</i> ve <i>Halomonas maura</i> Tarafından Sentezlenen Ekzopolisakkaritlerin Kimyasal Kompozisyonu	7
Tablo II.3 Mikrobiyal Polisakkaritlerin Özellikleri ve Kullanım Alanları	13
Tablo III.1 16S rDNA PCR Uygulamalarında ve 16S rDNA Dizi Analizinde Kullanılan Primerler ve Özellikleri	26
Tablo IV.1 İzolatların Saf 16S rDNA PCR Ürünlerinin Konsantrasyonu	35
Tablo. IV.2 İki Farklı Besi Yerinde Büyütülen MÜ6 ve MÜ14 İzolatlarının Spektrofotometrik Olarak Ölçülen ve Büyümeyi Gösteren OD _{660nm} Değerleri	39
Tablo. IV.3 İki Farklı Besi Yerinde Büyütülen MÜ6 ve MÜ14 İzolatlarının EPS Üretimlerinin Karşılaştırılması	39
Tablo. IV.4 Farklı Pepton Konsantrasyonlarında Büyütülen MÜ6 İzolatının Büyümeyi Gösteren OD _{660nm} Değerleri	41
Tablo. IV.5 Farklı Karbon Kaynağı İçeren Besi Yerlerinde Üretilen EPS Miktarları	44
Tablo IV.6 Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Elde Edilen Büyüme Değerleri	47
Tablo IV.7 Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Üretilen EPS Miktarları	48
Tablo IV.8 Arkea İzolatlarının Büyüdükleri Besi Yerleri ve Sıcaklıklar	49
Tablo.E.1 37°C’de Arkea İzolatlarının Haloarcula Besi Yerinde Ölçülen OD _{660nm} Değerleri	88
Tablo.E.2 39°C’de Arkea İzolatlarının Brown(1963) ve Haloarcula Besi Yerlerinde Ölçülen OD _{660nm} Değerleri	88

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Mikroorganizmalar tarafından üretilen mikrobiyal polisakkaritler, suda çözünebilen iyonik veya noniyonik biyopolimerlerdir. Gıda, ilaç, tarım ve atık su arıtımı gibi değişik endüstrilerde birçok uygulaması olan yeni mikrobiyal polisakkaritlere son yıllarda artan bir ilgi duyulmaktadır. Yeni bir biyomateryal olarak kabul edilen ve hücre dışına salgılanan ekzopolisakkaritler (EPS) ise, farklı fizikokimyasal ve reolojik özelliklerinden dolayı petrol, gıda, tekstil, deterjan, kozmetik, tarım ve atık su arıtımı gibi değişik endüstrilerde birçok uygulama alanı edinmiştir. Jelleştirme, kıvam artırıcı ve biyofilm tabakası oluşturma gibi özelliklerinin yanında, ekzopolisakkaritler, ilaç sektöründe, anti-tümör, anti-viral ve anti-inflamatuar gibi fizyolojik aktivite ajanlarına yardımcı madde olarak da kullanılmaktadırlar (Kumar ve diğ., 2004).

Birçok biyoteknolojik ürün için kaynak oluşturan ekstremofiller, yaşamak için çok zor olan şartları sadece tolere etmeyen, aynı zamanda optimum olarak bu doğal şartlarda büyüyen mikroorganizmalardır (Galinski ve Tindall, 1992). Yüksek sıcaklık, asidik ve alkali ortamlar, yüksek basınçlar ve aşırı tuzlu ortamlar gibi çok değişik ekstrem ortamlarda yaşayabilmelerinden dolayı, bu mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin, lipitlerin ve biyopolimerlerinde bazı özel yapılar sahip olabilecekleri düşünülmektedir (Oren, 2002). Bu doğrultuda, son 15 yıl içinde, yüksek sıcaklık ve basınçtaki, yüksek H₂S ve ağır metal konsantrasyonu içeren deniz altındaki sıcak su kaynaklarından ekzopolisakkarit üreticisi ekstremofiller izole edilmiş ve optimize edilmiş koşullarda üretilmiş ekzopolisakkaritlerin

karakterizasyonu yapılmıştır. Ancak, polisakkarit üretme kapasitesine sahip halofilik ekstremofiller hakkında son yıllarda bile çok az bilgi bulunmaktadır. Bu sebepten dolayı, Türkiye'deki kaynaklardan izole edilmiş olan ekstremofilik mikroorganizmaların ekzopolisakkarit üretim kapasitelerinin araştırılması, bu konularda bilgi birikimi oluşması açısından çok önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, polisakkarit üretim kapasitesine sahip halofilik mikroorganizmaların belirlenmesi ve ekzopolisakkarit üretim şartlarının optimizasyonudur. Bu amaç doğrultusunda yapılmış olan çalışmalarda, İzmir Çamaltı Tuzlası, Tuz Üretim Havuzu'ndan toplanmış olan toprak örneklerinden izole edilmiş ve yüksek tuz konsantrasyonlarında üreme kabiliyeti gösteren 10 adet halofilik bakteri ve 4 adet arkea izolatu kullanılmıştır. Öncelikle, moleküler tanılamalarının ilk aşaması olarak, izolatların 16S rDNA bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve ABI 310 cihazı kullanılarak rDNA bölgelerinin DNA dizi analizi yapılmıştır. Daha sonraki aşamalarda ise, izolatların EPS üretim kapasiteleri araştırılmıştır. En iyi ekzopolisakkarit üretim kapasitesine sahip olan halofilik bakteri izolatu belirlenerek, optimum EPS üretiminin gerçekleştiği pepton konsantrasyonu, karbon kaynağı ve tuz konsantrasyonu belirlenmiştir. Arkea izolatlarının ise iki farklı besi yerinde ve iki farklı sıcaklıktaki büyüme ve EPS üretimleri araştırılmıştır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

Bilindiği gibi ekstremofiller, birçok biyoteknolojik ürün için kaynak oluşturmaktadır (Galinski ve Tindall, 1992). Yüksek sıcaklık, asidik ve alkali ortamlar, yüksek basınçlar ve aşırı tuzlu ortamlar gibi çok değişik ekstrem ortamlarda yaşayabilmelerinden dolayı, bu mikroorganizmalardan elde edilen biyopolimerlerin de bazı özel yapılara sahip olabilecekleri düşünülmektedir (Oren, 2002). En iyi büyümeyi 0.5 ile 2.5M arasında değişen NaCl konsantrasyonlarında gösteren ekstremofilik mikroorganizmalar olan ılımlı halofiller, taksonomik ve fizyolojik olarak bakteri alemine ve bazı arkea gruplarına dağıtılabilir (Kushner ve Kamekura,1988). Bu mikroorganizmalardan bazılarının ekolojileri, fizyolojileri ve taksonomileri üzerine yapılan çalışmalar on yıldan bu yana biyoteknolojinin birçok alanında ekzoenzim, ekzopolisakkarit ve diğer değerli ticari substratların doğal üreticileri olarak potansiyel değerlerinden ötürü önemli ölçüde incelenmektedir (Rodriguez-Valera 1988,1991; Vreeland ve Hochstein, 1993; Ventosa ve diğ.,1998).

II.1. MİKROBİYAL EKZOPOLİSAKKARİTLER

Mikroorganizmalar tarafından üretilen mikrobiyal polisakkaritler, suda çözünebilen iyonik veya noniyonik biyopolimerlerdir. Mikrobiyal polisakkaritlerin tekrarlanan üniteleri glikozid bağları ile birleştirilmiş, düzenli, dallanmış veya dallanmamış yapıdadırlar. Bu polisakkaritler, diğer bileşenler ile beraber hücre duvarında (LPS), kapsül halinde hücrelere bağlanmış (CPS) veya hücre dışına salgılanmış (EPS) halde bulunurlar (Boyle ve diğ., 1983; Nicolaus ve diğ., 1999; Sutherland, 1990; Guezennec ve diğ., 1994). Ekzopolisakkaritler kompozisyonları ve

yapıları bakımından oldukça fazla farklılıklar gösteren birçok türe sahiptir. Bu polimerlerin bazıları hücre duvarı bileşenleri ile kimyasal bakımdan yüksek oranda benzerliğe sahip iken, büyük kısmı hücre bileşenleri ile ilişkisi olmayan farklı kimyasal yapıdadırlar (Sutherland, 1990).

Kimyasal kompozisyonlarına göre farklılık gösterebilen bu polisakkaritler, homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak ikiye ayrılırlar. Homopolisakkaritler tek bir monosakkaritten oluşurken, heteropolisakkaritler en az iki farklı monosakkaritten oluşur (Broadbent ve diğ., 2003). Bulundukları yer ve kimyasal kompozisyonlarına ilaveten polisakkaritlerin özelliklerini etkileyen moleküler kütle ve konformasyon gibi başka kriterlerde mevcuttur. Homopolisakkaritlerin üç farklı türü bulunmaktadır. Bunlardan ilki tek tip bağlardan oluşan lineer nötral homopolisakkaritlerdir. Bunlardan farklı olarak açıl grupları içeren polianyonik homopolimerler de mevcuttur. Üçüncü tür olan sikleroglukan tipi homopolisakkaritler daha kompleks yapıdaki nadir olarak rastlanan türlerdir. Bu tür homopolisakkaritler, tekrarlayan 1,6- α -D-glikosil yan zincirlerinden dolayı tetrasakkarit ünitelerine sahiptirler (Sutherland, 1990). İyi bilinen bir homopolisakkarit olan dekstran, laktik asit bakterisi *Leuconostoc mesenteroides* tarafından üretilirken, bir diğer homopolisakkarit olan glukan *Streptococcus mutans* tarafından üretilmektedir (De vuyst ve diğ., 2001). Mikrobiyal heteropolisakkaritlerin ise büyük bir çoğunluğu disakkaritlerden oktasakkaritlere kadar değişik büyüklüklerde tekrarlayan ünitelerden oluşur. Heteropolisakkaritler bir mol üronik asit içermektedir ve bu üronik asit genellikle D-glukuronik asittir. Tekrarlanan ünitelerin birbirine benzerliği kimyasal çalışmalar ile bir temele oturtulmuş olsa bile büyük veya kompleks tekrarlayan ünitelere sahip olan polimerlerde bir takım düzensizliklere rastlamak mümkündür. Ancak heteropolimerler genellikle birden dörde kadar değişik uzunluklardaki şekerlere sahip olan kısa yan zincirlerden oluşur. Bu kısa yan zincirler de nadiren kendi içlerinde dallanmış olabilirler. Aynı zamanda bazı farklı yan zincirler içeren ekzopolisakkaritlere de rastlamak mümkündür. Farklılık gösteren bu yan zincirler genellikle ana zincire bağlı olan tek bir monosakkarit formunda bulunur (Sutherland, 1990). *Streptococcus termophilus*, *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus* spp. gibi birçok laktik asit bakterisi tarafından heteropolisakkaritler sentezlenmektedir (De vuyst ve diğ., 2001).

Ekzopolisakkaritlerin tanımlanması mikrobiyal hücre duvarında bulunan karbohidrat içeren polimerlerin tanımlanmasından daha zordur. EPS üreten

mikroorganizmalar katı yüzeyler üzerinde kolonilerin mukoid görünüşü ile tanınabilirler. Sıvı besi yerlerinde ise, ekzopolisakkarit üreten kültürler oldukça viskoz bir hal alabilirler (Sutherland, 1990).

II.2. EKZOPOLİSAKKARİTLERİN KOMPOZİSYONU

Öncelikli olarak ekzopolisakkaritler karbohidratlardan oluşur, fakat çeşitli şekerlere ilaveten organik ve inorganik substitüentlere de sahip olabilirler. Mikrobiyal ekzopolisakkaritlerde bulunan karbohidratların oldukça fazla çeşidine rastlanmıştır. D-glukoz, D-galaktoz ve D-mannoz, piranoz formunda birçok ekzopolisakkaritte bulunmaktadır. 6-deoksiheksoz, L-fukoz ve L-ramnoz da sık rastlanan şekerlerdendir. Ökaryotlar ve prokaryotlar tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin kompozisyonlarında rastlanabilinecek farklılık pentoz şekerlerinin varlığıdır. Ökaryotik polisakkaritler D-riboz veya D-ksiloz gibi pentozları içerebilir, fakat prokaryotlar tarafından üretilen ekstraselüler polisakkaritlerde bu pentozların oluşumu yaygın değildir. Ancak Cyanobacteria için istisnai bir durum söz konusudur. Bu grup bakterilerde pentoz bulunabilir (Sutherland, 1990).

Yaygın olan monosakkaritlere ilaveten, bazı polisakkaritler nadir olarak rastlanabilinecek şekerleri de içerir. Bunlar, L-heksoz veya heksozların, glukozun ve galaktozun furanoz formları olabilir. Ayrıca çeşitli N-asetilamin şekerleri de olabilir, fakat şimdiye kadar endüstriyel önemi olan mikrobiyal polisakkaritlerin hiçbirinde N-asetilamin şekerlerine rastlanmamıştır (Sutherland, 1990).

Mikrobiyal polisakkaritlerin büyük bir çoğunluğu doğada polianyonik halde bulunurlar. Bunun sebebi birçok ekzopolisakkaritte üronik asit bulunmasıdır. En yaygın rastlanan üronik asitler sırasıyla D-glukuronik asit ve D-galakturonik asittir. Çok az sayıda polisakkaritte de D-mannuronik asitin varlığı tespit edilmiştir. Birçok polisakkarit tek bir üronik asit içermesine rağmen bakteriyel aljinalarda D-mannuronik asit genellikle L-guluronik asitle beraber bulunur (Sutherland, 1990).

Karbohidratlara ilaveten, ester-bağlı substitüentler ve pirüvat ketalleri gibi organik substitüentlerden bakteriyel ekzopolisakkaritlerde yaygın olarak bulunmasına rağmen, yapılan çalışmalarda ökaryotik polimerlerde varlıkları nadir olarak belirlenmiştir. Ester bağlı bir substitüent olan asetatın polisakkarit

molekölünün tüm yüküne bir katkısı yokken, aksine pirüvat ketalleri polimerin anyonik yapısına eklenir (Sutherland, 1990).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bakteriyel ekzopolisakkaritlerde bazı amino asitlerin varlığı da tespit edilmiştir. Örneğin, *E. coli* K40'dan elde edilen ekzopolisakkaritte serin bulunmuştur. Diğer bazı polisakkaritlerde de ester bağlı substitüent olarak taurine amino asidine rastlanmıştır (Sutherland, 1990).

Uzun zamandan beri inorganik bir substitüent olan sülfatın sadece ökaryotik polisakkaritlerde bulunduğu düşünülüyordu, fakat bazı prokaryotik polimerlerde de sülfat bulunduğu ortaya çıkmıştır. Fosfat ise yaygın olarak bulunan ve sık sık bakteriyel polisakkaritlerde rastlanan immünolojik öneme sahip bir substitüenttir. Fosfatlanmış ekzopolisakkaritlerin bir çoğu gram-pozitif bakterilerin duvarlarında bulunan taykoik asit ile benzerlik göstermektedir (Sutherland, 1990). Tablo II.1'de ekzopolisakkaritlerin içerdiği substitüentler ve üretici mikroorganizmalar özetlenmiştir.

Tablo II.1. Ekzopolisakkaritlerin İçerdiği Substitüentler (Sutherland, 1990)

Substitüent	Bağ	EPS üreten mikroorganizma
Organik asitler		
Asetat	ester	Yaygın olarak bulunur
Gliserat	ester	<i>Pseudomonas elodea</i> <i>Rhizobium trifolii</i> , <i>R.</i>
Hidroksibütanoat	ester	<i>Leguminosarum</i>
Propionat	ester	<i>Escherichia coli</i>
Pirüvat	ketal	Yaygın olarak bulunur
Sussinat	ester	<i>Rhizobium</i> spp, <i>Agrobacterium</i> spp
Amino asitler		
L-glutamat		<i>Klebsiella aerogenes</i> K82
Serin		<i>E.coli</i> K40
İnorganik asitler		
Fosfat		Yaygın olarak bulunur
Sülfat		Cyanobacteria

II.2.1 Halofilik *Halomonas* Türleri Tarafından Sentezlenen Ekzopolisakkaritlerin Kimyasal Kompozisyonu

Halomonas türleri tarafından üretilen EPS'ler ana olarak karbohidrattan oluşan anyonik polimerlerdir. Bu polimerler aynı zamanda diğer organik bileşiklerle birlikte bir miktar da sülfat içerir. *Halomonas eurihalina* için bu miktar oldukça fazladır. Bu EPS'lerin içeriğindeki yüksek miktardaki üronik asit, polimeri şeker içeriğinin belirlenmesi için kullanılan asit hidrolizi için dirençli kılar. Daha önce sadece bazı deniz bakterilerinden (Guezennec ve diğ., 1994) ve *Haloferax mediterranei*'den elde edilen polisakkaritlerde (Antón ve diğ., 1988) tespit edilen sülfat iyonuna *Halomonas* türüne ait mikroorganizmalarda da rastlanmıştır (Béjar ve diğ., 1998). Bu sülfatlar, üronik asit ile beraber polimeri anyonik yapmaktadır.

Tablo II.2'de *Halomonas* türüne ait iki mikroorganizma tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin kimyasal kompozisyonları gösterilmektedir.

Tablo.II.2. *Halomonas eurihalina* ve *Halomonas maura* Tarafından Sentezlenen

Ekzopolisakkaritlerin Kimyasal Kompozisyonu (Béjar ve diğ., 1998; Bouchotroch ve diğ., 2000)

Mikroorganizma	Karbohidrat	Protein	Üronik asit	Asetil	Sülfat
<i>Halomonas eurihalina</i>					
F2-7	37.0	7.5	1.3	0.5	11.2
H28	44.3	7.1	1.7	0.4	24.7
H212	43.7	6.2	2	0.7	22.2
H214	34.7	6.3	0.8	0.4	18.1
H217	42.1	7.1	1.2	0.2	18.7
H96	31.6	8.5	8.1	0.1	12
<i>Halomonas maura</i>					
S-31	60.2	0.3	16.3	0.03	-
S-7	47.0	0.7	5.3	1.9	-
S-30	40.9	5.3	9.1	0.5	-
S-36	48.6	0.3	6.3	0.1	-

H. eurihalina tarafından üretilen EPS nötral pH değerlerinde süspanse edilirse viskoz bir solüsyon elde edilir, fakat asidik pH değerlerinde viskozite yüksek oranlarda artar (Calvo ve diğ., 1995 ; Béjar ve diğ., 1996, 1998). Bu özellik daha önce hiçbir ekzopolisakkarit için tespit edilmemiştir ve *H. eurihalina* için özel bir durum gibi gözükmektedir. Aynı zamanda aynı türün farklı suşlarında da benzer bir durum tespit edilmiştir (Béjar ve diğ., 1998).

II.3. EPS ÜRETEN MİKROORGANİZMALAR

Ekstremofilik mikroorganizmalardan elde edilen biyopolimerlerin de bazı özel yapılara sahip olabilecekleri düşüncesi ile, 1991 yılından beri, yüksek sıcaklık ve basınçtaki, yüksek H₂S ve ağır metal konsantrasyonu içeren deniz altındaki sıcak su kaynaklarından ekzopolisakkarit üreticisi ekstremofiller izole edilmiş ve optimize edilmiş koşullarda üretilmiş ekzopolisakkaritlerin karakterizasyonu yapılmıştır. Bunlar arasında *Alteromonas macleodii* sub spec *fijiensis*, *Vibrio diabolicus*, *Alteromonas infernus* (Raguénès ve diğ., 1997; Roger ve diğ., 2004) ve *Thermotoga maritima* (Rinker ve diğ., 2000) gibi bakteriler ve *Thermococcus litoralis* (Rinker ve diğ., 2000) gibi arkealar sayılabilir. *Alteromonas infernus* deniz altındaki sıcak su kaynaklarından izole edilen mezofilik bir mikroorganizmadır (Roger ve diğ., 2004). *Alteromonas infernus* bakterilerinin glukoz varlığında nadir rastlanan iki polisakkarit ürettikleri belirlenmiştir. Bunlardan ilki suda çözünebilen ve yapısında glukoz, galaktoz, glakturonik ve glukuronik asit monosakkaritlerini içerirken, diğer ekzopolisakkarit jel formunda bulunan ve bakteri hücrelerinden diyaliz ile ayrılan polisakkarittir (Raguénès ve diğ., 1997). *Alteromonas infernus* tarafından üretilen EPS'lerin yapısı ise kısmi depolimerizasyon, metilasyon analizleri, kütle spektrometresi ve NMR spektrometresi ile araştırılmış ve bu polisakkaritlerin tekrarlanan ünitelerinin nonasakkarit olduğunu belirlenmiştir (Roger ve diğ., 2004). Hipertermofil olan *Thermotoga maritima* bakterisi ve *Thermococcus litoralis* arkeası aynı besi yerinde benzer büyüme değerleri göstermelerine rağmen, kullandıkları azot kaynakları ve EPS oluşturma eğilimleri birbirlerinden farklı olan iki izolattır (Rinker ve diğ., 2000). Aynı zamanda, Akdeniz'deki sıg sıcak su kaynaklarından da EPS üreticisi mikroorganizmalar izole edilmiştir (Maugeri ve ark, 2002; Nicolaus ve diğ., 2002; Nicolaus ve diğ., 2000; Maugeri ve diğ., 2001; Schiano Moriello ve diğ., 2003). Moriello ve arkadaşlarının termofilik bakterilerle yaptıkları çalışmada üretilen EPS'den saflaştırma sonrasında EPS1, EPS2 ve EPS3 elde edilmiştir. EPS'lerin kantitatif monosakkarit analizleri sonucunda EPS1'deki mannoz:glukoz:galaktoz oranı 0.5:1.0:0.3, EPS2'deki mannoz:glukoz:galaktoz oranı 1.0:0.3:iz miktarda ve EPS3'deki galaktoz:mannoz:glukozamin:arabinoz oranı 1.0:0.8:0.4:0.2 şeklinde bulunmuştur (Schiano Moriello ve diğ., 2003). Ischia adası (Campania bölgesi, İtalya) çevresindeki hidrotermal yarıklardan izole edilen termofilik bakteriler ile yapılan çalışmalarda, bu bakteri türlerinin de EPS ürettikleri belirlenmiştir (Nicolaus

ve diğ., 2002). Vulcano adasında (Aeolian adaları, Güney İtalya), yüzeysel hidrotomal yarıklardan izole edilen termofilik *Bacillus* mikroorganizmaları da iki farklı EPS üretmektedirler. Temelde her iki tür de mannoz ve glukozdan oluşmasına karşın, bu monosakkaritlerin EPS içindeki oranları değişmektedir (Nicolaus ve diğ., 2000).

EPS üretme kapasitesine sahip halofilik mikroorganizmalar hakkında ise son yıllarda bile çok az bilgi birikimi bulunmaktadır. Literatürde, halofilik *Halomonas* sp. (Bouchotroch ve diğ., 2000) , *Halomonas maura* (Arias ve diğ., 2003), *Aphanocapsa halophytica* (Matsunaga ve diğ., 1996) , haloalkalofilik *Bacillus* sp. I-450 (Kumar ve ark, 2004) ve *Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus* (Romano ve diğ., 2005) bakteri türlerinden EPS üretimi ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bunların yanında, *Halobacterium salinarium*, *Haloferax volcanii*, ve *Halobacterium distributum* ve *Haloarcula* sp. gibi halofilik arkealar tarafından üretilen ekzopolisakkaritler, emülsiyon oluşturucu olarak petrol endüstrisinde kullanılırken, hiperhalofilik arkeaların polimerleri, biyolojik olarak yıkılabilir polimer olarak da kullanılma olanağına sahiptirler (Nicolaus ve diğ., 1999; Kulichevskaya ve diğ., 1992).

II.4. EKZOPOLİSAKKARİTLERİN ENDÜSTRİYEL AÇIDAN ÖNEMİ

Yeni bir biyomateryal olarak kabul edilen, hücre dışına salgılanan ekzopolisakkaritler (EPS), farklı fizikokimyasal ve reolojik özelliklerinden dolayı petrol, gıda, tekstil, deterjan, kozmetik, tarım ve atık su arıtımı gibi değişik endüstrilerde birçok uygulama alanı edinmiştir. Jelleştirme, kıvam artırıcı ve biyofilm tabakası oluşturma gibi özelliklerinin yanında, ekzopolisakkaritler, ilaç sektöründe, anti-tümör, anti-viral ve anti-inflamatuar gibi fizyolojik aktivite ajanlarına yardımcı madde olarak da kullanılmaktadırlar (Kumar ve diğ., 2004).

II.4.1. Doğal Gıda Korunmasında Antimikrobiyal Bileşik Olarak EPS

Birçok gıdanın kalitesi saklama süreci boyunca düşmektedir. Gıdada duyuşal özelliklerin değişmesine neden olabilecek ve gıda zehirlenmelerine yol açabilecek fiziksel, kimyasal ve enzimatik faktörlere ilaveten mikrobiyolojik değişiklikler de

bozulma reaksiyonlarına sebep olabilmektedir (Gould, 1991). Bu nedenle gıdalarda bozulmaya sebep olabilecek mikroorganizmaların engellenmesi önemlidir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal bileşiklerin kullanımına gösterilen ilgi gıda muhafazasında güvenli ve doğal bir yol olması nedeni ile her geçen gün artmaktadır (Yang, 2000).

Lactococcus lactis tarafından üretilen ve gıdalarda koruyucu olarak kullanılan nisin (Qiao, 1996) yanı sıra *Lb. reuteri* tarafından üretilen reuterin de gıda muhafazasında kullanılan bir başka antimikrobiyal bileşiktir (Lindgren ve Dobrogosz, 1990).

II.4.2. Gıda Uygulamalarında EPS

Polisakkaritler gıda teknolojisinde viskozite ajanı, stabilizatör, emülsiyonlaştırıcı, jelleştirme ajanı ve su bağlama ajanı olarak kullanılabilirler (van den Berg ve diğ., 1995).

Gıda endüstrisinde kullanılan selüloz, nişasta, pektin, aljinat ve carragenan gibi polisakkaritlerin büyük bir çoğunluğunun kaynağı bitkidir ve bunların bir çoğu reolojik özelliklerini iyileştirmek için kimyasal ve enzimatik modifikasyonlara uğratılmaktadırlar. Bu nedenle kullanımları sınırlıdır. Mikrobiyal kaynaklı ekzopolisakkaritlerin ise reolojik özellikleri, psödoplastik yapıları ve düşük konsantrasyonlarda oldukça viskoz solüsyon oluşturabilme kapasitelerinden dolayı eşsizdir (Becker ve diğ., 1998).

Dekstran, laktik asit bakterileri tarafından üretilen ilk endüstriyel polisakkarittir. İlk olarak 1880 yılında şeker kamışı veya şeker pancarı şuruplarında kıvam arttırıcı ve jelatinleştirici olarak keşfedilmiştir (Crescenzi, 1995). Yapısal farklılıklarından dolayı bazı dekstranlar suda çözünebilirken, bazıları çözünemez. Dekstran pastalarda viskoziteyi ve nem muhafazasını sağlamak için, ayrıca şeker kristalizasyonunu inhibe etmek için kullanılmaktadır. Ayrıca dekstran dondurmada kristalizasyon inhibitörü olarak kullanılmaktadır (Whistler ve Daniel, 1990).

Ksantan gum ise 1969 yılında gıda endüstrisinde kullanılması onaylanan ikinci mikrobiyal ekzopolisakkarittir. Ksantan gıda endüstrisinin yanı sıra süt ürünleri, konfeksiyon, hayvan gıdaları, farmakoloji, kozmetik gibi birçok endüstride de kullanılmaktadır. Ayrıca ksantan üretimi, substratının (glukoz) polimere dönüşüm oranının yüksek (%60-70) olmasından dolayı, oldukça ucuzdur (Sutherland, 1998).

Günümüzde gıda teknolojisinde, fermente süt ürünlerinin üretiminde ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterilerinin kullanımına büyük önem verilmektedir. Ekzopolisakkarit üretme yeteneğine sahip kültürlerin kullanımı ile yoğurdun tekstüründe iyileşme ve serum ayrılmasında azalma sağlamak, mozzarella peynirinde su tutma kabiliyetini artırarak erime özelliğini iyileştirmek ve yumuşak peynirlerin reolojik özelliklerini geliştirmek mümkündür. Bu nedenle ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterileri süt ürünlerinde viskoziteyi arttırıcı, yapıyı kalınlaştırıcı, stabilize edici ve su bağlayıcı gibi özellikleri nedeni ile ticari stabilizatörlere alternatif olarak kullanılmaktadırlar. Teknolojik özelliklerinin yanı sıra laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan ekzopolisakkaritler, tüketici sağlığı üzerine de yararlı etkide bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda ekzopolisakkaritlerin bağırsak florasını düzenlediği, kolesterolü düşürdüğü, antitümör ve antiülser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Milci ve Yaygın, 2005).

II.4.3. Sağlık Alanında EPS

Son on yıldan bu yana probiyotik olarak laktik asit bakterilerinin kullanımına gösterilen ilgi her geçen gün artmaktadır. Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılmasında rol oynayan önemli kriter, aside ve safraya karşı gösterdikleri direnç ilaveten patojenik bakterilere ve çürük oluşturan bakterilere karşı antimikrobiyal bileşik üretme ve insan bağırsak mukozasına bağlanma yeteneğine sahip olmalarıdır (Saxelin, 1995).

Oda ve arkadaşları (1983) *Lb. helveticus* ssp. *Jugurti* tarafından üretilen ve antitümör ajanı olarak kullanılan EPS üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada EPS'in antitümör aktivitesi, karında toplanmış olan Sarcoma-180'e karşı EPS'in intraperitonel olarak enjeksiyonu ile test edilmiştir. Farelere dokuz gün boyunca 20 mg kg⁻¹ dozunda EPS ilacı verilmiştir. 40 mg kg⁻¹ dozda farelerin ömürleri %144 artış gösterirken, 80 mg kg⁻¹ dozda ömür değerlerinin %233 uzadığı gözlemlenmiştir (Oda ve diğ., 1983).

Mekanizması bilinmemekle beraber *Lc. Lactis* ssp. *Cremoris* SBT0495 tarafından üretilmekte olan ekzopolisakkaritler de kolesterol düşürücü aktivite göstermektedirler (Nakajima ve diğ., 1990).

II.4.4. Biyofilm Oluşumunda EPS

Ekzopolisakkaritlerin bir diğer önemli özelliği ise biyofilm yapısını oluşturmalarıdır. Mikrobiyal hücrelerin dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurması ve bu yapıda üreyip gelişmesi sonucu makroskobik olarak opak yapıda, ortalama 100-500µm yükseklikte, koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz ve giderilmesi çok zor olan yapılara biyofilm denir. Biyofilmin mikrobiyal hücreler ve EPS ana iskeletinden oluştuğu ve EPS'nin toplam organik karbonun %50-90'nını barındırarak ana maddeyi (matriksi) oluşturduğu kabul edilmiştir (Sutherland, 2001). Biyofilm ; mikrobiyal olarak değişime uğramış, yüzeye ya da birbirine tutunarak EPS içine gömülmüş olan planktonik hücrelerde çoğalma, genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik yapıda olan biyolojik bir oluşumdur (Hood ve Zottola, 1997; Watnick ve Kolter, 2000). Biyofilmin üç boyutlu, EPS ile çevrelenmiş, su kanalları ve çok katlı bakteri tabakaları içeren bir yapı olduğu bildirilmiştir. Biyofilimde fiziksel yapının EPS ile bağlantılı olduğu, EPS'nin jel yada viskoelastik davranış sergilemesi nedeni ile polisakkaritler ile yapının daha sağlamlaştığı bildirilmiştir (Hussain ve diğ., 1993; Leriche ve diğ., 2000). Oluşan biyofilm bakterileri korur ve bakteriler biyofilmin yapısına katıldıklarında genetik değişimlere uğrayabilirler. Bu nedenle, çevre teknolojisi ve gıda teknolojisi gibi alanlarda kullanılan doğal ya da plastik esaslı pek çok malzemenin içerdiği filtre materyali, biyofilmin tutunmasına uygun yüzey alanına sahip olmamalıdır (Sekoulov ve Görg, 1995). Biyofilm bakterileri çevre koşullarında serbest bulunan planktonik bakterilerden daha dirençlidirler. Biyofilm, yapısı itibarı ile, inhibitör etkisi olan antibiyotik, dezenfektan ve ısıya karşı koruyucu özellik gösterir. EPS'nin direnci arttırdığı düşüncesi yaygındır ancak mekanizması açıkça ortaya konulamamıştır (Kreft ve Wimpenny, 2001).

Tablo II.3'de, mikrobiyal polisakkaritlerin özellikleri ve kullanım alanları verilmiştir.

Tablo II.3. Mikrobiyal Polisakkaritlerin Özellikleri ve Kullanım Alanları (Sutherland, 1998)

Özellikleri	Kullanım Alanı	Polimer
Biyolojik Özellikler	Antitümör ajanları Göz ve eklem cerrahisi Yara tedavisi	β -D-Glukan Hyaluronic asit Bakteriyel selüloz
Kimyasal Özellikler	Enzim substratları Oligosakkarit hazırlama	<i>Escherichia coli</i> K4 ve K5 EPS Curdan, Pullulan
Fiziksel Özellikler		
Emülsiyon stabilizasyonu	Gıda endüstrisi	Ksantan
Film oluşumu	Gıda ambalajları	Pallulan
Jelleştirici ajan	Hücre ve enzim teknolojisi	Gellan
	Gıda teknolojisi	Curdan, gellan
Topaklaştırıcı	Su arıtma	Çok sayıda polimer
Hidrasyon ajanı	Kozmetik ve eczacılık	Hyaluronik asit
Kristal oluşum inhibitörleri	Donmuş gıda, pastil ve şurup	Ksantan
Süspansiyon ajanı	Gıda teknolojisinde	Ksantan
	Böcek ilacı ve spreyleri	Ksantan
Viskozite Kontrolü	Jet printing	Ksantan

II.5. EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ

Ekzopolisakkarit üretimi fiziksel ve kimyasal faktörlerden etkilenmektedir. Kullanılan besi yerinin kimyasal içeriği ve inkübasyon şartları üretilen EPS miktarını ve kompozisyonunu etkilemektedir (Boza ve diğ., 2004). Üretilen EPS'in kompozisyonu ve miktarı, kullanılan besi yerinin içeriğindeki karbon ve azot kaynaklarından etkilendiği gibi sıcaklık, pH, zaman gibi inkübasyon şartlarından da etkilenmektedir (Tallon ve diğ., 2003). Bu nedenle en iyi büyümenin ve en iyi EPS üretiminin sağlandığı optimum sıcaklık, pH ve inkübasyon süresi belirlenmelidir. EPS üretiminde kullanılacak olan besi yerinin içeriğindeki azot kaynağı olarak pepton, maya özütü, potasyum nitrat, asparjin, glutamik asit gibi kimyasallar kullanılabilir (Nour El-Dein, 2004). Karbon kaynağı olarak ise glukoz,

fruktoz, riboz, arabinoz gibi monosakkaritler ile sükröz, maltoz, laktoz, rafinoz gibi oligosakkaritler kullanılabilmektedir (Cerning ve diğ., 1994).

Ekzopolisakkarit üretimi geniş bir sıcaklık aralığında meydana gelebilir. Örneğin, sikleroglukan polisakkariti *Sclerotium gluconicum* mikroorganizması tarafından 20°C-37°C sıcaklık aralığında üretilmiştir (Halleck, 1967). Birçok mikroorganizma tarafından maksimum miktarda EPS, optimum büyüme sıcaklığından daha düşük inkübasyon sıcaklıklarında üretilir. Mezofilik laktik asit bakterileri 30°C yerine 25°C’de büyütülürse EPS üretimi %50-60 oranında artmaktadır (Kojic ve diğ., 1992), çünkü düşük inkübasyon sıcaklığında (örn.32°C) büyüme değerleri ve hücre kütlesi, yüksek inkübasyon sıcaklığından (örn.37°C) daha düşüktür. Bu durum büyüme evresi olan logaritmik fazı uzatmaktadır (Schellhaass ve Morris, 1985). Ayrıca viskozitenin de düşük inkübasyon sıcaklığında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Gassem ve diğ., 1997). Düşük hücre kütlesi, fazla miktarda EPS üretimi ile ilişkili olabilir, çünkü hücreler yavaş büyüdüğünde hücre duvarı polimerlerinin sentezi de yavaş olur ve EPS sentezi için daha fazla isoprenoid fosfat mevcut olur (Sutherland, 1972). Büyüme ile maksimum EPS üretiminin optimum sıcaklıklarının farklı olmasının bir diğer sebebi ise EPS sentezinde rol oynayan enzimlerin aktivitelerinin düşük sıcaklıklarda artıyor olmasıdır (Mengistu ve diğ., 1994).

Birçok mikrobiyal EPS, nötral pH değerlerindeki besi yerleri (Mengistu ve diğ., 1994; Dassý ve diğ., 1991; Williams ve Wimpenny, 1978) veya pH değerinin sabit tutulduğu besi yerleri (Farrés ve diğ., 1997) ortamında üretilir. Laktik asit bakterileri kullanılarak gerçekleştirilen EPS üretimi için nötral pH değerleri uygundur. Laktik asit bakterileri ile süt tozu besi yerinin fermentasyon boyunca pH değerinin 6.0 olarak kontrol altında tutulması sonucu elde edilen polisakkarit miktarı, pH 5.5 ve 5.8’de gerçekleştirilen fermentasyonlara oranla daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Gassem ve diğ., 1997; Schellhaass ve Morris,1985). Laktik asit bakterileri ile yapılan çalışmalarda besi yerinin 6.0’ya yakın pH değerlerinde kalacak şekilde kontrol edilmesi, kültürlerin logaritmik fazda kalma sürelerinin artması ve dolayısı ile EPS üretiminin de artması şeklinde sonuçlanabileceği bildirilmiştir (Schellhaass, 1983). Ancak *Neisseria meningitidis* gibi bazı mikroorganizmaların asidik pH değerlerinde EPS üretimleri daha fazladır (Masson ve Holbein, 1985). *Aureobasidium pullulans* için ise EPS üretimi için optimum pH değeri 4.5-5.5 aralığındadır (Lacroix ve diğ., 1985).

Pseudomonas mendocina mikroorganizması ile yapılan çalışmalarda EPS üretimi için gerekli olan karbon, azot, fosfat gibi faktörlerin üretilen polisakkaritin kimyasal içeriğini etkilediği belirlenmiştir (Sengha ve diğ., 1989). EPS üretimi yüksek karbon / azot (C/N) oranında mümkün olmaktadır (Sutherland, 1983) ve optimum EPS eldesi için en elverişli oranın en az 10/1 olması gerektiği düşünülmektedir (McNeil ve Harvey, 1993). Sikleroglukan ve pullulanda olduğu gibi besi yerindeki azotun azalması da EPS sentezinin bir göstergesi olabilir (McNeil ve Harvey, 1993).

BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

III.1. ARAŞTIRMA ARAÇ VE GEREÇLERİ

III.1.1. Araştırma İmkanları

Tez kapsamındaki deneysel çalışmalar, Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İleri Üretim ve Yönetim Teknolojileri Araştırma Birimi, Biyoteknoloji ve Enzim Fermantasyonu Laboratuvarında ve DNA Dizi Analizi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

III.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Merck, Sigma, Qxoid, Riedel de Haen ve J.T. Baker'dan sağlanmıştır.

III.1.3. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada, İzmir Çamaltı Tuzlası Tuz Üretim Havuzundan alınmış olan toprak örneklerinden izole edilmiş ve yüksek tuz konsantrasyonlarında üreme kabiliyeti gösteren, 10 adet halofilik bakteri ve 4 adet halofilik arkea izolatu kullanılmıştır.

III.1.4. Kullanılan Besi Yerleri

III.1.4.1. Brown (1963) Besi Yeri

Maya Özü	: 5 g
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5.5H_2O$	: 3 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	: 20 g
KCl	: 2 g
NaCl	: 100 g

Miktarlar 1 litre distile su için verilmiştir. %10 NaCl içeren besi yeri hazırlamak için ortama 100 g, %25 NaCl içeren besi yeri hazırlamak için ortama 250 g NaCl ilave edilmiştir. Besi yerinin pH değeri 6.55-7.00 arasındadır. Hazırlanan çözelti 121°C, 1.06 atm basınçta, 15 dak. steril edilmiştir. Katı Brown (1963) besi yeri hazırlamak için ortama 20g/l agar ilave edilmelidir.

III.1.4.2. Kompleks Besi Yeri

Maya Özü	: 0.5 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	: 0.0002 g
$CaCl_2$	: 0.05 g
$(NH_4)_2SO_4$	: 0.6 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	: 0.0002 g
KH_2PO_4	: 3.18 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	: 0.0002 g
K_2HPO_4	: 5.2 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	: 0.0002 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	: 0.3 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	: 0.0006 g
NaCl	: 100 g

Miktarlar 1 litre distile su için verilmiştir. Besi yerinin pH değeri 7.00 olacak şekilde 1 M HCl veya 0.5 M NaOH ile ayarlanmıştır ve hazırlanan çözelti 121°C, 1.06 atm basınçta, 15 dak. steril edilmiştir (Öztürk ve diğ., 2003).

III.1.4.3. Minimal Besi Yeri

K_2HPO_4	: 7 g
KH_2PO_4	: 2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	: 0.1 g
$(NH_4)_2SO_4$	: 1 g
Na_2CO_3	: 3 g
NaCl	: 100 g

Miktarlar 1 litre distile su için verilmiştir. Ortama pepton ‰ 0, ‰ 0.01, ‰ 0.05, ‰ 0.1, ‰ 0.5, ‰ 1 olacak şekilde ilave edilmiştir. Besi yerinin pH değeri 7.00 olacak şekilde 1 M HCl veya 0.5 M NaOH ile ayarlanmıştır ve hazırlanan çözelti 121°C, 1.06 atm basınçta, 15 dak. steril edilmiştir. Ortama karbon kaynağı olarak % 1 (w/v) olacak şekilde glukoz, sükroz, maltoz, laktoz, rafinoz, sodyum asetat, gliserol ve trisodyum sitrat çözeltileri 121°C, 1.06 atm basınçta, 3 dak. steril edildikten sonra ilave edilmiştir (Poli ve diğ., 2004).

III.1.4.4. Haloarcula Besi yeri

Maya Özü	: 10 g
Kazamino Asid	: 7.5 g
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5.5H_2O$	: 3.0 g
KCl	: 2.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	: 20 g
NaCl	: 250 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	: 0.36 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	: 50 mg

Miktarlar 1 litre distile su için verilmiştir. Besi yerinin pH değeri 7.50 olacak şekilde 1 M HCl veya 0.5 M NaOH ile ayarlanmıştır. Toplam hacmin yarısında NaCl, diğer yarısında kalan malzemeler çözülüp ayrı ayrı 121°C, 1.06 atm basınçta, 15 dak. steril edilip, soğutulduktan sonra karıştırılarak birleştirilmiştir (Poli ve diğ., 2004).

III.1.5. Kullanılan Tamponlar

III.1.5.1 5XTBE Tamponu

Trizma-base	: 50 g
Borik asit	: 27.5 g
EDTA (0.5 M pH:8)	: 20 ml
1 litre distile suda çözülür.	

III.1.5.2. 5X Yükleme Tamponu

Bromophenol Blue	: 250 mg
Gliserol	: 3 ml
dH ₂ O	: 7 ml

III.1.6. Kullanılan Çözeltiler

III.1.6.1. %80 Fenol Çözeltisi (w/v)

Fenol	: 80 g
dH ₂ O	: 100 ml

III.1.6.2. Stok Hazırlamada Kullanılan Çözeltiler

2.a Konsantre Deniz Suyu Stok Çözeltisi (%30)

NaCl	: 240 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	: 35 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	: 30 g
KCl	: 7 g

Miktarlar 1 litre distile su için verilmiştir. Tuzlar distile su içinde eridikten sonra 1 M steril CaCl₂·2H₂O stok çözeltisinden 5 ml eklenmiştir. 1 M Tris-HCl (pH 7.50) tamponu kullanılarak pH 7.50 olarak ayarlanmış ve çözelti otoklava dayanıklı kapaklı şişelere alınarak 121°C, 1.06 atm basınçta, 15 dak. steril edilmiştir. Stok çözelti oda ısısında muhafaza edilmiştir.

2.b %80 Gliserol, %6 Deniz Suyu Çözeltisi

Gliserol : 80 ml

%30 Deniz Suyu Stok Çözeltisi : 20 ml

Hazırlanan çözelti 121°C, 1.06 atm basınçta, 15 dak. steril edilmiştir. Soğuduktan sonra 0.2 ml steril 0.5 M CaCl₂ aseptik bir şekilde ilave edilmiştir.

III.1.7. Kullanılan Cihaz ve Ekipman

Hassas Terazı (0.1, 1, 10 mg)	AB204-S, PG403S, PG4002-S, METTLER TOLEDO, İsviçre
Manyetik Karıştırıcı	MR3003S, HEIDOLPH, Almanya
Otoklav	MOD-3870 ELV. SYSTEC, Almanya
Güvenlik Kabini	SAFE2010 0.9, HETO HOLTEN, Danimarka
Soğutmalı Mikro Santrüfuj	1-15K. SIGMA, Almanya
Pastör Fırını	ED115. BINDER, Almanya
Çalkalayıcı İnkübatör	CERTOMAT BS1, B.BRAUN, Almanya
Su Banyosu	MASTERHEAT 29L, HETO HOLTEN, Danimarka
Vorteks	REAX TOP, HAIDOLPH, Almanya
pH metre	MP220K. METTLER TOLEDO, İsviçre
Derin Dondurucu(-80°C)	UF4420. HETO HOLTEN, Danimarka
No Frost Buzdolabı	ARÇELİK, Türkiye
Spektrofotometre	LAMBDA 35, PERKIN ELMER, A.B.D.
Distile Su Cihazı	PURELAB PRIMA 30, USF ELGA, U.K.
Jel Doküasyon Sistemi	V10-CDCY, SCIEPLAS, Belçika
PCR	2700, GENOMED
DNA Dizi Analizi	ABI-PRISM, GENOMED
Otomatik Pipetler	FINPIPETTE, Finlandiya

III.2. ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Yapılan tez çalışması şu basamakları içermektedir :

A. İzolatların Moleküler Tanılaması

1. İzolatlardan genomik DNA izolasyonu,
2. İzolatların 16S rDNA bölgelerinin PCR ile çoğaltılması,
3. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez analizi,
4. 16S rDNA PCR ürünlerinin saflaştırılması ve DNA miktarının tayini. Sekans reaksiyonu ve reaksiyon ürününün saflaştırılması,
5. ABI 310 DNA cihazı ile izolatların 16S rDNA bölgelerinin DNA dizisinin belirlenmesi.

B. EPS Üreten Halofilik Bakteri İzolatlarının Tespiti ve En İyi Üreticinin Fermentasyon Şartlarının Optimizasyonu

1. Bakteri izolatlarının kompleks ve minimal besi yerlerindeki büyüme ve EPS üretimlerinin karşılaştırılması ve en iyi üreticinin belirlenmesi,
2. En iyi üretici olarak belirlenen izolat kullanılarak minimal besi yerinde ;
 - a. Optimum büyümenin ve üretimin sağlandığı pepton konsantrasyonunun belirlenmesi,
 - b. Optimum büyümenin ve üretimin sağlandığı karbon kaynağının belirlenmesi,
 - c. Optimum büyümenin ve üretimin sağlandığı tuz konsantrasyonunun belirlenmesi.

C. EPS Üreten Halofilik Arkea İzolatlarının Belirlenmesi

1. İki farklı sıcaklıkta,
2. Brown (1963) besi yeri ve haloarcula besi yeri ortamlarında arkea izolatlarının büyüme ve EPS üretimlerinin belirlenmesi.

III.3. YAPILAN ÇALIŞMALAR

III.3.1. Sterilizasyon

Sterilizasyon, bir ortam veya maddenin tüm canlı mikroorganizmalardan arındırılması işlemidir. Besi yeri ve çeşitli sıvı çözeltilere uygulanan sterilizasyon işlemlerinin, bu ortamların kimyasal veya fiziksel yapılarını hiçbir şekilde

değiştirmeyecek şekilde olmasına dikkat edilmelidir. Sterilizasyon yöntemleri uygulanacak materyale göre çeşitlilik göstermektedir. Ancak aynı materyale farklı sterilizasyon teknikleri de uygulanabilir. (Temiz, 2000; Çotuk ve Küçüker, 1995)

Bu çalışmada sterilizasyon buharlı basınç ve alevden geçirme metotlarıyla gerçekleştirilmiştir. Büyüme ortamlarının sterilizasyonu için otoklav kullanılmıştır. Aşağıda belirtilen ortamlar dışında bütün besi yerleri otoklavda 121°C, 1.06 atm basınçta 15 dak. steril edilmiştir. Glukoz, sükroz, maltoz, laktoz, rafinoz, sodyum asetat ve gliserol yüksek ısıya uzun süre maruz kalmakla yanabileceklerinden 121°C, 1.06 atm basınçta, 3 dak. steril edilip soğutulduktan sonra diğer ortamlara aseptik koşullarda ilave edilmişlerdir. Erlenlere ve kapaklı cam tüplere besi yerleri toplam hacmin 1/5'i olacak şekilde konulmuştur. Mikropipet uçları, ependorflar ve cam pipetler otoklavda 121°C, 1.06 atm basınçta, 15 dak. sterilize edilmiştir.

Kültür ekimleri sırasında ve aseptik koşullarda çalışılırken alevde kızdırma yolu ile sterilizasyon sağlanmıştır.

III.3.2. Ön kültür Hazırlanması

III.3.2.1. Sıvı Ortamda Ön Kültür Hazırlanması

Uygun şekilde stoklara alınan izolatlar, hacimce 1/100 oranında Brown (1963) besi yerine inoküle edilmiştir. Halofilik bakteri izolatlarının 37°C'ye ayarlanmış orbital çalkalayıcıda 180 rpm hızında 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen ön kültürleri, uygun besi yerine hacimce 1/100 oranında inoküle edilmiştir. Arkea izolatlarının ise 39°C'ye ayarlanmış orbital çalkalayıcıda 180 rpm hızında 24-72 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen ön kültürleri, uygun besi yerine hacimce 1/100 oranında inoküle edilmiştir.

III.3.2.2. Katı Ortamda Ön Kültür Hazırlanması

Yukarıda belirtilen koşullarda ön kültürleri hazırlanan halofilik izolatlardan 50 µl alınmış ve %10 NaCl içeren katı Brown (1963) besi yeri içeren petrilere inoküle edilmiştir. 37°C'lik inkübatörde 24 saat süreyle bekletilerek koloni oluşumu gözlenmiştir. Arkea izolatların büyütülmesi için ise %25 NaCl içeren katı Brown

(1963) besi yeri kullanılmıştır ve aseptik koşullarda ekim yapıldıktan sonra petriler 39°C’lik inkübatörde koloni oluşumu gözlenene kadar bekletilmiştir.

III.3.3. İzolatların Stoklara Alınması

İzole edilen saf kültürlerin uzun süre sağlıklı koşullarda saklanabilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Halofilik bakterilerin tuz direnç ve ihtiyaçlarının diğer mikroorganizmalardan farklı olması nedeni ile stok hazırlamak için kullanılan her yöntem ile sağlıklı ve kalıcı stoklar elde edilemeyebilir (Smith, 2004). Halofilik bakteriler için en kolay stoklama yöntemi kültürleri oda ısısında ve 4°C’de bekletmektir. Bu yöntemde saklanacak olan stoklar ağzı iyice kapatılmış cam bir şişe içinde sıvı kültürler halinde veya kapak kısımları parafilm ile sarılmış petri kaplarında katı besi yerlerinde hazırlanmalıdır. Bu şekilde halofilik bakteriler 1-2 yıl saklanabilirler. %20-50 gliserol stoklara alınıp -20°C’de saklanan kültürlerin yıkıma uğradığı tespit edilmiş ve bu yöntem halofilik organizmalar için sağlıklı bulunmamıştır (Smith, 2004) . Gliserol stoklara alınan halofilik bakterilerin -80°C’de en az 2 yıl sağlıklı bir şekilde muhafaza edilebileceği tespit edilmiştir. %15 gliserol eklenmiş besi yeri ile hazırlanmış kültürlerin sıvı nitrojen içinde saklanması halofilik mikroorganizmalar için bilinen en iyi stoklama yöntemidir. Stoklar en az 15 yıl dayanmaktadır (Smith, 2004). Çalışmada halofilik bakterilerin stoklanması için katı Brown (1963) besi yeri içeren tüplere yatık kültürler hazırlanmış ve 4°C’de muhafaza edilmiştir. Uzun süreli saklama imkanı oluşturmak için de kültürler hacimce %80’lik gliserol stoklara alınmış ve -80°C’de saklanmıştır.

Arkea izolatları ile hazırlanan yatık agar kültürleri 4°C’de bir yıla yakın bir süre hücrelerin canlılığında yüksek oranda bir düşüş olmaksızın saklanabilmektedirler. Uzun süreli stok hazırlamak için ise büyütülen ön kültürler %15 gliserol eklenerek -70°C’de saklanabilirler (Rodriquez-Valera, 1995). Yapılan çalışmadaki arkea izolatları %25 Brown (1963) besi yeri içeren yatık agar tüplerinde 4°C’de muhafaza edilmiştir. Yatık kültürler 3 aylık periyotlarla yenilenmiştir.

III.3.3.1. İzolatların Yatık Kültürlere Alınması

Steril tüplere, bakteri izolatları için 1.7 M (%10) NaCl, arkea izolatları için 4.3 M (%25) NaCl içeren katı Brown (1963) besi yeri aseptik koşullarda sıcakken dökülmüş ve tüpler eğik bir düzenek yardımıyla soğumaya bırakılmıştır. Ortam katılaştıktan sonra, hazırlanan katı ön kültürlerden, tüplere seyreltme plaka ekimi yapılmıştır. Halofilik bakteri izolatları 37°C’de, arkealar ise 39°C’de büyümeye bırakılmıştır. Yatık kültürler daha sonra kullanılmak üzere 4°C’de saklanmıştır. Kültürler kontaminasyon oluşumunu önlemek amacı ile 3 ayda bir yenilenmiştir.

III.3.3.2. İzolatların Gliserol Stoklara Alınması

Sıvı Brown (1963) besi yeri, hacimce 1/5 olacak şekilde erlenlere dağıtılmış ve aseptik koşullarda izolatların inokülasyonu yapılan erlenler optimum koşullarda (37°C, 180 rpm) 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Steril ependorflara, 24 saatlik kültür ve %80’lik gliserol, %6’lık deniz suyu hacimce 2/3 olacak şekilde aktarılmıştır. Vorteks ile iyice karıştırılarak hazırlanan stoklar -80°C’lik derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Kültürler 6 ayda bir kontaminasyonu engellemek amacı ile yenilenmiştir.

Arkealar için hazırlanan yatık kültürler canlı hücre miktarında çok büyük düşüşler olmadan 4°C’de bir yıl süre ile saklanabilmektedirler. Daha uzun süreli stok hazırlamak için %80 gliserol ile karıştırılan kültürler -80°C’lik derin dondurucuda saklanabilmektedir (Rodriquez-Valera, 1995). Yapılan çalışmadaki arkea izolatları 4.3 M (%25) NaCl içeren katı Brown (1963) besi yerinde yatık kültürler halinde 4°C’de saklanmıştır ve kültürler 3 ayda bir yenilenmiştir.

III.3.4. Moleküler Tanılama Yöntemleri

III.3.4.1. Genomik DNA İzolasyonu

İzmir Çamaltı Tuzlasından Dr. Aziz Akın DENİZCİ tarafından getirilen toprak örneklerinden halofilik mikroorganizmalara ait genomik DNA’ların izolasyonu Bahar YAVUZTÜRK tarafından yapılmıştır (Yavuztürk, 2005).

Arkealardan genomik DNA izolasyonu işlemi için öncelikle %25 NaCl içeren katı Brown besi yerinden koloniler steril öze yardımı ile alınarak 100µl steril dH₂O içinde çözülmüştür. Daha sonra 98°C’de 5 dakika tutularak hücrelerin yıkılması sağlanmış ve denatüre olmuş hücre bileşenleri 10.000 rpm’de 2 dakika santrifujlenerek çöktürülmüştür. Genomik DNA içeren süpernatant ayrı bir steril ependorfa alınarak amplifikasyona hazır hale getirilmiştir.

III.3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Tüm dünyada canlıları oluşturan genetik yapının çözülmesi, ortaya çıkarılan bu yapıdaki genlerin yerlerinin saptanması, işlevlerinin anlaşılması, ilişkilerinin belirlenmesi amacı ile yürütülen çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir. Bu amaç doğrultusunda, belirlenen hedefe ulaşmayı kolaylaştıracak, hızlandıracak yöntemlerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Bu yöntemlerin en önemlilerinden birisi “Polimeraz Zincir Reaksiyonu” ’dur.

PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. Reaksiyon başlatılmadan önce istenilen sayıda döngünün tekrarlanması sağlanabilir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine komplementer olan, 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana madde vardır : DNA örneği, genelde genomik DNA, çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer, deoksi-nükleotid-trifosfatlar (dNTP), yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan MgCl₂.

PCR’ın en önemli avantajları kolay uygulanabilir olması, hızlı sonuç vermesi ve çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır.

16S, 23S RNA gibi bölgeler tüm bakterilerde kısmen korunmuş olduğu için bu bölgelerin uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldıktan sonra DNA dizilerinin belirlenmesi ile mikroorganizmalar tanımlanabilmektedirler.

2.a. İzolatların 16S rDNA Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

İzolatların 16S rDNA gen dizisini PCR yöntemi ile çoğaltarak dizi analizini yapmak amacı ile kullanılan primerler ve özellikleri Tablo III.1’de verilmiştir.

Tablo III.1. 16S rDNA PCR Uygulamalarında ve 16S rDNA Dizi Analizinde Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Primer	Dizi (5'-3')	Özellik	T _m (°C)	Referans
f27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Öbakteriyel- düz	48	Britschgi ve Giovannoni, 1991
U514f	GTGCCAGCMGCCGCGG	Üniversal- düz	56	Bano ve diğ., 2004
U1492r	ACCTTGTTACGACTT	Üniversal- ters	43	Bano ve diğ., 2004
A21f	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	Arkea-düz	56	Edgcomb ve diğ., 2002
A958r	YCCGGCGTTGAMTCCAATT	Arkea-ters	49	Edgcomb ve diğ., 2002

Primerlerin T_m özellikleri ve literatür verileri baz alınarak her çift için bir PCR programı belirlenmiş ve bu program kullanılarak izolatların 16S rDNA bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır.

İzolatların genomik DNA'ları, optimize edilen PCR şartları ve reaksiyon koşullarında, A21f- A958r, U514f-U1492, f27-U1492r primer çiftleri ile reaksiyona sokulmuştur. Amplifiye edilen PCR ürünü agaroz jel elektroforezi yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu yöntemde, DNA örnekleri, agaroz jel kullanılarak elektrik alanında büyüklüğüne göre ayrılırlar. Agaroz jelde DNA bantlarının görünmesi için floresan bir boya olan ethidium bromid kullanılmıştır. Ethidium bromid ile boyanan DNA bantları ultraviyole ışık altında kontrol edilmiştir. PCR ürünlerinin boyları DNA molekül ağırlık standartları (DNA marker) ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Üniversal ve Öbakteriyel PCR Koşulları

10X <i>Taq</i> DNA Polimeraz Tamponu	2.5 µl
MgCl ₂	2 mM
Düz primer (U514f / f27)	25 pmol
Ters primer (U1492r)	25 pmol
dNTP	0.3 mM
<i>Taq</i> DNA Polimeraz (Fermentas,USA)	5 U
Genomik DNA	50-500 ng
dH ₂ O ile 25µl'ye tamamlanır.	

Yukarıdaki konsantrasyonlarda hazırlanan reaksiyon karışımı için PCR şartları şu şekildedir : 94 °C'de 5 dak. denatürasyonu takiben 35 döngü halinde 94°C'de 1 dak. denatürasyon, 50°C'de 1 dak. primer bağlanması, 72°C'de 3 dak. zincir uzaması yer almaktadır. 72°C'de 10 dak inkübasyondan sonra PCR sona erer ve reaksiyon karışımı 4°C'de saklanır.

Arkea PCR Reaksiyon Koşulları

10X <i>Taq</i> DNA Polimeraz Tamponu	2.5 µl
MgCl ₂	2.5 mM
Düz primer (A21f)	25 pmol
Ters primer (A958r)	25 pmol
dNTP	0.3 mM
<i>Taq</i> DNA Polimeraz (Fermentas,USA)	5 U
Genomik DNA	50-500 ng
dH ₂ O ile 25µl'ye tamamlanır.	

Arkealar için yukarıdaki konsantrasyonlarda hazırlanan reaksiyon karışımının PCR şartları ise şu şekildedir : 94 °C'de 5 dak. denatürasyonu takiben 25 döngü halinde 94 °C'de 30 sn. denatürasyon, 50°C'de 30 sn. primer bağlanması, 72°C'de 1 dak. zincir uzaması yer almaktadır. 72°C'de 10 dak inkübasyondan sonra PCR sona erer ve reaksiyon karışımı 4°C'de saklanır.

2.b. 16S rDNA PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Analizi

Bu çalışmada %1 (w/v) agaroz jel kullanılmıştır. Jel, 1g agarozun 5XTBE tamponunun on kez seyreltilmesiyle elde edilen 0.5XTBE (pH 8) tamponu ile karıştırılması ve bir ocak üzerinde kaynatılarak eritilmesi ile hazırlanmıştır. Bu çözelti 50 °C civarına gelene kadar soğutulduktan sonra, son konsantrasyon 1µg/ml olacak şekilde ethidium bromid eklenmiştir. Hazırlanan çözelti jel yürütme tankına dökülmüştür ve oda sıcaklığında donana kadar beklenmiştir. 16S rDNA PCR ürünleri 5X yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jel kuyucuklarına yüklenmiş ve 150 V sabit voltajda 20 dakika elektroforez uygulanmıştır. Sonuçlar Jel Dokümantasyon Sistemi'nde, ultraviyole ışık altında analiz edilmiştir.

2.c İzolatların 16S rDNA PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve DNA Miktarı Tayini

İzolatların reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PCR ürününün konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle (OD₂₆₀) ölçülmüştür ve aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$\text{Çift sarmal DNA: } 1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \text{ µg/ml}$$

$$50 \text{ µg/ml} \times \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Dilüsyon faktörü} = \text{DNA Konsantrasyonu (µg/ml)}$$

OD_{260nm}/OD_{280nm} oranı DNA örneklerinin saflıklarının kontrolü için kullanılmıştır. 1.8 oranı saf örnekler için ideal iken, bu orandan daha yüksek değerlerde RNA, daha düşük değerlerde ise protein kontaminasyonunun söz konusu olduğu göz önünde tutulmuştur.

III.3.4.3. 16S rDNA Bölgeleri İçin Sekanslama Reaksiyonu ve Saflaştırılması

Saflaştırılan ve konsantrasyonu ölçülen PCR ürünleri ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kiti kullanılarak sekanslama

reaksiyonuna sokulmuştur. Sekanslama reaksiyonu için kullanılan primerler halofilik bakteriler için U514f, U1492r ve f27, arkea izolatları için ise A21f ve A958r'dir.

Sekanslama Reaksiyon Koşulları

Saflaştırılmış PCR ürünü	200 ng
Primer	12.5 pmol
RR Mix	8 µl
dH ₂ O	10.5 µl
Toplam	20 µl

Sekanslama reaksiyonu PCR şartları ise şu şekildedir : 94 °C'de 5 dak. denatürasyonu takiben 30 döngü halinde 94 °C'de 10 sn. denatürasyon, 50°C'de 30 sn. primer bağlanması, 60°C'de 4 dak. zincir uzamasıyla reaksiyon sona erer.

Reaksiyon sonrası yapılan saflaştırma işlemi şu şekildedir : 20 µl sekanslama reaksiyonunun içine 2 µl 125 mM EDTA ve 2 µl 3M sodyum asetat eklenerek pipet yardımı ile karıştırılmıştır. Daha sonra üzerine 50 µl %95' lik etanol eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 4°C'de 12000g'de 10 dakika santrifuj edilerek reaksiyon ürününün çökmesi sağlanmıştır ve oluşan pellet 50 µl %70'lik etanol ile aynı şartlarda santrifuj edilerek yıkanmıştır. Etanol uçurulduktan sonra pellet 30 µl dH₂O ile çözülmüş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

III.3.4.4. PCR Ürünlerinin ABI 310 DNA Cihazı ile 16S rDNA Dizisinin Belirlenmesi

ABI PRISM genetik analiz sistemleri, bir kerede floresan işaretli DNA parçalarını otomatik olarak kapiler jel elektroforeziyle ayıran, saptayan ve analiz eden sistemdir. DNA dizilemesi analizleri için Sanger'in dideoksi zincir sonlanması yönteminin modifiye edilmiş hali kullanılır. Bu yöntemde DNA polimeraz uzayan zincirlere nükleotidleri eklerken, normal bir nükleotid yerine onun dideoksisi gelirse bu nükleotidde serbest 3'OH grubu olmadığından zincir uzaması sonlanır. Böylece farklı uzunlukta DNA fragmanları oluşur. Dizileme sistemindeki bu dideoksi nükleotidlerin başka bir özelliği de floresan madde ile işaretli oluşlarıdır. Böylelikle

farklı boyutlardaki DNA fragmanları aynı zamanda floresan ile işaretlenmiş olur. DNA fragmanları, kapiler jel elektroforezi ile uzunluklarına ayrılır, bu ayrıma göre bir kromatogramın oluşması sağlanır.

Saflaştırılan sekanslama reaksiyon ürünü 95°C’de 2 dakika denatüre edildikten sonra dizi analizi için ABI 310 Dizi Analizi (Applied Biosystems,USA) cihazına verilmiştir.

III.3.4.5. ABI 310 DNA Cihazı ile Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

Dizi analizinden elde edilen kromatogram sonuçları PROcessor of SEquences (ProSeq) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

III.3.5. İzolatların Büyüme Miktarlarının Ölçümü

Uygun besi yerinde ve optimum şartlarda inkübe edilen halofilik izolat kültürlerinden belli saatlerde örnekler alınarak spektrofotometrik ölçümlerle mikroorganizmaların zamana karşı büyüme profilleri elde edilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler, halofilik bakteri izolatları için OD_{660nm}’ de, arkea izolatları için ise OD_{540nm}’ de yapılmıştır. Kör olarak steril besi yeri kullanılmıştır ve örnekler, absorbans değerleri 0.1-0.8 okuma aralığında olacak şekilde steril besi yeri ile seyreltilmiştir.

III.3.6. EPS Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Serbest metil eter ve indirgen gruplar içeren oligosakkaritler, polisakkaritler ve onların türevleri, fenol ve konsantre sülfirik asit ile muamele edildikleri zaman turuncu-sarı renk verirler. Fenol, sülfirik asit varlığında şekerlerin ve onların metil türevlerinin, oligosakkaritlerin ve polisakkaritlerin kolorimetrik kantitatif mikrodeterminasyonunda kullanılabilmektedir. Yani geliştirilen bu metot, şekerlerin ve ilgili substratların çok küçük miktarlarının dahi tespitini mümkün kılmaktadır. Aynı zamanda da hızlı ve duyarlı olmasının yanı sıra tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir. Bu nedenle izolatların EPS üretimlerinin belirlenmesinde oldukça

duyarlı bir metot olan Dubois fenol-sülfirik asit metodu kullanılmıştır (Dubois ve diğ., 1956).

Fermentasyon kültürlerinden alınan örneklerdeki hücreler 5000g'de 45 dak. santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Üst fazın, süpernatantın, hacimce 1/3 oranında soğuk etanol (%75 v/v) ile +4 °C' de bir gece boyunca bekletilmesiyle oluşan ekzopolisakkarit kümeleri, 5000g'de 45 dak. santrifüjlenerek çöktürülür. Çöken polisakkaritlere, sıcak dH₂O ile çözüldükten sonra Dubois metodu uygulanır. Buna göre, EPS çözeltisinden alınan 200 µl örnek sırasıyla 5µl fenol (%80 w/v) ve 1 ml derişik H₂SO₄ ile karıştırılır. Önce 10 dak. oda sıcaklığında, daha sonra 10 dak. 28°C' lik su banyosunda inkübe edilen örneklerin, spektrofotometrede OD_{490nm}'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçümler alınırken kör olarak 200 µl dH₂O'nun 5µl fenol (%80 w/v) ve 1 ml derişik H₂SO₄ ile muamele edilmesiyle elde edilen çözelti kullanılmıştır. Okunan absorbans değerlerinden yararlanılarak kalibrasyon grafiğı üzerinden EPS üretim miktarları hesaplanmıştır.

Ek A'da verilmiş olan kalibrasyon grafiğı, belli konsantrasyon aralığında hazırlanmış olan glukoz çözeltilerine Dubois metodunun uygulanması ile elde edilmiştir.

BÖLÜM IV

SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında İzmir Çamaltı Tuzlası, Tuz Üretim Havuzundan toplanmış olan toprak örneklerinden izole edilmiş ve yüksek tuz konsantrasyonlarında üreme kabiliyeti gösteren 10 adet halofilik bakteri ve 4 adet arkea izolatu kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı, polisakkarit üretme kapasitesine sahip ekstremofillerin tanılanması, polisakkarit üreten mikroorganizmaların belirlenmesi ve değişik stratejiler kullanılarak en iyi üretimin sağlanacağı şartların belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda izolatların moleküler tanılamasının ilk aşaması olan 16S rDNA bölgelerinin DNA dizi analizi yapılmış, aynı zamanda izolatlar arasında en iyi ekzopolisakkarit üretim kapasitesine sahip olan izolat belirlenerek, ekzopolisakkarit üretimi için kullanılacak olan besi yeri bileşiminin optimizasyonu yapılmıştır.

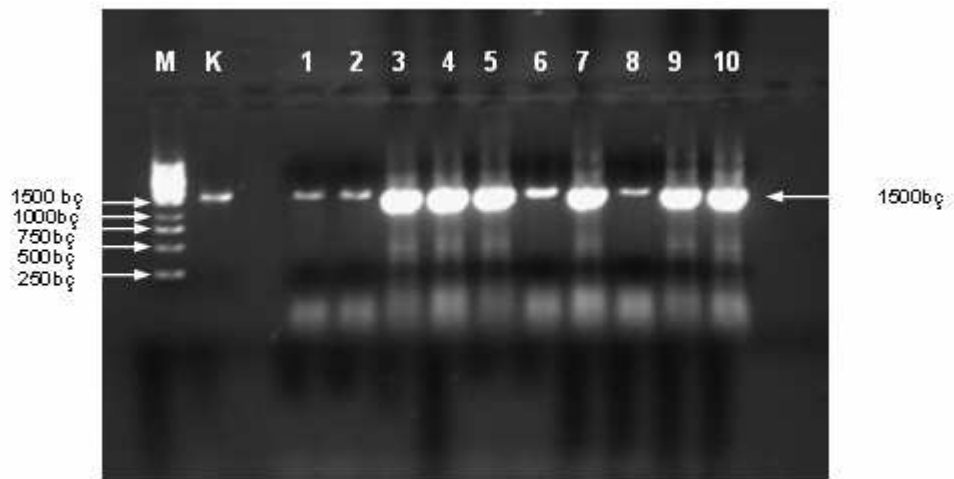
IV.1. İZOLATLARIN MOLEKÜLER TANILAMASI

Moleküler tanılamanın ilk basamağı olan polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR), bütün bakteriler veya bir cinsin tüm türleri için ortak olan gen bölgesini çoğaltabilecek özellikte bir çift primer ile amplifikasyon yapılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonunu takiben amplifiye olmuş ortak gen bölgesini içeren PCR ürününün dizi analizi ile moleküler tanılama işlemi devam etmektedir. Ortak hedef moleküller olarak, filogenetik yönden bilgi sağlayıcı genetik moleküller içerisinde bakteriler arasında korunmuş olan baz dizilim bölgesi kullanılmaktadır. Korunmuş hedef bölge olan 16S ve 23S rDNA bölgeleri mikroorganizmaların büyük bir

grubunun amplifikasyonunu sağlar. Son yıllarda 16S rDNA dizi karşılaştırmaları, pek çok yeni cinsin tanımlanmasına, mevcut cinslerin bölünmesine ve hatta daha önce farklı cinslere yerleştirilen iki türün bir cinsten birleşmesine neden olan yeni bir sınıflandırmaya yol açmıştır (Kamekura ve Seno, 1993).

IV.1.1. 16S rDNA Bölgelerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Analizi

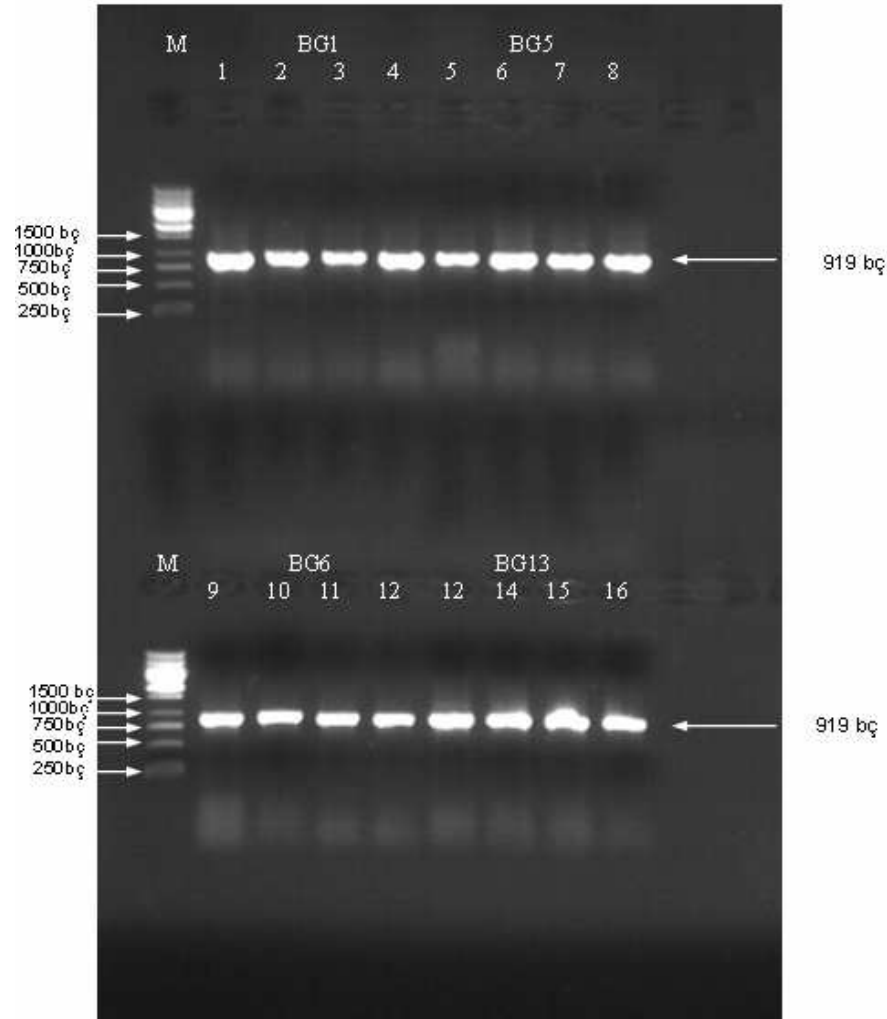
Moleküler tanımlama için örneklerin genomik DNA'ları Fermentas Genomik DNA Saflaştırma kiti kullanılarak izole edilmiş (Yavuztürk, 2005) ve Bölüm III.3.4.2.2.'de belirtilen optimize edilmiş şartlarda bakteri izolatları 16S rDNA bölgeleri, U1492r, U514f ve f27 primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile çoğaltılmıştır ve reaksiyon sonuçları agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir [Şekil IV.1].



Şekil IV.1. Halofilik Bakterilerin f27 Ve U1492r Primerleri İle Elde Edilen 16S rDNA PCR Ürünlerinin Jel Elektroferez Analizi. M: 1kb DNA Ladder (Fermentas,USA) [10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bç]. K: Kontrol 1: MÜ1, 2: MÜ2, 3: MÜ4, 4: MÜ6, 5: MÜ10, 6: MÜ12, 7: MÜ14, 8: MÜ17, 9: MÜ19, 10: MÜ21 İzolatlarının 16S rDNA PCR Ürünleri

Şekil IV.1'de görüldüğü gibi jelle sırasıyla MÜ1, MÜ2, MÜ4, MÜ6, MÜ10, MÜ12, MÜ14, MÜ16, MÜ19 ve MÜ21 numaralı izolatların 16S rDNA PCR ürünleri yüklenmiştir ve M kuyucuğuna yüklenmiş olan standart DNA bantları ile karşılaştırıldığında, yaklaşık 1500 bç uzunluğundaki bölgede bant gözlenmiştir.

Arkea izolatlarının genomik DNA'ları ise Bölüm III.3.4.1'de anlatıldığı şekilde izole edilmişlerdir. Daha sonra bu genomik DNA'lar ve A21f ve A958r primerleri kullanılarak, 16S rDNA bölgeleri Bölüm III.3.4.2.2.'de belirtilmiş olan optimize edilmiş şartlarda polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile çoğaltılmıştır. 16S rDNA PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiş ve yaklaşık 1000 bç uzunluğundaki bölgede bant gözlemlenmiştir [Şekil.VI.2].



Şekil IV.2. Arkea İzolatlarının A21f ve A958r Primerleri İle Elde Edilen 16S rDNA PCR Ürünlerinin Jel Elektroforez Analizi. M : 1kb DNA Ladder (Fermentas, USA) [10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp]. 1-2-3-4 Numaralı Kuyucuklarda : BG1, 5-6-7-8 Numaralı Kuyucuklarda: BG5, 9-10-11-12 Numaralı Kuyucuklarda : BG6, 13-14-15-16 Numaralı Kuyucuklarda : BG13 Arkea İzolatlarının 16S rDNA PCR Ürünleri

In-silico PCR simülasyon yazılım programı (<http://www.in-silico.com/PCR> ; Bikandi ve diğ., 2004) kullanılarak PCR ürünlerinin beklenen teorik doğru bant uzunlukları hesaplanmıştır. Bakteri izolatları için kullanılan f27 ve U1492r primerleri ile hesaplanan in-silico PCR ürününün uzunluğu 1500 baz çifti iken, U514f ve

U1492r primerleri kullanılarak hesaplanan in-silico PCR ürününün büyüklüğü ise 998 baz çifti uzunluğundadır. Arkea izolatlarına spesifik olan A21f ve A958r primerleri kullanılarak hesaplanan in-silico PCR ürününün büyüklüğü ise 919 baz çifti uzunluğundadır. Ek B’de verilmiş olan in-silico PCR yazılım programı ile elde edilmiş olan DNA uzunluklarının, deneysel olarak elde edilen agaroz jel elektroforezinde gözlemlenmiş olan DNA bant boylarıyla örtüşmesinden dolayı, tez kapsamında PCR ile elde edilmiş olan 16S rDNA bölgelerinin doğru uzunlukta olduğu belirlenmiştir.

IV.1.2. İzolatların 16S rDNA PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve DNA Konsantrasyonlarının Ölçümü

İzolatların reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) kiti kullanılarak saflaştırılmış ve saf DNA örneklerinin konsantrasyonları, Bölüm III.3.4.2.d’de açıklanmış olan yöntem ile OD_{260nm} ’de alınmış olan spektrofotometrik ölçüm değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo IV.1’de verilmiştir.

Tablo IV.1. İzolatların Saf 16S rDNA PCR Ürünlerinin Konsantrasyonu

İzolat İsmi	Konsantrasyon(μ g/ml)
MÜ1	389.2
MÜ2	413.3
MÜ4	791.2
MÜ6	332.5
MÜ10	604.2
MÜ12	301
MÜ14	196.3
MÜ17	127.5
MÜ19	181.3
MÜ21	261
BG 1	106.7
BG 5	227.5
BG 6	126.7
BG 13	62.5

IV.1.3. İzolatların 16S rDNA Dizi Analizleri

Saflaştırılan ve konsantrasyonları belirlenen 16S rDNA PCR ürünleri, Bölüm III.3.4.3’de belirtilen şekilde sekanslama reaksiyonuna sokulmuştur ve reaksiyon sonrası elde edilen ürünler saflaştırılmıştır. Dizi analizi için, Marmara Üniversitesi, Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarları bünyesinde bulunan ABI 310 Dizi Analizi (Applied Biosystems, USA) cihazı kullanılmıştır. ABI 310, kapiler elektroforeze dayalı DNA dizi analizi cihazıdır. Dizi analizi Sanger dideoksi zincir sonlanması yöntemine göre gerçekleşir. Bu cihaz, jel dökme ve örnek yükleme işlemlerini otomatikleştirmekte ve floresan rengi algılama sistemi (BigDye Dideoxy-Terminators) ile dizi analizi işlemini oldukça kolaylaştırmaktadır. ABI 310, aynı kapilerin içinde 5 farklı floresan rengi aynı anda algılayabildiğinden dolayı, izolatların dizi analiz reaksiyonları, 200ng saf PCR ürünü, 12.5 pmol primer ve ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kiti kullanılarak tek bir reaksiyon tüpünde gerçekleştirilmiş ve 2 dakika süreyle 95°C’de denatüre edilerek direkt cihaza verilmiştir. ABI 310 cihazından elde edilen kromatogramlar PROcessor of SEquences (ProSeq) programı kullanılarak analiz edilmiştir. İzolatların 16S rDNA dizileri Ek C’de, örnek ABI kromatogram çıktıları ise Ek D’de verilmiştir.

IV.2. HALOFİLİK BAKTERİ İZOLATLARININ EPS ÜRETİMLERİNİN BELİRLENMESİ VE OPTİMİZASYONU

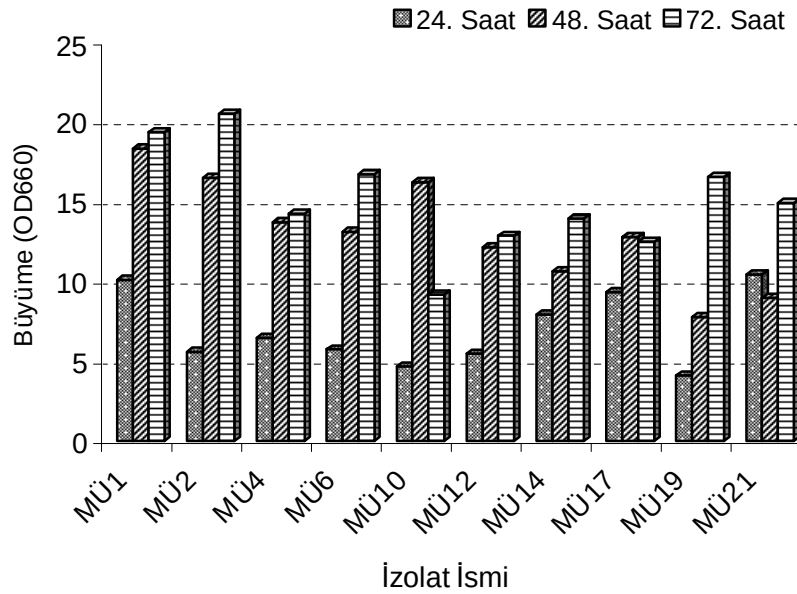
İzolatların büyütüleceği tüm cam malzemeler ve besi yerleri 121°C, 1.06 atm basınçta, 15 dak. steril edilmiştir. Ayrıca izolatların halofilik olması göz önünde tutularak 1.7 M (%10) NaCl içeren besi yeri kullanılmıştır.

Halofilik mikroorganizmaların büyütüleceği erlenlere hacimce 1/5 oranında besi yeri konulmuştur ve hazırlanan ön kültürlerden 1/100 (v/v) oranında ekim yapılmıştır. 72 saat boyunca 37°C, 180 rpm’de inkübasyona bırakılarak büyütülen mikroorganizmalardan 24., 48. ve 72. saatler sonunda örnekler alınarak büyümeleri ve EPS üretimleri analiz edilmiştir. Kompleks besi yerinde büyütülen ve en iyi üretici olarak belirlenen izolat ile çalışılarak bu izolatın iki farklı besi yerindeki

(kompleks ve minimal besi yeri) büyüme ve EPS üretimleri karşılaştırılmış, en iyi büyüme ve EPS üretiminin sağlandığı optimum pepton konsantrasyonu, karbon kaynağı ve tuz konsantrasyonu belirlenmiştir.

IV.2.1. Halofilik Bakteri İzolatlarının Kompleks ve Minimal Besi Yerlerindeki Büyüme ve EPS Üretimlerinin Karşılaştırılması ve En İyi Üreticinin Belirlenmesi

10 adet halofilik izolat arasında en iyi EPS üreticisi olanların belirlenmesi amacı ile izolatlar kompleks besi yerinde 37°C, 180 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların büyüme değerleri 660nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler ile belirlenirken, EPS üretimleri ise Dubois metodu ile analiz edilmiştir. Fermentasyon ortamından 24., 48. ve 72. saatlerde alınan örneklerin OD_{660nm}’de okunması sonucu elde edilen büyüme değerleri Şekil IV.3’de verilmiştir.

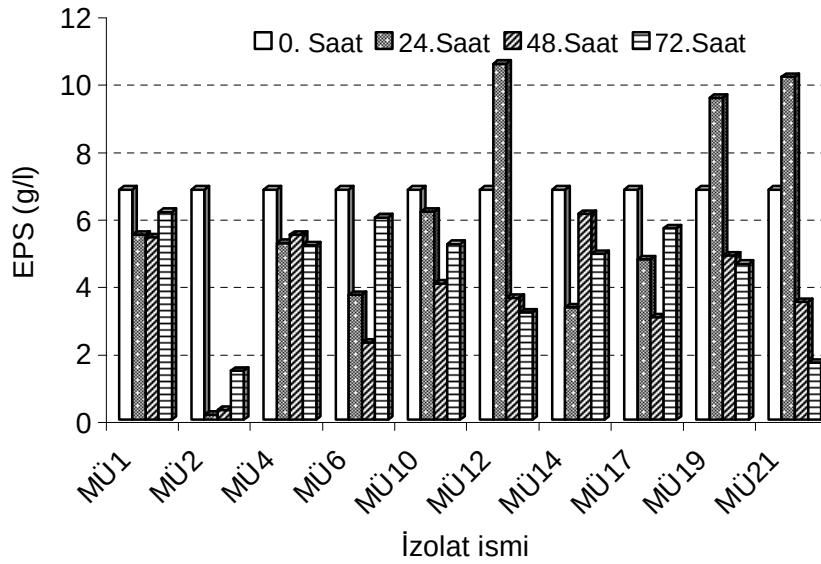


Şekil IV.3. Halofilik Bakteri İzolatlarının Zamana Karşı Büyüme Profilleri

Şekil IV.3’de görüldüğü gibi ilk 24 saatte tüm izolatların OD_{660nm} değeri 4.0’ün üzerine çıkmıştır. 72 saat sonunda ise MÜ10 izolatının büyüme değeri 9.16’da kalırken, diğer tüm izolatlar 10’un üzerinde büyüme değerleri göstermiştir.

Kompleks besi yerinde izolatların hepsinde büyüme olduğu gözlenmiştir, fakat en iyi büyüme gösterenler MÜ1, MÜ2, MÜ6 ve MÜ19 izolatlarıdır.

Kompleks besi yerinde büyütülen halofilik bakteri kültürlerinin ürettikleri EPS miktarları (g/l) Şekil IV.4’de verilmiştir. 0. saatte ölçülmüş olan değer, kompleks besi yerinin içerdiği mono, oligo veya polisakkarit gibi karbohidratların toplam miktarını gösterir. Mikroorganizmalar, fermentasyon sırasında bu karbohidratları metabolize ederek biyokütle yapımı için kullanırlar. Fermentasyonun daha sonraki aşamalarında ise, EPS üreticisi olan mikroorganizmaların besi yeri ortamlarındaki toplam karbohidrat miktarında bir artma gözlenmesi beklenir.



Şekil IV.4. Halofilik Bakteri İzolatları Tarafından Üretilen EPS Miktarlarının Zamana Karşı Profili

Şekil IV.4’de görüldüğü gibi MÜ1, MÜ2, MÜ6, MÜ10, MÜ14 ve MÜ17 izolatlarının fermentasyon ortamındaki toplam karbohidrat miktarında önce bir azalma daha sonra ise bir artma gözlemlendiği için, bu izolatların farklı miktarlarda EPS ürettikleri belirlenmiştir. Bu izolatların, Şekil IV.3’deki büyüme profilleri incelendiğinde ise, 72. saat sonucunda en yüksek absorbans değerine ulaşmış olan MÜ1, MÜ2, MÜ6 ve MÜ14 izolatları seçilmiştir. Bunların arasında, MÜ2 izolatının, yüksek oranda büyüme göstermesine rağmen EPS verileri oldukça düşüktür. MÜ6 ve MÜ14 izolatlarının ortamındaki toplam karbohidrat konsantrasyonunda sırasıyla %162 ve %83 artış gözlemlenirken, MÜ1 izolatında bu artış %14 seviyelerinde

kalmıştır. Bu durumda MÜ1 izolatının EPS üretiminin çok düşük olduğunu söylemek mümkündür. İzolatların büyüme ve EPS üretimlerine ait verilerinin birlikte değerlendirilmesi sonucu MÜ6 ve MÜ14 numaralı izolatlarla çalışmaya devam edilmesine karar verilmiştir.

Polisakkaritlerin kimyasal bileşimi söz konusu türden ve besi yerinden etkilenmektedir. Bu nedenle seçilecek olan besi yeri de büyük önem taşımaktadır. Kompleks besi yerinde gerçekleştirilen, ekzopolisakkaritlerin kantitatif analizleri, besi yeri bileşenleri içerisinde bulunan karbohidratların analiz sonuçlarını etkileyebilirlikleri nedeni ile güçleşmektedir (Kimmel ve Roberts, 1998).

Seçilen MÜ6 ve MÜ14 izolatları 37°C, 180 rpm’de kompleks besi yerinde ve karbon kaynağı olarak sükrozun kullanıldığı minimal besi yerinde büyütülmüştür. 24., 48., ve 72. saatlerde alınan örnekler ile izolatların her iki besi yerindeki büyümelerine OD_{660nm}’de bakılmıştır. EPS üretimleri ise Dubois metodu uygulanarak analiz edilmiştir. İzolatların büyümelerini gösteren OD_{660nm} değerleri Tablo. IV.2’de ve EPS üretimlerini gösteren veriler ise Tablo.IV.3’de özetlenmiştir.

Tablo. IV.2. İki Farklı Besi Yerinde Büyütülen MÜ6 ve MÜ14 İzolatlarının Spektrofotometrik Olarak Ölçülen ve Büyüme Gösteren OD_{660nm} Değerleri

	24. saat		48. saat		72. saat	
İzolat	Minimal	Kompleks	Minimal	Kompleks	Minimal	Kompleks
MÜ6	0.03	5.94	0.04	37.59	0.03	14.18
MÜ14	0.02	2.59	0.03	6.19	0.06	8.29

72 saat sonunda her iki izolat kültüründe de, minimal besi yeri ortamında kayda değer bir büyüme görülmezken, kompleks ortamda beklenen büyüme değerlerine ulaşılmıştır. İlk 24 saatte kompleks besi yerinde MÜ6 izolatının büyüme değeri 5.5’in üzerine, MÜ14 izolatının ki ise 2.5’in üzerine çıkmıştır. Buna rağmen minimal besi yerinde her iki izolatın da 72 saat sonundaki büyüme değerleri 0.02 ile 0.06 civarındadır.

Tablo. IV.3. İki Farklı Besi Yerinde Büyütülen MÜ6 ve MÜ14 İzolatlarının EPS Üretimlerinin Karşılaştırılması (g/l)

	0. saat		24.Saat		48. saat		72. saat	
İzolat ismi	Minimal	Kompleks	Minimal	Kompleks	Minimal	Kompleks	Minimal	Kompleks
MÜ6	0.57	0.59	0.63	1.39	0.32	1.86	0.53	3.21
MÜ14	0.57	0.59	0.32	1.23	0.58	1.01	0.25	2.10

MÜ6 ve MÜ14 izolatlarının EPS üretimleri de benzer şekilde yüksek oranda farklılıklar göstermektedir. Minimal besi yerinde büyüme değerleri çok düşük olduğu için EPS üretimi gözlenmemiştir. Kompleks ortamdaki EPS üretimleri karşılaştırıldığında ise bütün zaman aralıklarında MÜ6 izolatının daha yüksek EPS konsantrasyonlarına çıktığı belirlenmiştir. MÜ6 ve MÜ14 izolatlarının büyüme ve EPS verimleri karşılaştırıldığında her iki açıdan da MÜ6 izolatının daha üstün olduğu gözlemlenmiş ve bu nedenle çalışmaya MÜ6 izolatı ile devam edilmesine karar verilmiştir.

IV.2.2. Optimum Büyümenin ve EPS Üretiminin Sağlandığı Pepton Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Pepton, çeşitli kaynaklı proteinlerin pepsin, tripsin, papain gibi enzimlerle hidrolize edilmeleri sonucu suda kolayca eriyebilen ve ısıtıldığında yeniden koagule olmayan, polipeptid, dipeptid ve amino asit gibi maddelerin karışımını içeren ortamlardır. Bakteriler tarafından azot kaynağı olarak kullanılır. Et, kazein, soya küspesi gibi proteinli maddelerin enzimlerle sindirilmeleri yolu ile elde edilir.

Peptonlar, elde edildikleri protein kaynağına göre içerikleri yönünden değişiklikler gösterir. Örneğin tripsin enzimi ile alkali ortamda sindirilerek hazırlanan peptonda proteinler, pepsin enziminin etkisine göre daha ileri derecede ayrıştırılarak serbest amino asitlere dönüştürülürler. Serbest amino asitler, peptidler ve triptofana kadar parçalandıklarından birçok bakterinin üremesine elverişli bir ortam yaratılmış olur. Ayırıcı tanıda, bakterilerin triptofandan indol oluşturup oluşturmadıklarının araştırılmasında kullanılırlar. Bakteriyolojide en sık bu tür peptonlar tercih edilmektedir.

İdeal bir pepton, suda kolayca erimelidir, ısıtma ile koagule olan protein içermemelidir, indol deneylerini yapmaya imkan verecek oranda triptofan içermelidir, eğer şeker fermentasyon deneyleri yapılacaksa karışıklığa neden olabilecek hiç bir şeker içermemelidir (Akşit ve diğ., 1996).

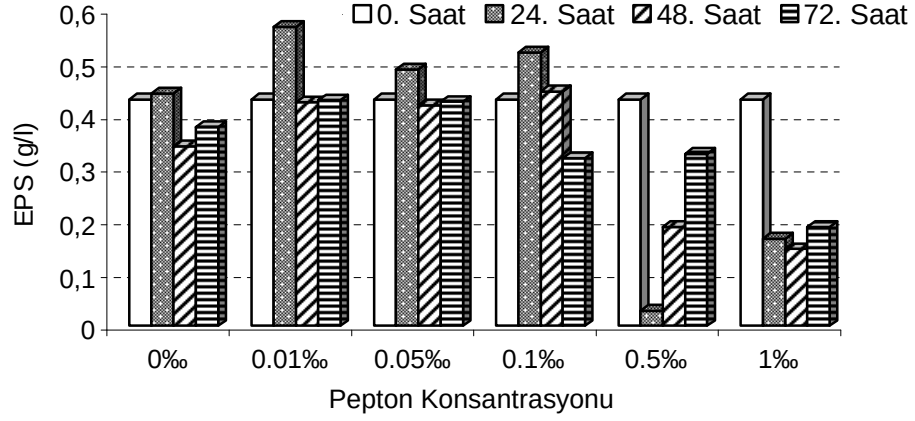
Tablo IV.3’de görüldüğü gibi, MÜ6 izolatının, minimal besi yeri ortamındaki büyüme değerleri çok düşük seviyelerde kalmıştır. Kompleks besi yeri ile karşılaştırıldığında, minimal besi yeri ortamının, EPS üretim işlemindeki farklı fermentasyon parametrelerinin optimizasyonunda ve üretilen EPS’nin saflaştırılması aşamalarında çok daha avantajlı olması göz önüne alınarak, peptonun azot kaynağı

olarak kullanılmasının büyüme ve EPS üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bunun için kazein proteininin tripsin ile sindirilmesi yoluyla elde edilmiş olan peptonun farklı konsantrasyonlarını (%0, %0.01, %0.05, %0.1, %0.5, %1) içeren, karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı minimal besi yerine MÜ6 izolatı hacimce 1/100 oranında inoküle edilmiştir. Erlenler 37°C, 180 rpm’de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Büyüme OD_{660nm}’de 24., 48. ve 72. saatlerde analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo. IV.4’de gösterilmiştir.

Tablo. IV.4. Farklı Pepton Konsantrasyonlarında Büyütülen MÜ6 İzolatının Büyümeyi Gösteren OD_{660nm} Değerleri

% Pepton	24. Saat	48. Saat	72. Saat
0	0.19	0.20	0.22
0.01	0.18	0.21	0.30
0.05	0.16	0.21	0.27
0.1	0.25	0.23	0.49
0.5	1.50	0.69	0.58
1	1.24	1.27	1.01

%0 - %0.1 pepton konsantrasyonu aralığında MÜ6 kültürlerinin tüm zaman aralıklarındaki absorbans değerleri 0.5’in altında, birbirine yakın ve düşük düzeyde kalmıştır. Besi yeri ortamındaki pepton konsantrasyonu %0.5 ve üstüne çıktığında, büyüme değerlerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu da bize %0.5’ den daha düşük pepton konsantrasyonlarında, fermentasyon süresinin veya azot kaynağı miktarının izolatın büyümesi için yeterli olmadığını göstermektedir. Ancak pepton konsantrasyonunun büyüme üzerindeki etkisi kadar EPS üretimi üzerindeki etkisi de bu çalışmada büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle optimum pepton konsantrasyonuna karar verilmeden önce EPS üretimine ait verilerinde incelenmesi gerekmektedir. Dubois metodunun uygulanması sonucu OD_{490nm}’de elde edilen sonuçlar ile üretilen EPS miktarları 0., 24., 48. ve 72. saatler için hesaplanmıştır (Şekil IV.5).



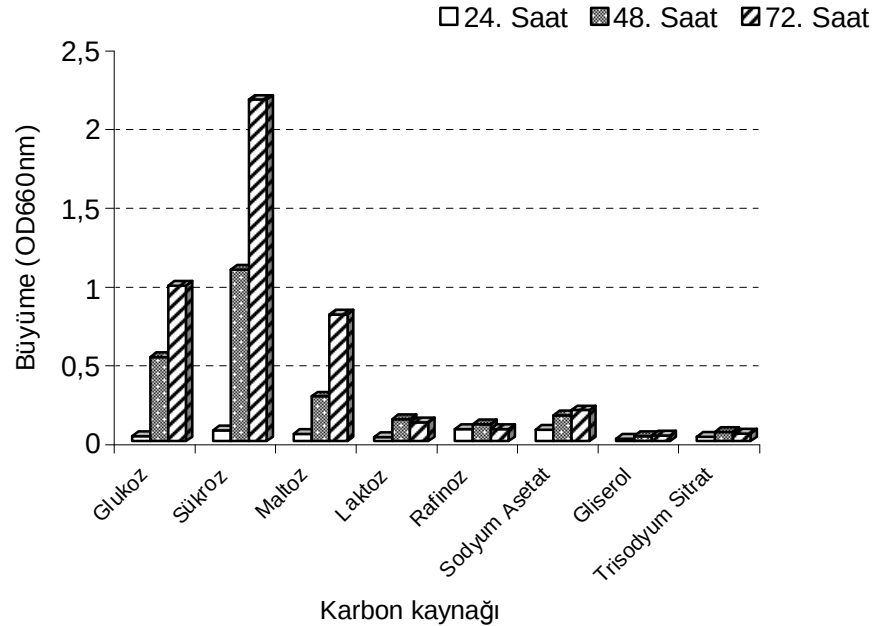
Şekil IV.5. Farklı Pepton Konsantrasyonlarında Büyütülen MÜ6 İzolatının EPS Üretiminin Grafik İle Gösterimi

Şekil IV.5’de görüldüğü gibi %0 - %0.05 pepton konsantrasyonu aralığında büyümenin çok düşük seviyelerde kalmasının bir sonucu olarak, besi yeri ortamındaki toplam karbohidrat konsantrasyonunda belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. %0.1 pepton içeren besi yerlerinde ise fermentasyonun son 24 saatlik bölümünde başlayan büyüme ile uyumlu olarak, ortamdaki toplam karbohidrat konsantrasyonunda yaklaşık %30’luk bir azalma görülmüştür. %0.5 ve %1 pepton konsantrasyonlarında ise ilk 24. saatten itibaren büyüme gözlenmesiyle beraber ortamda karbon kaynağı olarak bulunan sükrozun kullanılması ile karbohidrat miktarında ilk etapta belirgin bir azalma gözlenmiştir. Ancak, EPS üretiminin en belirgin özelliği olan, ortamdaki toplam karbohidrat konsantrasyonundaki azalma sonrası görülen artış, %1 pepton içeren besi yerlerinde büyüyen MÜ6 kültürlerinde %20 seviyesinde kalırken, %0.5 pepton konsantrasyonunda bu artış 24.-48. saat aralığında %533 ve 48.-72. saat aralığında ise %74 olarak belirlenmiştir. %1 konsantrasyonundaki besi yerindeki sükrozun tüketildiğini söylemek mümkündür, fakat EPS değerlerinde gözle görünür bir artış gözlenmemektedir. %0.5 konsantrasyonundaki besi yerinde ise önce belirgin bir düşüş, daha sonra yükseliş söz konusudur. Bu nedenle %0.5 optimum pepton konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

VI.2.3. Optimum Büyümenin ve EPS Üretiminin Sağlandığı Karbon Kaynağının Belirlenmesi

Karbon kaynağı bakteri hücrelerinin yapı taşlarının sentezi için gereklidir. Polisakkarit, lipid ve proteinlerin yapısında gerekli karbonlar için; CO₂, karbonatlar ve organik kaynaklar kullanılır.

Bu sebepten dolayı, en iyi karbon kaynağını belirlemek üzere, 1% glukoz, sükroz, maltoz, laktoz, rafinoz, asetat, gliserol ve sodyum sitrat içeren minimal besi yeri ortamlarında büyütülen MÜ6 izolatının büyüme ve EPS üretim verimleri karşılaştırılmıştır. Bunun için, 8 farklı karbon kaynağı, 121°C, 1.06 atm basınçta, 3 dak. steril edildikten sonra son konsantrasyon %1 olacak şekilde 121°C, 1.06 atm basınçta, 15 dak. steril edilmiş olan minimal besi yerine aseptik koşullarda eklenmiştir. Her bir besi yerine 1/100(v/v) oranında inoküle edilen MÜ6 izolatı 37°C, 180 rpm’de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 24.,48. ve 72. saatlerde alınan örneklerin OD_{660nm}’de ölçülen büyüme sonuçları Şekil.IV.6’da gösterilmiştir.



Şekil. IV.6. Farklı Karbon Kaynakları İçeren Besi Yerlerinde Büyütülen MÜ6 Kültürlerinin Zamana Karşı Büyüme Profilleri

Spektrofotometrik olarak elde edilen büyüme sonuçları değerlendirildiğinde en iyi büyümenin karbon kaynağı olarak sükrozun kullanıldığı ortamda olduğu

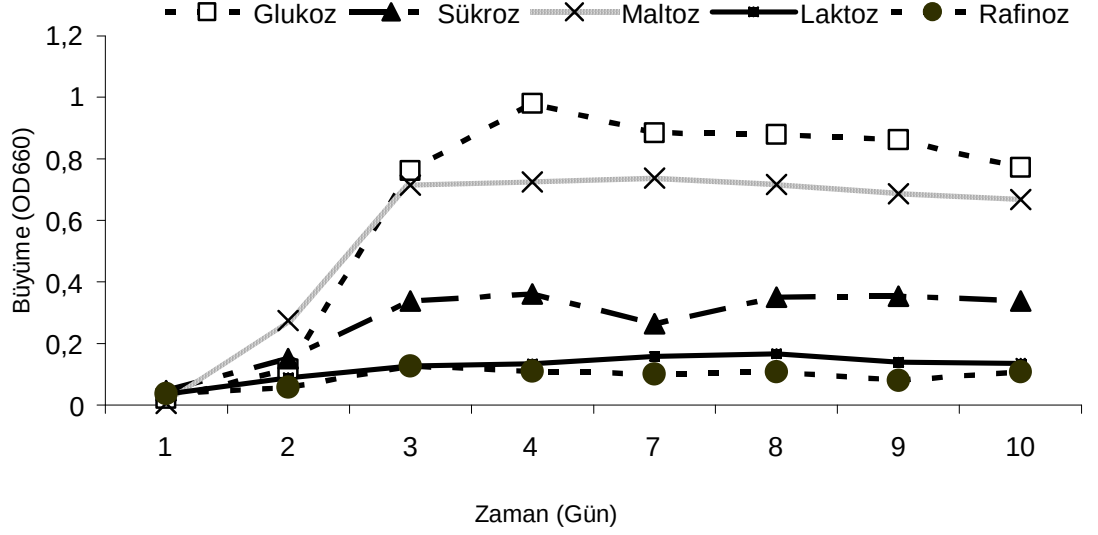
gözlemlenmiştir. Glukoz ve maltoz içeren ortamlarda da büyümenin yüksek değerlere ulaştığı belirlenirken, laktoz, rafinoz, asetat, gliserol ve trisodyum sitratın karbon kaynağı olarak kullanıldığı besi yerlerinde spektrofotometrik ölçümlerde büyüme değeri 0.2'nin üzerine çıkamamıştır.

Üretilen EPS miktarları Dubois metodunun uygulanması ile elde edilen sonuçlardan yararlanarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Tablo IV.5'de gösterilmiştir.

Tablo. IV.5. Farklı Karbon Kaynağı İçeren Besi Yerlerinde Üretilen EPS Miktarları

Karbon kaynağı	0. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Glukoz	0.55	0.55	0.51	1.08
Sükroz	0.63	0.28	0.56	1.70
Maltoz	0.44	0.36	0.72	1.94
Laktoz	0.55	0.35	0.48	0.99
Rafinoz	0.26	0.33	0.52	2.10
Asetat	0.02	0.02	0.03	0.01
Gliserol	0.01	0.01	0.02	0.01
Trisodyum sitrat	0.01	0.02	0.02	0.01

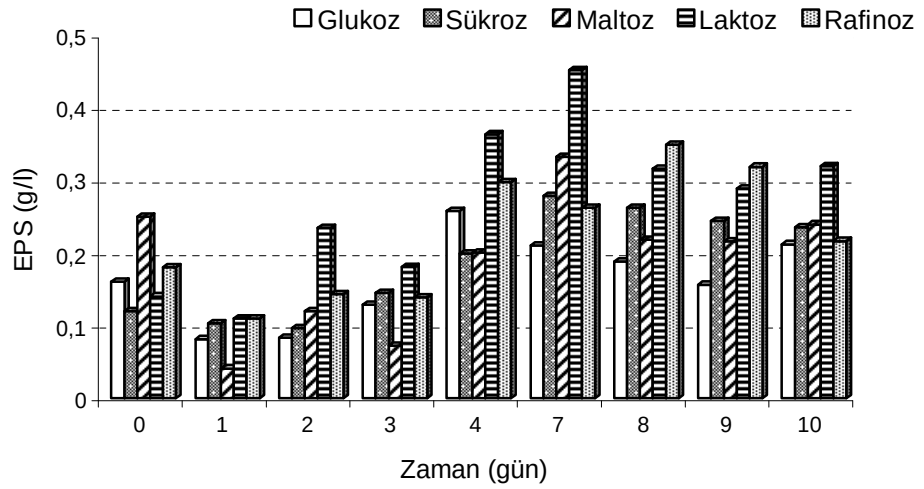
Sükroz, glukoz ve maltoz gibi büyümenin yüksek olduğu karbon kaynaklarını içeren besi yerlerindeki EPS miktarları da benzer şekilde yüksektir. Büyüme değerlerinin düşük seviyelerde kaldığı, gliserol ve sodyum sitrata göre nispeten daha yüksek büyüme verileri gösteren asetatlı besi yerinde ise EPS üretimine rastlanmamıştır. Buna karşın çok düşük büyüme verileri gösteren rafinoz ve laktozlu besi yerlerinde ise EPS üretimi söz konusudur. Asetat, gliserol ve trisodyum sitrat içeren ortamlarda ise hem büyümenin hem de EPS üretiminin çok düşük seviyelerde kaldığı belirlenmiştir. Bu veriler dikkate alınarak seçilmiş olan beş karbon kaynağı, daha uzun bir fermentasyon zaman aralığındaki büyüme ve EPS verimine olan etkileri açısından karşılaştırılmıştır.



Şekil IV.7. Farklı Karbon Kaynakları İçeren Besi Yerlerinde Büyütülen MÜ6 Kültürlerinin Zamana Karşı Büyüme Profilleri

Şekil IV.7’de görüldüğü gibi bütün kültürlerde 4. günden sonra büyümede durağan faza ulaşılmıştır ve bu fazdaki absorbans değerleri laktoz ve rafinoz içeren besi yerlerinde 0.2’nin üzerine çıkamamıştır. Bunun yanında, glukoz, maltoz ve sükroz içeren besi yerlerinde ise durağan fazdaki absorbans değerleri sırası ile ortalama 0.87, 0.71 ve 0.33 seviyelerine ulaşmıştır.

Üretilen EPS miktarlarının Dubois metodunun uygulanması ile elde edilen sonuçlardan yararlanarak hesaplanması ile elde edilen veriler Şekil IV.8’da gösterilmiştir.



Şekil IV.8. Farklı Karbon Kaynağı İçeren Minimal Besi Yerlerinde Üretilen EPS Miktarlarının Zamana Karşı Profilleri

Şekil IV.8 incelendiğinde, bütün kültürlerde farklı seviyelerde EPS üretildiği anlaşılmaktadır. 4. günden itibaren büyümenin durmasıyla beraber EPS üretiminin de durduğu gözlenmiştir. Büyümenin düşük olmasına rağmen rafinoz ve laktoz içeren ortamlarda yüksek oranda EPS üretildiği, diğer karbon kaynaklarını içeren besi yerlerindeki EPS üretimlerine ait değerlerin ise birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Laktoz ile rafinoz karşılaştırıldığında ise, benzer büyüme değerlerine karşın laktozu karbon kaynağı olarak tüketen izolatların ürettiği EPS miktarının daha yüksek değerlere ulaştığı belirlenmiştir. Tüm bu sonuçları değerlendirecek olursak MÜ6 izolat kültürlerinde, karbon kaynağı olarak glukozun kullanılması büyümeyi desteklerken, ortamda bulunan laktozun da EPS üretimini desteklediğini söyleyebiliriz.

IV.2.4. Optimum Büyümenin ve Üretimin Sağlandığı Tuz Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Halofilik MÜ6 kültürleri, büyümek için yüksek tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyan ekstremofillerdir. Bu kültürlerin besi yeri ortamındaki hem tuz konsantrasyonunun hem de laktozun büyüme ve EPS üretimi üzerindeki etkisini analiz etmek amacı ile, 5 farklı tuz konsantrasyonunda, karbon kaynağı olarak %1 glukozun kullanıldığı ve %1 glukoz ile %1 laktozun birlikte kullanıldığı minimal besi yerlerinde iki set deney tasarlanmıştır. MÜ6 izolatı 37°C’de ve 180rpm’de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Belli zaman aralıklarında alınan fermentasyon örneklerindeki büyümeye OD_{660nm}’de spektrofotometrik olarak bakılmıştır. EPS miktarları Dubois metodu ile analiz edilmiştir.

Büyümeye ait OD_{660nm}’de elde edilen veriler Tablo IV.6’de gösterilmiştir.

Tablo IV.6. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Elde Edilen Büyüme Değerleri

C kaynağı- NaCl konsantrasyonu	24. saat	48. saat	72. Saat
Set I			
G-0.85M	0.01	0.03	0.05
G-1.7M	0.02	0.62	1.28
G-2.5M	0.35	1.94	2.54
G-3.4M	0.08	0.07	0.20
G-4.3M	0.05	0.05	0.04
Set II			
G+L-0.85M	0.02	0.01	0.02
G+L-1.7M	0.88	1.31	2.54
G+L-2.5M	0.29	1.96	2.48
G+L-3.4M	0.02	0.06	0.14
G+L-4.3M	0.02	0.00	0.06

Tablo IV.6 incelendiğinde, beklenildiği gibi, ortama karbon kaynağı olarak katılan laktozun mikroorganizmaların büyümesi üzerine belirgin bir etkisi olmamıştır. Bunun yanında, ortamdaki tuz konsantrasyonunun kültürlerin büyümesi üzerindeki etkisi açık bir şekilde görülmektedir. Her iki deney setinde de, 1.7 M (%10) ve 2.5 M (%15) konsantrasyonunda tuz içeren besi yerlerinde büyüme değerlerinin oldukça yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Aynı şekilde, büyümenin gerçekleşmediği 0.85 M (%5) tuz konsantrasyonunun büyüme için yetersiz olduğu gözlemlenirken, 3.4 M (%20) ile 4.3 M (%25) tuz konsantrasyonundaki besi yerleri MÜ6 izolat kültürleri için aşırı tuzlu ortamlar olarak belirlenmiştir.

Farklı tuz konsantrasyonlarında, sadece glukozun ve glukoz ile laktozun beraber kullanıldığı besi yerlerinde üretilen EPS miktarları, Dubois metodunun uygulanması ile OD_{490nm}'de elde edilen sonuçlardan yararlanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Tablo IV.7'de gösterilmiştir.

Tablo IV.7. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Üretilen EPS Miktarları

C kaynağı- NaCl konsantrasyonu	0. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Set I				
G-0.85M	0.96	0.29	0.24	0.41
G-1.7M	0.29	0.55	0.56	0.51
G-2.5M	0.47	0.31	0.32	0.62
G-3.4M	0.35	0.27	0.70	0.68
G-4.3M	0.16	0.19	0.23	0.51
Set II				
G+L -0.85M	0.69	1.34	1.04	1.07
G+L-1.7M	1.05	0.69	0.85	1.23
G+L-2.5M	1.63	0.30	1.02	0.50
G+L-3.4M	0.96	0.25	1.78	0.51
G+L-4.3M	0.93	1.04	0.90	0.52

0.85 M (%5), 3.4 M (%20) ve 4.3 M (%25) NaCl içeren besi yerlerinde yeterli büyüme görülmediği için ölçülen EPS değerleri besi yerinde kullanılan karbon kaynağından kaynaklanmaktadır.

1.7 M (%10) NaCl içeren ve karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı besi yerinde büyüme 48. saatten sonra başladığı ve nispeten yavaş bir hızda gerçekleştiği için, EPS değerlerinde ilk etapta bir düşme, daha sonra bir artma gözlenmemiştir. 24. saatten itibaren ölçülen ortamdaki toplam karbohidrat konsantrasyonunun sabit kalmasının nedeni, mikroorganizmaların ortamdaki karbon kaynağını büyüme için tüketirken, aynı zamanda belli miktarda EPS üretmeleridir. Bazı mikroorganizmaların düşük büyüme hızlarında EPS üretiminde bulundukları literatürde farklı çalışmalarda belirlenmiştir (Schellhaass, 1983).

Her iki deney setinde de büyümenin hızlı olduğu 2.5 M (%15) NaCl içeren besi yerlerinde ise büyümenin zamana karşı değişimi ile uyumlu olarak, ölçülen EPS değerlerinde, önce bir düşüş gözlenmiştir. EPS değerlerindeki azalma, ortamda bulunan karbon kaynağının kullanıldığını, artış ise büyüyen MÜ6 kültürlerinin EPS üretimine geçtiklerini göstermektedir. Bu sebepten dolayı, 2.5 M (%15) NaCl konsantrasyonunun gerek mikroorganizmaların büyümesine gerekse EPS üretimlerine daha elverişli bir ortam sağladığı anlaşılmıştır.

Genel olarak tüm tuz konsantrasyonlarında laktoz içeren besi yeri ortamlarında daha yüksek EPS üretimi gözlenmesi nedeni ile laktozun EPS üretimini arttırdığı belirlenmiştir. 2.5 M (%15) NaCl konsantrasyonunun ve karbon kaynağı

olarak glukoz ve laktozun kullanılmasının halofilik bakteri izolatlarının büyümesi ve EPS üretim verimlerinin artırılması açısından gerekli olduğuna karar verilmiştir.

IV.3. EPS ÜRETEN HALOFİLİK ARKEA İZOLATLARININ BELİRLENMESİ

IV.3.1. Farklı Sıcaklık ve Besi Yeri Ortamlarında Büyütülen Arkea İzolatlarının Büyüme Değerleri ve EPS Üretimlerinin Karşılaştırılması

Arkea izolatlarının en iyi büyüme gösterdikleri ve maksimum EPS üretimi gerçekleştirdikleri sıcaklığın belirlenmesi için iki farklı sıcaklıkta çalışılmıştır. 4.3 M (%25) NaCl içeren, Haloarcula besi yerinde 37°C’de 200 rpm’de ve hem haloarcula hem de Brown(1963) besi yerinde 39°C’de 200 rpm’de BG1, BG5, BG6 ve BG13 arkea izolatları sekiz gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Büyüme sonuçlarına spektrofotometrik olarak OD_{540nm}’de bakılırken, EPS üretimi Dubois metodu ile analiz edilmiştir. 540nm dalga boyundaki absorbans değerleri 0.2’nin üzerinde olan kültürler büyümüş (+), altında olanlar ise büyümemiş (-) olarak belirlenmiştir. Tablo IV.8’de iki farklı sıcaklıkta ve iki farklı besi yerinde izolatların büyüme sonuçları belirtilmiştir.

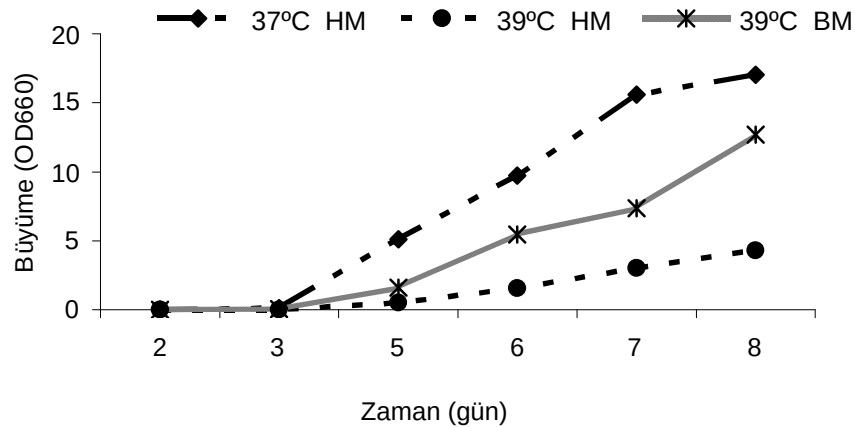
Tablo IV.8. İzolatların Büyüdükleri Besi Yerleri ve Sıcaklıklar

Sıcaklık	39°C		37°C
İzolat / Besi yer	Brown	Haloarcula	Haloarcula
BG1	-	-	-
BG5	+	+	+
BG6	-	-	-
BG13	+	-	-

Tablo IV.8’de görüldüğü gibi BG5 izolatının her iki besi yerinde ve her iki sıcaklıkta büyüme gösterdiği belirlenirken, BG13 izolatı sadece Brown besi yerinde ve 39°C’de büyüme göstermiştir. Arkea izolatlarının gösterdikleri büyüme değerleri Ek.E’de verilmiştir. İzolatların, 4.3 M (%25) NaCl içeren katı Brown (1963) besi yeri içeren petrilerde 39°C’lik inkübatörde 2-4 hafta içinde koloni oluşturdıkları gözlemlenmiştir. BG1 ve BG6 izolatlarının, katı besi yeri ortamında koloni oluşturmalarına rağmen, sıvı besi yeri ortamına geçirildiğinde büyüme göstermemeleri, farklı parametrelerin göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermiştir.

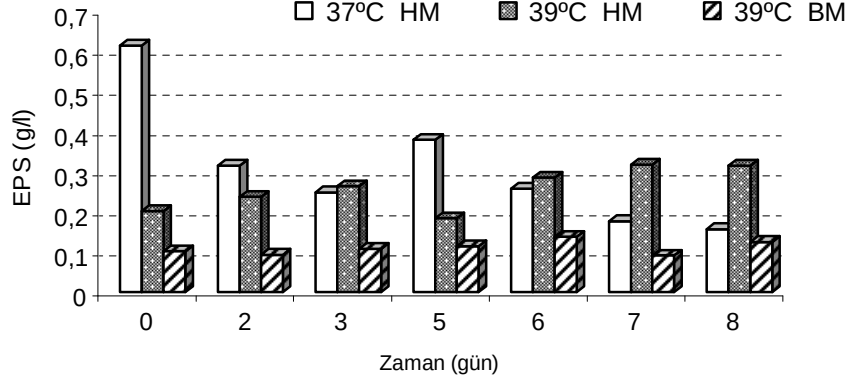
IV.3.1.2. BG5 Arkea İzolatının EPS Üretimi

BG5 izolatının her iki sıcaklıkta ve her iki besi yerinde büyümesi Şekil IV.9’da gösterilmiştir.



Şekil IV.9. BG5 Arkea İzolatının Zamana Karşı Büyüme Profili

Şekil IV.9’da da görüldüğü gibi her iki besi yerinde ve her iki sıcaklıkta büyüme 3. günden itibaren başlamıştır ve 8 gün boyunca devam etmiştir. Ancak 37°C’de ve 200 rpm’deki inkübasyon şartlarında büyüme daha hızlı ve daha yüksek miktarlarda gerçekleşmiştir.

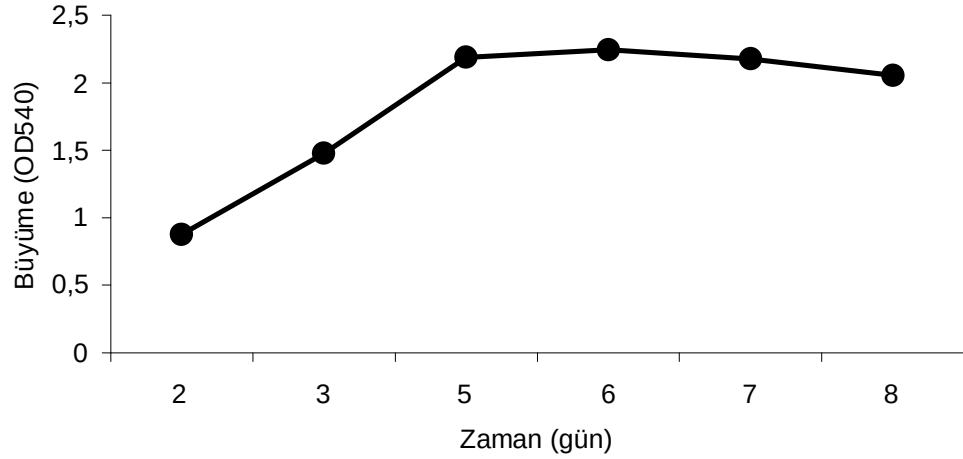


Şekil IV.10. BG5 Arkea İzolatın İçin Hesaplanan EPS Değerleri

Şekil IV.10.'da görüldüğü gibi 37°C'lik inkübatörde büyüyen BG5 arkea izolatu ortamda bulunan karbon kaynaklarını tüketmiştir, fakat EPS üretimi gözlenmemektedir.

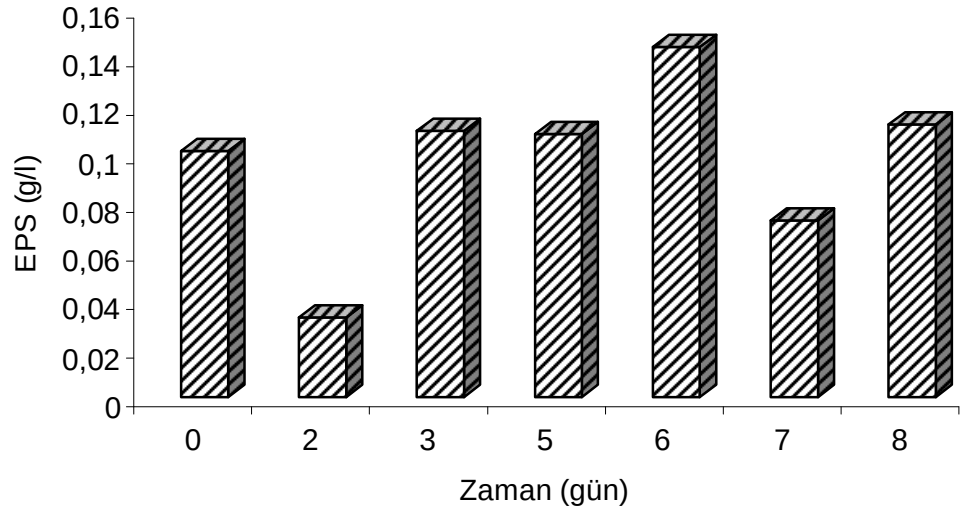
IV.3.1.2. BG13 Arkea İzolatının EPS Üretimi

BG13 arkea izolatu için Brown(1963) besi yerinde, 39°C ve 200rpm'de elde edilen büyüme sonuçları Şekil IV.11'de verilmiştir.



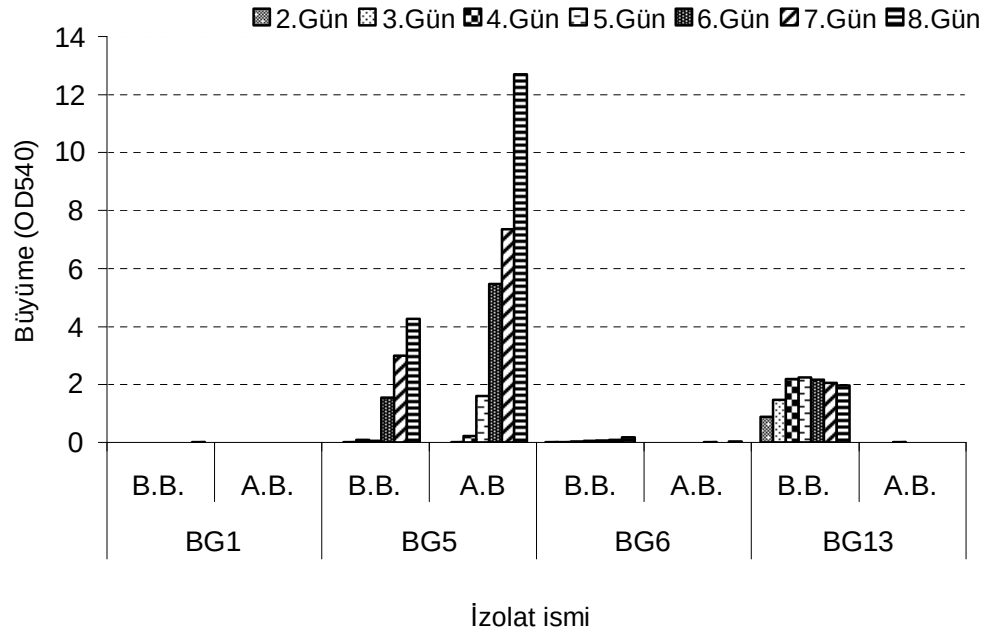
Şekil IV.11. BG5 Arkea İzolatının Zamana Karşı Büyüme Profili

Haloarcula besi yerinde büyüme göstermeyen BG13 izolatu, Brown(1963) besi yerinde 5. güne kadar büyüme gösterirken, 5. günden itibaren durağan faza geçerek büyümesi durmuştur.



Şekil IV.12. BG5 Arkea İzolatın İçin Hesaplanan EPS Değerleri

Şekil IV.12’de görüldüğü gibi 39°C’lik inkübatörde büyüyen BG13 arkea izolatının EPS üretiminde bulunduğu gözlenmemektedir.



Şekil IV.13. Arkea İzolatlarının 39°C’de Gösterdikleri Büyüme Profilleri

39°C’lik inkübatörde BG5 ve BG13 izolatlarının büyümelerini karşılaştırmak gerekirse BG5, BG13’e göre çok daha yüksek oranlarda büyüme göstermektedir. BG5 izolatı hem 37°C’lik inkübatörde hem de 39°C’lik inkübatörde büyüebilmektedir. BG13 izolatı için uygun sıcaklık 39°C iken BG1 ve BG6 izolatları her iki sıcaklıkta da büyüme göstermemiştir.

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME

V.1. MOLEKÜLER TANILAMA ÇALIŞMALARI

Bu çalışma kapsamında kullanılmış olan 10 adet halofilik bakteri ve 4 adet arkea izolatının moleküler tanılamalarının ilk basamağı olarak, 16S rDNA bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez ile elde edilmiş olan analiz sonuçları in-silico PCR simülasyon yazılım programı ile doğrulanmıştır. Daha sonra ise, ABI 310 DNA dizi analizi sistemi kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin 16S rDNA dizileri belirlenmiştir.

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda izolatların filogenetik pozisyonunu belirlemek amacı ile 16S rDNA dizilerinin benzerlik araştırması Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı (Altschul ve diğ., 1990) kullanılarak ve referans veri tabanlarından yararlanılarak yapılmalıdır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda her bir izolat için filogenetik ağaç oluşturulması gerekmektedir.

Ayrıca arkea izolatlarının 16S rDNA dizilerinin daha geniş bir bölgesinin belirlenmesi için arkea spesifik primerleri ile gerçekleştirilen dizi analizlerinin yanı sıra A27f ve U1492r primerleri ile elde edilecek PCR ürünlerinin de 16S rDNA dizileri analiz edilmelidir.

V.2. HALOFİLİK BAKTERİ İZOLATLARININ EPS ÜRETİMİ İÇİN OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

Optimizasyon çalışmalarını yapmak için ilk olarak 10 adet halofilik bakteri izolatı içinden en iyi üretici olan izolat belirlenmiştir. Kompleks besi yerinde MÜ1,

MÜ2, MÜ6, MÜ14 izolatlarının EPS değerlerinin diğer izolatlardan yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ancak MÜ2 izolatının yüksek EPS değerlerine karşın çok düşük büyüme gösterdiği belirlenmiştir. MÜ1 izolatının ise MÜ6 ve MÜ14 ile benzer miktarda büyüme göstermesine karşın EPS üretiminin düşük olduğu tespit edilmiştir. Kompleks ve minimal besi yerlerinde büyüme ve EPS değerleri karşılaştırılan MÜ6 ve MÜ14 izolatları içerisinde MÜ6 izolatının daha yüksek miktarda büyüme ve EPS üretimi gerçekleştirdiği belirlendiği için optimizasyon çalışmalarında MÜ6 izolatının kullanılması karar verilmiştir.

V.2.1. Besi Yerinin Önemi

Besi yerinin içeriği oluşacak olan polimeri yüksek oranda etkilemektedir. Aynı zamanda besi yerinde kullanılan karbon ve azot kaynaklarının konsantrasyonu ile uygun sıcaklığın belirlenmesi EPS üretimini etkileyen önemli parametrelerdir (Sutherland,1990; Cerning ve diğ.,1994; Kimmel ve diğ., 1998).

Kompleks ve minimal besi yerlerinde yapılmış olan çalışmalarda minimal besi yerinde hem büyüme değerlerinin hem de üretilen EPS miktarının kompleks besi yerinde elde edilen sonuçlara göre çok daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Bejar ve arkadaşları (1998) EPS üretiminde besi yerinin önemini *Halomonas* türüne ait izolatları üzerinde yaptıkları çalışmalarla göstermişlerdir. Kompleks besi yerinde ve karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı minimal besi yerinde yaptıkları çalışmalarda en iyi verimin alındığı besi yerinin kompleks besi yeri olduğu ve EPS üretiminin minimal besi yerinde, çalıştıkları tüm izolatlarda düştüğü görülmüştür. *Halomonas eurihaline*'e ait 19 izolat ile yaptıkları çalışmada izolatlardan 10 tanesi 1g/l'den daha fazla EPS üretmiştir. Kompleks besi yerinde üretilen maksimum EPS miktarı 1.6 g/l'dır. Minimal besi yerinde üretilen EPS miktarları ise 0.2-0.6 g/l civarındadır. Elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu bir şekilde Bejar ve arkadaşları da kompleks besi yerinde EPS üretiminin minimal besi yerine oranla daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

V.2.2. Azot Kaynağının Büyüme ve EPS Üretimi Üzerine Etkisi

Bakteriyel büyüme ve EPS üretimi için karbon kaynağı kadar etkili olan bir diğer kaynak da azot kaynağıdır. Pepton konsantrasyonunun bakteriyel izolatların büyümesi ve EPS üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılmış olan çalışmada elde edilen sonuçlara göre %0.5'in daha altındaki pepton konsantrasyonları için OD_{660nm} değerleri 0.5'in üzerine çıkamamıştır. %0.5 pepton konsantrasyonunda hesaplanan EPS değerleri ise büyümenin başlaması ile düşüş göstermiş ve büyüme devam ettikçe artışa geçmiştir. %1 pepton konsantrasyonunda üretilen EPS miktarından daha fazla miktarda EPS, %0.5 pepton konsantrasyonunda üretildiği için optimum pepton konsantrasyonu olarak %0.5'e karar verilmiştir.

Literatürde azot kaynağının ve pepton konsantrasyonunun EPS üretimi üzerine etkisini araştıran bir takım çalışmalar mevcuttur. Bonet ve arkadaşları (1993) *Aeromonas salmonicida* tarafından üretilen EPS miktarı üzerine pepton konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır. %3'den %10'a (w/v) kadar değişen konsantrasyonlarda pepton içeren YPGS besi yerinde EPS üretimini analiz etmişlerdir. %3'den %9'a kadar artan pepton konsantrasyonlarında üretilen EPS miktarında pepton konsantrasyonu ile beraber artış gösterdiğini, fakat %10 pepton konsantrasyonunda üretilen EPS miktarının %9 pepton konsantrasyonunda üretilenden farklı olmadığını kaydetmişlerdir.

Nour El-Dein ve arkadaşları (2004) ise *Pleurotus pulmonarius* tarafından üretilen EPS miktarının azot kaynağı olarak sırasıyla potasyum nitrat, asparjin ve glutamik asit içeren besi yerlerinde fazla olduğunu belirtmişlerdir. Pepton içeren besi yerinde ise en fazla biyokütle üretimi kaydedildiği için pepton en fazla miktarda büyümeyi sağlayan azot kaynağı olarak belirlenmiştir.

V.2.3. Karbon Kaynağının Büyüme ve EPS Üretimi Üzerine Etkisi

Mikrobiyolojik çalışmalarda mikroorganizmaların büyümesini ve EPS üretimlerini etkileyen en önemli faktörlerden birisi de kullanılan karbon kaynağıdır

(Nour El-Dein ve diğ., 2004). Literatürde EPS üretimi üzerine karbon kaynağının etkisini inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Literatürde bulunan çalışmalarda genel olarak belirlenen en uygun karbon kaynağı glukoz olmasına karşın glukoz kadar veya glukozdan daha uygun karbon kaynaklarının olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur.

Bu çalışma kapsamındaki halofilik bakteri izolatlarının büyümesi için en uygun karbon kaynağının glukoz olduğu anlaşılmıştır. Ancak laktozlu besi yerinde de çok düşük büyüme değerlerine rağmen yüksek miktarda EPS üretimi olduğu gözlemlenmiştir. Glukoz ve laktozun beraber kullanılmasının büyüme üzerine bir etkisinin olmadığı ancak EPS üretimini arttırdığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler, karbon kaynağı olarak glukozun kullanımının büyümeyi desteklediğini, laktozun ise EPS üretimini arttırdığını göstermiştir. Bu durumda sentezlenen biyopolimerler için en uygun besi yerinin %1 glukoz ve %1 laktoz içeren besi yeri olduğuna karar verilmiştir.

Dueñas ve arkadaşları (2002) tarafından *Pediococcus damnosus* ile yapılan çalışmada düşük glukoz konsantrasyonunun gerek mikroorganizmaların büyümesi gerekse EPS üretimi üzerindeki olumsuz etkileri gösterilmiştir.

Cerning ve arkadaşları (1994) *Lactobacillus casei* CG11 bakterisinin farklı karbon kaynaklarının (galaktoz, glukoz, laktoz, sükroz, maltoz, malibioz) farklı konsantrasyonlarının (2-20 g/l) ilave edildiği minimal besi yerinde karbon kaynağının ve karbon kaynağının konsantrasyonunun EPS üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar, 2g/l'dan 20g/l'a kadar değişen şeker konsantrasyonlarının büyümeyi değiştirmediğini göstermiştir. Galaktoz ve laktoz içeren besi yerlerinde 20g/l'lık şeker konsantrasyonunda dahi EPS üretiminin düşük olduğu belirlenmiştir. Melibioz içeren besi yerinde ise şeker konsantrasyonu 2g/l'den 20g/l'ye yükseltildiğinde üretilen EPS miktarı 15 mg/l'den 100 mg/l'ye yükselmiştir. Glukoz, sükroz ve maltoz içeren besi yerlerinde ise şeker konsantrasyonunun artışı ile EPS üretimi de artmıştır. 2g/l sükroz içeren besi yerinde elde edilen EPS miktarı 35 mg/l iken 20g/l sükroz içeren besi yerinde elde edilen EPS miktarı 50 mg/l'dir. Maltoz konsantrasyonu 2 g/l'den 20 g/l'ye yükseltildiği zaman üretilen EPS miktarı 15 mg/l'den, 60mg/l'ye yükselmektedir. 2g/l'lik glukoz konsantrasyonunda elde edilen EPS miktarı 70mg/l'dir ve bu miktar aynı konsantrasyonda şeker içeren diğer tüm besi yerlerinden daha yüksektir. 20 g/l glukoz içeren besi yerinde üretilen EPS miktarı ise 160 mg/l'dir. Bu çalışmada elde edilmiş sonuçlara benzer şekilde,

Cerning ve arkadaşları tarafından da glukozun EPS üretiminde en etkili karbon kaynağı olduğu belirtilmiştir.

Tallon ve arkadaşları (2003) *Lactobacillus plantarum* EP56 mikroorganizması ile büyüme ve EPS üretimi üzerine karbon kaynağının etkisini araştırmışlardır. Glukoz, galaktoz, fruktoz, sükroz ve laktoz içeren besi yerlerinde büyüme ve EPS üretimini analiz etmişlerdir. Maksimum büyümenin görüldüğü besi yerleri sırasıyla glukoz, sükroz ve galaktoz olarak belirlenirken, fruktoz ve laktoz içeren besi yerlerinde büyüme değerlerinin oldukça düşük kaldığı görülmüştür. Büyümenin yüksek olduğu besi yerlerindeki EPS üretimleri karşılaştırıldığında en fazla üretimin sükrozlu besi yerinde gerçekleştiği gözlemlenirken, sükrozu sırasıyla galaktoz ve glukoz takip etmiştir. Fruktoz içeren besi yerinde büyüme değerlerine benzer şekilde EPS değerlerinin de düşük olduğu gözlemlenmiştir. Büyümenin düşük olduğu laktoz içeren besi yerinde ise diğer tüm karbon kaynaklarını içeren besi yerinden daha fazla miktarda EPS üretimi olduğu belirlenmiştir.

Poli ve arkadaşları (2004) *Halomonas* türüne ait bir bakteri ile minimal besi yerinde 11 farklı karbon kaynağının büyüme ve EPS üretimine etkisini araştırmışlar ve asetatın büyüme ve EPS üretimi için en iyi karbon kaynağı olduğunu, asetatı takiben ise sırasıyla galaktoz, glukoz, riboz, fruktoz, sükroz ve trehalozun geldiğini belirtmişlerdir.

Martínez-Checa ve arkadaşları (2002) ise *Halomonas* türü ile yaptıkları çalışmada farklı besi yerlerinden ekstrakte edilen ekzopolisakkaritlerin ürün oluşumunu, kimyasal bileşimini, viskozitesini ve emülsiyon aktivitesini araştırmışlar ve *Halomonas eurihaline* tarafından ekzopolisakkarit üretiminin, %5 NaCl içeren kompleks besi yerinde glukoz yerine çeşitli hidrokarbonların (*n*-tetradekan, *n*-hekzadekan, *n*-oktan, ksilen, mineral yağlar) ilave edilmesi sonucunda değişimini analiz etmişlerdir. Tüm besi yerlerinde EPS üretiminin olduğu belirlenirken en fazla miktarda üretimin gerçekleştiği besi yerinin *n*-hekzadekan içeren besi yeri olduğu belirlenmiştir. *n*-hekzadekan içeren besi yerinde sentezlenen EPS miktarının da, glukoz içeren besi yerinde sentezlenen EPS miktarı ile aynı olduğunu tespit etmişlerdir.

V.2.4. NaCl Konsantrasyonunun Büyüme ve EPS Üretimi Üzerine Etkisi

Ekstremofiller, ekstrem şartlara adaptasyon sağlayabilen mikroorganizmalardır. Halofilik mikroorganizmalar, yüksek oranda tuz içeren ortamlara adaptasyon sağlayabilen ve optimum büyüme için belli miktarda tuza ihtiyaç duyan ekstremofillerdir (Kushner ve Kamekura, 1988; Oren, 2002) . Aşırı halofilik mikroorganizmalar büyümek için yüksek NaCl konsantrasyonlarına ihtiyaç duyarlar. Aşırı halofilik mikroorganizmalar için optimum NaCl konsantrasyonu 2.5-5.2 M (%15-30)' dır (Echigo ve diğ., 2005). *Haloarcula vallismortis* aşırı halofilik mikroorganizmalar grubuna dahil bir türdür (Gonzalez ve diğ., 1978). Ilımlı halofiller ise 0.5-2.5 M (%3-15) NaCl içeren besi yerinde optimum büyüme göstermektedirler (Echigo ve diğ., 2005). *Halomonas maura* ve *Merinococcus halophilus* ılımlı halofillere örnek mikroorganizmalardır (Bouchotroch ve diğ., 2001; Hao ve diğ., 1984). Halotolerant mikroorganizmalar ise hem NaCl içermeyen besi yerinde hem de yüksek konsantrasyonlarda NaCl içeren besi yerlerinde büyüyebilme özelliğine sahiptirler (Echigo ve diğ., 2005). *Halobacillus salinus* tuz içermeyen besi yerinde büyübildiği gibi %23 NaCl içeren besi yerinde de büyüebilmektedir (Yoon ve diğ., 2003).

Yaptığımız çalışmada 1.7 M (%10)'ın altında ve 2.5 M (%15)'in üzerinde NaCl konsantrasyonlarında bakteriyel izolatlarımızda yeterli miktarda büyüme olmadığı gözlemlenmiştir. Büyümenin olmadığı besi yerlerinde EPS üretimi söz konusu olmayacağı için bu izolatlar ile yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak olan tuz konsantrasyonunun 1.7-2.5 M (%10-15) civarında olması gerekmektedir. Ancak EPS üretimleri karşılaştırıldığında 2.5 M (%15) NaCl içeren besi yerinde daha yüksek EPS değerleri elde edildiği için optimum tuz konsantrasyonu 2.5 M (%15) olarak belirlenmiştir.

Literatürde büyüme ve EPS üretimi üzerine NaCl konsantrasyonunun etkisini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Bouchotroch ve arkadaşları (2001) *Halomonas maura* sp. nov. ile yaptıkları çalışmada 0.1-5.1 M (%0.5-30) arasında değişen konsantrasyonlarda NaCl içeren besi yerlerinde EPS üretimini test etmişlerdir. Optimum NaCl konsantrasyonunu 1.2 M (%7) olarak belirlerken, ihtiyaç duyulan minimum NaCl konsantrasyonunu da 0.2 M (%1) olarak tespit etmişlerdir.

V.3. ARKEA İZOLATLARININ EPS ÜRETİMİ İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR

Yaptığımız çalışmada arkea izolatlarının Brown ve Haloarcula olmak üzere iki farklı besi yerinde ve iki farklı sıcaklıkta büyümeleri ve EPS üretimleri analiz edilmiştir. 4.3 M (%25) NaCl içeren katı Brown besi yerinde tüm izolatlarda koloni oluşumu gözlenirken, sıvı besi yerinde arkea izolatlarından sadece BG5 ve BG13 büyüme göstermiştir. BG5 izolatı her iki besi yerinde ve her iki sıcaklıkta da büyürken, BG13 izolatının sadece 39°C’de Brown besi yerinde büyüdüğü gözlemlenmiştir.

Arkea izolatlarının büyümelerini ve EPS üretimlerini iyileştirmek için bir takım optimizasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Daha düşük tuz konsantrasyonlarında ve daha farklı sıcaklıklarda büyüme ve EPS üretimleri analiz edilmelidir. Ayrıca halobakteriler oldukça yavaş büyüyen mikroorganizmalardır. Bu nedenle inkübasyon süresini arttırarak daha uzun zaman aralıklarında büyüme ve EPS üretimlerinin analiz edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Akşit, F.; Akgün, Y.; Kiraz, N. “Mikrobiyoloji”, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, Türkiye, (1996) 72-73.
- [2] Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, M.; Myers, E.W.; Lipman, D.J.: “Basic local alignment search tool”, *Journal of Mol. Biol.*, 215 (1990) 403-410.
- [3] Antón, J.; Meseguer, I.; Rodríguez-Valera, F.: “Production of an Extracellular Polysaccharide by *Haloferax mediterranei*”, *Appl Environ Microbiol.*, 54(10) (1988) 2381–2386.
- [4] Arias, S.; Ferrer, M.R.; del Moral A.E.; Quesada V. Béjar, Mauran.: “An exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology”, *Extremophiles*, 7 (2003) 319–324.
- [5] Bano, N.; Ruffin, S.; Ransom, B.: “Phylogenetic composition ah Arctic Ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages” *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (2004) 781-789.
- [6] Becker, A.; Katzen, F.; Pühler, A.; Ielpi, L.: “Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50 (1998) 145-152.
- [7] Béjar, V.; Calvo, C.; Moliz, J.; Diaz-Martinez, F.; Quesada, E.: “Effect of growth conditions on the rheological properties and chemical composition of *Volcaniella eurihalina* exopolysaccharide”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 59 (1996) 77-86.

- [8] Béjar, V.; Calvo, C.; Llamas, I.; Quesada, E.: “Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains included in the species *Halomonas eurihalina*”, *Journal Biotechnology*, 61 (1998) 135-141.
- [9] Bikandi, J.; San Millen, R.; Rementeria, A.; Garaizar, J.: “*In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction”, *Bioinformatics*, 20 (2004) 798-799.
- [10] Bonet, R.; Simon-Pujol, M.D.; Congregado, F.: “Effect of Nutrients on Exopolysaccharide Production and Surface Properties of *Aeromonas salmonicida*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (8) (1993) 2437-2441.
- [11] Bouchotroch, S.; Quesada, E.; Izquierdo, I.; Rodriguez, M.; Bejar, V.: “Bacterial exopolysaccharides produced by newly discovered bacteria belonging to the genus *Halomonas*, isolated from hypersaline habitats in Morocco”, *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.*, 24 (2000): 374-378.
- [12] Bouchotroch, S.; Quesada, E.; del Moral A.; Llamas, I.; Bejar, V.: “*Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51 (2001) 1625-1632.
- [13] Boyle C.D.; Reade A.E.: “Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 (1983) 392-399.
- [14] Boza, Y.; Neto, L.P.; Costa, F.A.A; Scamparini, A.R.P.: “Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* cultures”, *Process Biochemistry*, 39 (2004) 1201-1209.
- [15] Britschgi, T.B.; Giovannoni, S.J.: “Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing”, *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (1991) 1707-1713.
- [16] Broadbent, J.R.; McMahon, D.L.; Welker, C.J., Oberg, S.; Moineau, S.: “Biochemistry, Genetics, and Applications of Exopolysaccharide Production in *Streptococcus thermophilus* : A review”, *J. Dairy Sci.*, 86 (2003) 407-423.

- [17] Calvo, C.; Béjar ,V.; Ferrer, M.R.; Martinez-Checa, F.; Quesada, E.: “Some Rheological Properties Of The Extracellular Polysaccharide Produced By *Volcaniella eurihalina* F2-7”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55 (1995) 45-54.
- [18] Cerning, J.; Renard, C.M.G.C.; Thibault, J.F.; Bouillanne, C.; Landon, M.; Desmazeaud, M.; Topisirovic, L.: “Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer”, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (1994) 3914-3919.
- [19] Crescenzi, V.: “Microbial polysaccharides of applied interest: Ongoing research activities in Europe”, *Biotechnol. Prog.*, 11 (1995) 251-259.
- [20] Çotuk, A.; Küçüker, M.A.: “Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu”, *Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti*, 2.Baskı (1995).
- [21] Dassy, B.; Stringfellow, W.T.; Lieb, M.; Fournier, J.M.: “Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in semi-synthetic medium”, *J. Gen. Microbiol.*, 137 (1991) 1155-1162.
- [22] De Vuyst, L.; De Vin F.; Vaningelgem F.; and Degeest B.: “Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria”, *Int. Dairy J.*, 11 (2001) 687–707.
- [23] Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F.: “Colorimetric methods for determination of sugars and related substances”, *Anal. Chem.*, 20 (1956), 350-356.
- [24] Dueñas, M.; Munduate, A.; Perea, A.; Irastorza, A.: “Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions”, *International Journal of Food Microbiolgy*, 87 (2002) 113-120.

- [25] Echigo A.; Hino M.; Fukushima T.; Mizuki T.; Kamekura M.; Usami R.: "Endospores of halophilic bacteria of the family Bacillaceae isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm)", *Saline Systems*, (2005) 1:8.
- [26] Edgcomb, V.P.; Kysela, D.T.; Tekse, A.; Gomez, A.V.; Sogin, M.L.: "Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin Hydrothermal vent environment", *PNAS*, 11 (2002) 7658-7662.
- [27] Farrés, J.; Caminal, G.; López-Santín, J.: "Influence of phosphate on rhamnose-containing exopolysaccharide rheology and production by *Klebsiella* I-174", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48 (1997) 522-527.
- [28] Galinski E.A.; Tindall B.J.: "Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant microorganisms", In *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles* Eds: Herbert R.H.; Sharp R.J., Blackie, Glasgow, (1992) 76-114.
- [29] Gassem, M.A.; Schmidt, K.A; Frank, J.F.: "Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*", *J. Food Sci.*, 62 (1997) 171-173.
- [30] Gould, G.W.: "Antimicrobial compound", In *Biotechnology and Food Ingredients*, Eds: Goldberg, I.; Williams, R., Van Nostrand Reinhold, New York, (1991) 461-483.
- [31] Gonzalez, C.; Gutierrez, C.; Ramirez, C.: "*Halobacterium valiismortis* sp. nov. An amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium", *Can. J. Microbial.*, 24 (1978) 710-715.
- [32] Guezennec J.G.; Pignet P.; Raguénès G.; Deslandes E.; Lijour Y.; Gentric E.: "Preliminary chemical characterization of unusual eubacterial exopolysaccharides of deep-sea origin", *Carbohydr. Polym.*, 24 (1994) 287-294.

- [33] Halleck, F.E.: "Polysaccharides and methods for the production thereof", *U.S. Patent*, 3 (1967) 301-848.
- [34] Hao, M.V.; Kocur, M.; Komekata, K.: "*Marinococcus* gen nov., a new genus for motile cocci with meso-diaminopimelic acid in the cell wall; and *Marinococcus albus* sp. nov. and *Marinococcus halophilus* (Novitsky and Kushner) comb. Nov.", *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 30 (1984) 449-459.
- [35] Hood, S.K.; Zottola, E.A.: "Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems", *Int. J. Food Microbiol.*, 37 (1997) 145-153.
- [36] Hussain, M.; Wilcox, M.H.; White, P.J.: "The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence", *FEMS Microbiology*, 10 (1993) 191-207.
- [37] Kamekura, M.; Seno, Y.: "Partial sequence of the gene for a serine protease from a halophilic archaeum *Haloferax mediterranei* R4, and nucleotide sequences of 16S rRNA encoding genes from several halophilic archaea" *Experientia*, 49 (1993) 503-513.
- [38] Kimmel, S.A.; Roberts, R.F.; Ziegler, G.H.: "Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* RR grown in a semi defined medium", *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (1998) 659-664.
- [39] Kimmel, S.A.; Roberts, R.F.: "Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* RR", *International Journal of Food Microbiology*, 10 (1998) 87-92.
- [40] Kojic, M.; Vujcic, M.; Baina, A.; Cocconcelli, P.; Cerning, J.; Topisirovic, L.: "Analyses of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG₁₁, isolated from cheese", *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 4086-4088.

- [41] Kreft, J.U.; Wimpenny, J.W.T.: “Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth”, *Water.Sci.Technol.*, 43 (2001) 135-141.
- [42] Kulichevskaya I.S.; Milekhina E.I.; Borzenkov I.A.; Zvyagintseva I.S.; Belyaev S.S.: “Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeabacteria”, *Microbiology*, 60 (1992) 596-601.
- [43] Kumar C.G.; Joo H.S.; Choi J.W.; Koo Y.M.; Chang C.S.: “Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450”, *Enzyme and Microbial Technology*, 34 (2004) 673-681.
- [44] Kushner D.J.; Kamekura M.: “Physiology of halophilic eubacteria”, In *Halophilic bacteria* Ed: Rodriguez-Valera F., vol. 1, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, (1988) 109–138.
- [45] Lacroix, C.; LeDuy, A.; Noel, G.; Choplin, L.: “Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium”, *Biotechnol. Bioeng.*, 27 (1985) 202-207.
- [46] Leriche V.; Sibille P.; Carpentier B.: “Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms”, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2000) 1851-6.
- [47] Lindgren, S.E.; Dobrogosz, W.J.: “Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 87 (1990) 149-164.
- [48] Martínez-Checa, F.; Toledo, F.L.; Vilchez, R.; Quesada, E.; Calvo, C.: “Yield production, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons”, *Applied Microbial. Biotechnology*, 58 (2002) 358-363.

- [49] Masson L.; Holbein, BE.: “Influence of nutrient limitation and low pH on serotype B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide level; correlation with virulence for mice”, *Infect. Immun.*, 47 (1985) 465-471.
- [50] Matsunaga T.; Sudo H.; Takemasa H.; Wachi Y.: “Sulfated extracellular polysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytica* immobilized on light-diffusing optical fibers”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45 (1996) 24-27.
- [51] Maugeri T.L.; Gugliandolo C.; Caccamo D.; Panico A.; Lama L.; Gambacorta A.; Nicolaus B.: “A halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide”, *Biotechnology Letters*, 24 (2002) 515-519.
- [52] Maugeri, T.L.; Gugliandolo, C.; Caccamo, D.; Stackebrandt, E.: “A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents”, *System. Appl. Microbiol.*, 24 (2001) 572–587.
- [53] McNeil, B.; Harvey, L.M.: “Viscous fermentation products”, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 13 (1993) 275-304.
- [54] Mengistu, Y.; Edwards, C.; Saunder, J.: “Continuous culture studies on the synthesis of capsular polysaccharide by *Klebsiella pneumoniae* K1”, *J. Appl. Bacteriol.*, 76 (1994) 424-430.
- [55] Milci S.; Yaygın H.: “Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritler ve Süt Ürünlerindeki Fonksiyonları”, *Gıda*, 30(2) (2005) 123-129.
- [56] Nakajima, H.; Toyoda, S.; Toba, T.; Itoh, T.; Mukai, T.; Kitazawa, H.; Adachi, S.: “A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495”, *J. Dairy Sci.*, 73 (1990) 1472-1477.
- [57] Nicolaus B.; Lama L.; Esposito E.; Manca M.C.; Improta R.; Bellitti M.R.; Duckworth A.W.; Grant W.D.; Gambacorta A.: “*Haloarcula* spp able to

biosynthesize exo-endopolymers”, *J. Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23 (1999) 489-496.

[58] Nicolaus B.; Lama L.; Manca M.C.; Gambacorta A.: “Extremophiles: polysaccharides and enzymes degrading polysaccharides”, *Recent Res Devel Biotech Bioeng*, 2 (1999) 37-64.

[59] Nicolaus B.; Panico A.; Manca M.C.; Lama L.; Gambacorta A.; Maugeri T.; Gugliandolo C.; Caccamo D.: “A thermophilic *Bacillus* isolated from eolian shallow hydrothermal vent, able to produce exopolysaccharide”, *System. Appl. Microbiol.*, 23 (2000) 426–432.

[60] Nicolaus B.; Lama L.; Panico A.; Schiano Moriello V.; Romano I.; Gambacorta A.: “Production and characterization of exopolysaccharides excreted by thermophilic bacteria from shallow, marine hydrothermal vents of flegrean areas (Italy)”, *System Appl Microbiol.*, 25(3) (2002) 319-325.

[61] Nour El-Dein, M.M.; El-Fallal, A.M.; El-Shahat; Toson, A.; Hereher, E.F.: “Exopolysaccharides Production by *Pleurotus pulmonarius*: Factors Affecting Formation and Their Structures”, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(6) (2004) 1078-1084.

[62] Oda, M.; Hasegawa, H.; Komatsu, S.; Kambe, M.; Tsuchiya, F.: “Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp.”, *Agric. Biol. Chem.*, 47 (1983) 1623-1625.

[63] Oren, A.: “Diversity of halophilic microorganisms environments, phylogeny, physiology, and applications”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28 (2002) 56–63.

[64] Oren, A; “Halophilic microorganisms and their environments”, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, (2002).

[65] Öztürk, D.C; Denizci, A.A.; Kazan, D.; Erarslan, A.: “Extracellular polysaccharides produced by bacteria isolated from chipboard production processes”, *Chemical Engineering Transactions*, 3 (2003) 1707-1712.

[66] Poli, A.; Moriello, V.S.; Esposito, E.; Lama, L.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B.: “Exopolysaccharide production by a new *Halomonas* strain CRSS isolated from

saline lake Cape Russell in Antarctica growing on complex and defined media”, *Biotechnology Letters*, 26 **(2004)** 1635-1638.

[67] Qiao, M.: “Lantibiotic nisin of *Lactococcus lactis*: biosynthesis, immunity and regulation”, Ph.D. Thesis, University of Helsinki, **(1996)** Finland.

[68] Raguénès, G.H.C.; Peres, A.; Ruimy, R.; Pignet, P.; Christen, R.; Loaec, M.; Rougeaux, H.; Barbier, G.; Guezennec, J.G.: “*Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent” *Journal of Applied Microbiology* 82 **(1997)** 422–430.

[69] Rinker, K.D.; Kelly R.M.: “Effect of carbon and nitrogen sources on growth dynamics and exopolysaccharide production of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* and bacterium *Thermotoga maritima*” *Biotechnol. Bioeng.* 69 **(2000)** 537–547.

[70] Rodriquez-Valera, F.:” Halophilic bacteria”, vol. 1, *CRC Pres*, , Boca Raton, **(1988)**.

[71] Rodriquez-Valera, F.: “General and applied aspects of halophilic microorganisms”, *Plenum Pres*, New York, **(1991)**.

[72] Rodriquez-Valera, F.: “Cultivation of halophilic archaea”, In *Archaea: A Laboratory Manual*, Ed: Robb, F. T.; Place A. R.; Sowers K. R.; Schreier H. J.; DasSarma S.; Fleishmann, E. M., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y., **(1995)** 13-16.

[73] Roger, O.; Kervarec, N.; Ratiskol, J.; Collic-Jouault, S.; Chevolot, L.: “Structural studies of the main exopolysaccharide produced by the deep-sea bacterium *Alteromonas infernus*”, *Carbohydrate Research*, 339(14) **(2004)** 2371-2380.

[74] Romano, I.; Gambacorta, A.; Lama, L.; Nicolaus, B.; Giordano, A.: “*Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* subsp. nov., a haloalkaliphilic aerobe from

Campania Region (Italy)", *Systematic and Applied Microbiology*, 28(1) **(2005)** 34-42.

[75] Saxelin, M.: "Development of dietary probiotics: estimation of optimal *Lactobacillus* GG concentrations", Ph.D. Thesis, University of Turku, **(1995)** Finland.

[76] Schellhaass, S.M.: "Characterization of Exocellular Slime Produced by Bacterial Starter Culture used in the Manufacture of Fermented Dairy Products", PhD Thesis, University of Minnesota, Saint Paul, **(1983)** USA.

[77] Schellhaass, S.M.; Morris, M.A.: "Rheological and scanning electron microscopy examination of skim milk gels obtained by fermenting with ropy and nonropy strains of lactic acid bacteria", *Food Microstruct.*, 4 **(1985)** 279-287.

[78] Schiano Moriello, V.; Lama, L.; Poli, A.; Gugliandolo, C.; Maugeri, T.L.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B.: "Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas", *J. Industrial. Microbiol. Biotechnol.*, 30(2) **(2003)** 95-101.

[79] Sekoulov, I.; Görg, S.: "Endüstriyel Atıksu Arıtımında Sabit Yataklı Sistemler", *Su Kirliliği ve Kontrolü Dergisi*, 5.2 **(1995)** 9-16.

[80] Sengha, S.S.; Anderson, A.J.; Hacking, A.J.; Dawes, E.A.: "The production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture", *J. Gen. Microbiol.* 135 **(1989)** 759-804.

[81] Smith, M.D.: "The Halohandbook: Protocols for halobacterial genetics"4.9, March **(2004)**.

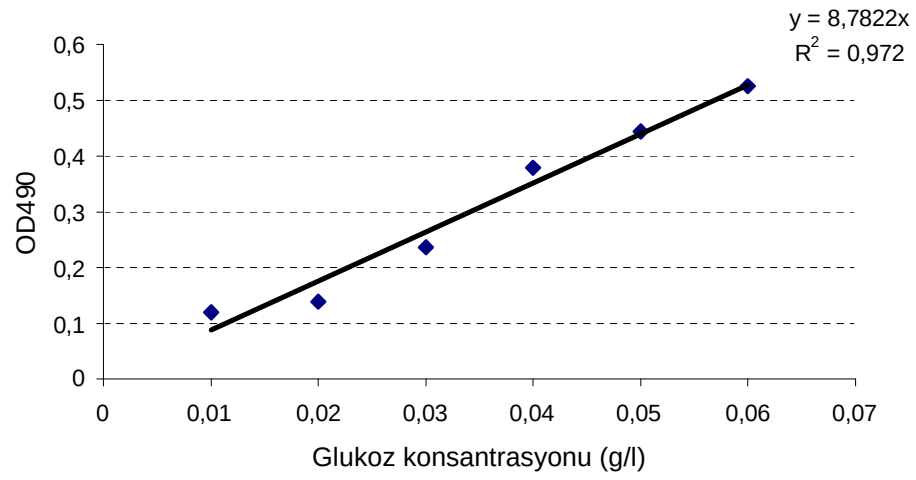
[82] Sutherland I.W.: "Bacterial exopolysaccharides", *Adv. Microb. Physiol.*, 8 **(1972)** 143-213.

- [83] Sutherland I.W.: “Extracellular polysaccharides”, In *Biotechnology* Ed: H. Dellweg, Verlag Chemic, Weinheim, Vol. 3, (1983) 531.
- [84] Sutherland I.W.: “The properties and potential of microbial exopolysaccharides”, *Chim. Oggi*, 9 (1990) 9-14.
- [85] Sutherland, I.W.: “Biotechnology of microbial exopolysaccharides”, Cambridge University Pres, New York, USA, (1990)1-20,163.
- [86] Sutherland, I.W.: “Novel and established applications of microbial polysaccharides”, *Trends Biotechnol.*, 16 (1998) 41-46.
- [87] Sutherland, I.W.: “Biofilmexopolysaccharides : A strong and sticky framework”, *Microbiology*, 147 (2001) 3-9.
- [88] Tallon, R.; Bressollier, P.; Urdaci, M.: “Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56”, *Research in Microbiology*, 154 (2003) 705-712.
- [89] Temiz, A.: “Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri”, *Hatiboğlu Yayınevi*, 3. baskı (2000).
- [90] van den Berg, D.J.C.; Robijn, G.W.; Janssen, A.C.; Giuseppin, M.L.F.; Vreeker, R.; Kamerling, J.P.; Vliegenthart, J.F.G.; Ledebor, A.M.; Verrips, T.: “Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide”, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 61 (1995) 2840-2844.
- [91] Ventosa, A.; Nieto, J. J.; Oren, A.: “Biology of moderately halophilic aerobic bacteria”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 (1998) 504-544.
- [92] Vreeland, R.H.; Hoshstein, L.I.: “The Biology of Halophilic Bacteria”, Ed:Boca Raton, *CRC Press*, (1993) 320.

- [93] Watnick, P.; Kolter, R.: “Biofilm city of microbes”, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 2675-2679.
- [94] Whistler, R.; Daniel, J.R.; 1990. “Functions of polysaccharides in foods”, In *Food Additives*, Ed.; Branen, A.L.; Davidson, P.M.; Salminen, S., Eds.; Marcel Dekker, Inc., New York, (1990) 395-423.
- [95] Williams, A.G.; Wimpenny, J.W.T.: “Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB11264 grown in continuous culture”, *J. Gen. Microbiol.*, 104 (1978) 47-57.
- [96] Yang, Z.: “Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties”, *Ph.D. Thesis*, University of Helsinki, (2000) Finland.
- [97] Yavuztürk, B.: “Ekstremofillerin Ülkemiz Çamaltı Tuzlasından İzole Edilmesi ve Tanılanması”, *Master tezi*, Marmara Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, (2005) 26.
- [98] Yoon, J.H.; Kang, K.H.; Park, Y.H.: “*Halobacillus salinus* sp. nov., isolated from a salt lake on the coast of the East Sea in Korea”, *Int. J. Syst. Microbiol.* 53 (2003) 687-693.

EK A

GLUKOZ KALİBRASYON GRAFİĞİ



Tablo A.1. Glukoz kalibrasyon grafiği

EK B

In-silico.com

In silico PCR amplification

Genome : Escherichia coli CFT073
Start position : 4442846
End position : 4444345
Length : 1500

Primer 1 -> 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'
Primer 2 -> 5'-ACCTTGTTACGACTT-3'

AGAGTTTGAT CATGGCTCAG ATTGAACGCT GCGGCAGGC CTAACACATG
CAAGTCGAAC 60
GGTAACAGAA AGCAGCTTGC TGCTTTGCTG ACGAGTGGCG GACGGGTGAG
TAATGTCTGG 120
GAAACTGCCT GATGGAGGGG GATAACTACT GGAAACGGTA GCTAATACCG
CATAACGTCG 180
CAAGACCAAA GAGGGGGACC TTCGGGCCTC TTGCCATCGG ATGTGCCCAG
ATGGGATTAG 240
CTAGTAGGTG GGGTAAAGGC TCACCTAGGC GACGATCCCT AGCTGGTCTG
AGAGGATGAC 300
CAGCCACACT GGAAGTGA CACGGTCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG
TGGGGAATAT 360
TGCACAATGG GCGCAAGCCT GATGCAGCCA TGCCGCGTGT ATGAAGAAGG
CCTTCGGGTT 420
GTAAAGTACT TTCAGCGGGG AGGAAGGGAG TAAAGTTAAT ACCTTTGCTC
ATTGACGTTA 480
CCCGCAGAAG AAGCACCGGC TAACTCCGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG
GAGGGTGCAA 540
GCGTTAATCG GAATTACTGG GCGTAAAGCG CACGCAGGCG GTTTGTTAAG
TCAGATGTGA 600
AATCCCCGGG CTCAACCTGG GAACTGCATC TGATACTGGC AAGCTTGAGT
CTCGTAGAGG 660
GGGGTAGAAT TCCAGGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT CTGGAGGAAT
ACCGGTGGCG 720
AAGGCGGCCC CCTGGACGAA GACTGACGCT CAGGTGCGAA AGCGTGGGGA
GCAAACAGGA 780
TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCGTAAAC GATGTCGACT TGGAGGTTGT
GCCCTTGAGG 840
CGTGGCTTCC GGAGCTAACG CGTTAAGTCG ACCGCCTGGG GAGTACGGCC
GCAAGGTTAA 900
AACTCAAATG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT
AATTCGATGC 960
AACGCGAAGA ACCTTACCTG GTCTTGACAT CCACGGAAGT TTTCAGAGAT
GAGAATGTGC 1020
CTTCGGGAAC CGTGAGACAG GTGCTGCATG GCTGTCGTCA GCTCGTGTTG
TGAAATGTTG 1080

GGTTAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTTA TCCTTTGTTG CCAGCGGTCC
GGCCGGGAAC 1140
TCAAAGGAGA CTGCCAGTGA TAAACTGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA
GTCATCATGG 1200
NCCTTACGAC CAGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGCGCAT ACAAAGAGAA
GCGACCTCGC 1260
GAGAGCAAGC GGACCTCATA AAGTGCGTCG TAGTCCGGAT TGGAGTCTGC
AACTTCGACT 1320
CCATGAAGTC GGAATCGCTA GTAATCGTGG ATCAAAATGC CACGGTGAAT
ACGTTCCCGG 1380
GCCTTGTACA CACCGCCCGT CACACCATGG GAGTGGGTTG CRAAAGAAGT
AGGTAGATTA 1440
ACCTTAGGGA GGGTGCTTAC CACTTTGTGA TTTATGAGTT GGGGTAAGTC
GTAACAAGGT 1500

In silico PCR amplification

Genome : Escherichia coli CFT073
Start position : 2992344
End position : 2993341
Length : 998

Primer 1 -> 5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'

Primer 2 -> 5'-ACCTTGTTACGACTT-3'

ACCTTGTTAC GACTTCACCC CAGTCATGAA TCACAAAGTG GTAAGCGCCC
TCCCGAAGGT 60
TAAGCTACCT ACTTCTTTTG CAACCCACTC CCATGGTGTG ACGGCGGTGT
GTACAAGGCC 120
CGGGAAAGTA TTCACCGTGG CATTCTGATC CACGATTACT AGCGATTCCG
ACTTCATGGA 180
GTCGAGTTGC AGACTCCAAT CCGACTACGA CGCACTTTAT GAGGTCCGCT
TGCTCTCGCG 240
AGGTCGCTTC TCTTTGTATG CGCCATTGTA GCACGTGTGT AGCCCTGGTC
GTAAGGGCCA 300
TGATGACTTG ACGTCATCCC CACCTTCCTC CAGTTTATCA CTGGCAGTCT
CCTTTGAGTT 360
CCCGGCCGGA CCGCTGGCAA CAAAGGATAA GGGTTGCGCT CGTTGCGGGA
CTTAACCCAA 420
CATTTACAA CACGAGCTGA CGACAGCCAT GCAGCACCTG TCTCACGGTT
CCCGAAGGCA 480
CATTCTCATC TCTGAAAAC TCCGTGGATG TCAAGACCAG GTAAGGTTCT
TCGCGTTGCA 540
TCGAATTAAA CCACATGCTC CACCGCTTGT GCGGGCCCCC GTCAATTCAT
TTGAGTTTAA 600
ACCTTGCGGC CGTACTCCCC AGGCGGTCTGA CTTAACGCGT TAGCTCCGGA
AGCNACGCCT 660
CAAGGGCACA ACCTCCAAGT CGACATCGGT TTACGGCGTG GACTACCAGG
GTATCTTAAT 720
CCTGTTTGCT CCCCCACGCT TTCGCACCTG AGCGTCAAGT CTTNGTCCAG
GGGGCCGCCT 780
TCGCCACCGG TATTCCTCCA GATCTCTACG CATTTACCG CTACACCTGG
AATTCTACCC 840

CCCTCTACGA GACTCAAGCT TGCCAGGTAT CAGAYCCAGT TCCCAGGTTG
AGCCCGGGGA 900
TTTCACATCT GACTTAACAA ACCAGCCTGC GTGCGCTTTA CGCCCAGGTA
ATTCCGATTA 960
ACGGCTTGCA CCCTCCGTAT TACCGCGGCT GCTGGCAC

In silico PCR amplification

Genome : Halobacterium sp. NRC-1
Start position : 1875505
End position : 1876423
Length : 919

Primer 1 -> 5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3'

Primer 2 -> 5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3'

TTCCGGTTGA TCCTGCCGGA GGCCATTGCT ATCGGAGTCC GATTTAGCCA
TGCTAGTTGT 60
GCGGGTTTAG ACCCGCAGCG GAAAGCTCAG TAACACGTGG CCAAGCTACC
CTGTGGACGG 120
GAATACTCTC GGGAAACTGA GGCTAATCCC CGATAACGCT TTGCTCCTGG
AAGGGGCAAA 180
GCCGGAACG CTCCGGCGCC ACAGGATGCG GCTGCGGTCG ATTAGGTAGA
CGGTGGGGTA 240
ACGGCCCACC GTGCCCATAA TCGGTACGGG TTGTGAGAGC AAGAGCCCGG
AGACGGAATC 300
TGAGACAAGA TTCCGGGCCC TACGGGGCGC AGCAGGCGCG AAACCTTTAC
ACTGTACGAA 360
AGTGCGATAA GGGGACTCCG AGTGTGAAGG CATAGAGCCT TCACTTTTGT
ACACCGTAAG 420
GTGGTGCACG AATAAGGACT GGGCAAGACC GGTGCCAGCC GCCGCGGTAA
TACCGGCAGT 480
CCGAGTGATG GCCGATCTTA TTGGGCCTAA AGCGTCCGTA GCTGGCTGAA
CAAGTCCGTT 540
GGGAAATCTG TCCGCTTAAC GGGCAGGCGT CCAGCGGAAA CTGTTTCAGCT
TGGGACCGGA 600
AGACCTGAGG GGTACGTCTG GGGTAGGAGT GAAATCCTGT AATCCTGGAC
GGACCGCCGG 660
TGGCGAAAGC GCCTCAGGAG AACGGATCCG ACAGTGAGGG ACGAAAGCTA
GGGTCTCGAA 720
CCGATTAGA TACCGGGTA GTCCTAGCTG TAAACGATGT CCGCTAGGTG
TGGCGCAGGC 780
TACGAGCCTG CGCTGTGCCG TAGGGAAGCC GAGAAGCGGA CCGCCTGGGA
AGTACGTCTG 840
CAAGGATGAA ACTTAAAGGA ATTGGCGGGG GAGCACTACA ACCGGAGGAG
CCTGCGGTTT 900
AATTGGACTC AACGCCGGA

EK C

MÜ1 İZOLATININ 16S rDNA DİZİSİ

3'TTGACGCTGG CGGCAGGCCT AACACATGCA AGTCGAGCGG AAACGATCCT
AGCTTGCTAG 60
GAGGCGTCGA GCGGCGGACG GGTGAGTAAT GCATAGGAAT CTGCCCCGGTA
GTGGGGGATA 120
ACTTGAGGAA ACTCAAGCTA ATACCGCATA CGCCCCAAGG GGGAAAGCAG
GGGATCTTCG 180
GACCTTGCGC TATCGGATGA GCCTATGTCG GATTAGCTAG TTGGTGAGGT
AATGGCTCAC 240
CAAGGCCGCG ATCCGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACATCGGGA
CTGAGACACG 300
GCCCCAACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGCGA
AAGCCTGATC 360
CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAGGCCTT CGGGTTGTAA AGCACTTTCA
GCGAGGAAGA 420
ACNGCTTGCG GGTAAATACC CCGCAAGAAG GACATCACTC GCAGAAGAAG
CACCGGCTAA 480
CTCCGTGCCA GCNAGCCGCG GTAATACGGA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA
ATTACTGGGC 540
GTAAAGCGCG CGTAGGCGGC TTGATAAGCC GGTTGTGAAA GCCCCGGGCT
CAACCTGGGA 600
ACGGCATCCG GAACTGTCAG GCTAGAGTGC AGGAGAGGAA GGTAGAATTC
CCGGTGTAGC 660
GGTGAAATGC GTAGAGATCG GGAGGAATAC CAGTGGCGAA GGCGGCCTTC
TGGACTGACA 720
CTGACGCTGA GGTGCGAAAG CGTGGGTAGC AAACAGGATT AGATACCCTG
GTAGTCCACG 780
CCGTAAACGA TGTCGACTAG CCGNTGGGGT CCTCGAGACC TTTGTGGCGC
AGTTAACGCG 840
ATAAGTCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGTAAAA CTCAAATGAA
TTGACGGGGG 900
CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGATGCAA CGCGAAGAAC
CTTACCTACT 960
CTTGACATCG AGCGAACNTT CCAGAGATGG ATNGGTGCCT TCGGGAACGC
TCAGACAGGT 1020
GCTGCATGGC CGTCGTCAGC TCGTGTGTG AAATGTTGGG TTAAGTCCCG
TAACGAGCGC 1080
AACCTTGTC CCTATTTGCC AGCGATTCGG TCGGGAAGTC TAGGGAGACT
GCCGGTGAC 1140
AAACCGGAGG AAGGTGGGGA CGACGTCAGG TCATCATGGC CCTTACGAGT
AGGGCTACAC 1200
ACGTGCTACA ATGGCCGGTA CAATGGGCTG CCAATCCCGC GAGGGGGAGC
TAATCTCATA 1260
AAGCCGGTCT CAGTCCGGAT CGGAGTCTGC AACTCGACTC CGTGAAGTCG
GAATCGCTAG 1320
TAATCGTGCA TCAGAATGGC ACGGTGAATA CGTTCCCGGG CCTTGTACAC
ACCGCCCGTC 1380
ACACCATGGG AGTGGACTGC ACCAGAAGTG GTTAGCCTAA CTTC 5'

MÜ2 İZOLATININ 16S rDNA DİZİSİ

3'GCGGCGGACG GGTGAGTAAT GCATAGGAAT CTGCCCCGTA GTGGGGGATA
ACTTGAGGAA 60
ACTCAAGCTA ATACCGCATA CGCCCCAAGG GGGAAAGCAG GGGATCTTCG
GACCTTGCGC 120
TATCGGATGA GCCTATGTCG GATTAGCTAG TTGGTGAGGT AATGGCTCAC
CAAGGCCGCG 180
ATCCGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACATCGGGA CTGAGACACG
GCCCCAACTC 240
CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGCGA AAGCCTGATC
CAGCCATGCC 300
GCGTGTGTGA AGAAGGCCTT CGGGTTGTAA AGCACTTTCA GCGAGGAAGA
ACGCTTGTGG 360
GTTAATACCC CGCAAGAAGG ACATCACTCG CAGAAGAAGC ACCGGCTAAC
TCCGTGCCAG 420
CAGCCGCGGT AATACGGAGG GTGCAAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT
AAAGCGCGCG 480
TAGCGGTTGT GAAAGCCCCG GGCTCAACCT GGGAACGGCA TCCGGAACTG
TCAGGCTAGA 540
GTGCAGGAGA GGAAGGTAGA ATTCCCGGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG
ATCGGGAGGA 600
ATACCAGTGG CGAAGGCGGC CTTCTGGACT GACACTGACG CTGAGGTGCG
AAAGCGTGGG 660
TAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGATGTCGA
CTAGCCGTTG 720
GGGTCTCGA GACCTTTGTG GCGCAGTTAA CGCGATAAGT CGACCGCCTG
GGGAGTACGG 780
CCGCAAGGTT AAAACTCAAA TGAATTGACG GGGGCCCCGA CAAGCGGTGG
AGCATGTGGT 840
TTAATTGAT GCAACGCGAA GAACCTTACC TACTCTTGAC ATCGAGCGAA
CTTTCCAGAN 900
ATGGATTGGT GCCTTNGGGA ACGCTCAGAC AGGTGCTGCA TGGCNGTCGT
CAGCTCGTGT 960
TGTGAAATGT TGGGTAAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCCTATT
TGCCAGCGAT 1020
TCGGTCGGGA ACTNTAGGGA GACTGCCGGT GACAAACCGG AGGAAGGTGG
GGACGACGTC 1080
AGGTCATCAT GGCCCTTACG AGTAGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCCG
GTACAATGGG 1140
CTGCAATCCC GCGAGGGGGA GCTAATCTCA TAAAGCCGGT CTCAGTCCGG
ATCGGAGTCT 1200
GCAACTCGAC TCCGTGAAGT CGGAATCGCT AGTAATCGNG CATCAGAATG
GCNCGGTGAA 1260
TACGTTCCCG GGCCTTGAC ACNCCGCCCC TCACACCATG GGAGTG 5'

MÜ6 İZOLATININ 16S rDNA DİZİSİ

3'TCGAGCGGAA ACGATCCTAG CTTGCTAGGA GCGTCGAGC GCGGACGGG
TGAGTAATGC 60
ATAGGAATCT GCCCGGTAGT GGGGGATAAC TTGAGGAAAC TCAAGCTAAT
ACCGCATACG 120
CCCCAAGGGG GAAAGCAGGG GATCTTCGGA CCTTGCGCTA TCGGATGAGC
CTATGTCGGA 180
TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA TGGCTCACCA AGGCCGCGAT CCGTAGCTGG
TCTGAGAGGA 240
TGATCAGCCA CATCGGGACT GAGACACGGC CCGAACTCCT ACGGGAGGCA
GCAGTGGGGA 300
ATATTGGACA ATGGGCGAAA GCCTGATCCA GCCATGCCGC GTGTGTGAAG
AAGGCCTTCG 360
GGTTGTAAAG CACTTTCAGC GAGGAAGAAC GCTTGTGGGT TAATACCCCG
CAAGAAGGAC 420
ATCACTCGCA GAAGAAGCAC CGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA
TACGGAGGGT 480
GCAAGCGTTA ATCGGAATTA CTGGGCGTAA AGCGCGCGTA GGCGGCTTGA
TAAGCCGGTT 540
GTGAAAGCCC CGGGCTCAAC CTGGGAACGG CATCCGGAAC TGTCAGGCTA
GAGTGCAGGA 600
GAGGAAGGTA GAATTCCCGG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG AGATCGGGAG
GAATACCAGT 660
GGCGAAGGCG GCCTTCTGGA CTGACACTGA CGCTGAGGTG CGAAAGCGTG
GGTAGCAAAC 720
AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGATGTC GACTAGCCGT
TGGGGTCCTC 780
GAGACCTTTG TGGCGCAGTT AACGCGATAA GTCGACCGCC TGGGGAGTAC
GGCCGCAAGG 840
TTAAAACTCA AATGAATTGA CGGGGGCCCG CACAAGCGGT GGAGCATGTG
GTTTAATTCG 900
ATGCAACGCG AAGAACCTTA CCTACTCTTG ACATCGAGCG AACTTTCCAG
AGATGGATTG 960
GTGCCTTCGG GAACGCTCAG ACAGGTGCTG CATGGCCGTC GTCAGCTCGT
GTTGTGAAAT 1020
GTTGGGTAA GTCCCGTAAC GAGCGCAACC CTTGTCCCTA TTTGCCAGCG
ATTCGGTCGG 1080
GAACTCTAGG GAGACTGCCG GTGACAAACC GGAGGAAGGT GGGGACGACG
TCAGGTCATC 1140
ATGGCCCTTA CGAGTAGGGC TACACACGTG CTACAATGGC CGGTACAATG
GGCTGCAATC 1200
CCGCGAGGGG GAGCTAATCT CATAAAGCCG GTCTCAGTCC GGATCGGAGT
CTGCAACTCG 1260
ACTCCGTGAA GTCGGAATCG CTAGTAATCG TGCATCAGAA TGGCACGGTG
AATACGTTCC 1320
CGGGCCTTGT ACACACCGCC 5'

MÜ12 İZOLATI İÇİN 16S rDNA DİZİSİ

3'GGGCGGNTGT ACAAGGCCCG GGAACGTATC ACCGTGCCAT TCTGATGCAC
GATTACTAGC 60
GATTCCGACT TCACGGAGTC GAGTTGCAGA CTCCGATCCG GACTGAGACC
GGCTTTATGA 120
GATTAGCTCC CCCTCGCGGG ATTGCAGCCC ATTGTACCGG CCATTGTAGC
ACGTGTGTAG 180
CCCTACTCGT AAGGGCCATG ATGACCTGAC GTCGTCCCCA CCTTCCTCCG
GTTTGTACACC 240
GGCAGTCTCC CTAGAGTTCC CGACCGAATC GCTGGCAAAT AGGGACAAGG
GTTGCGCTCG 300
TTACGGGACT TAACCCAACA TTTCACAACA CGAGCTGACG ACGGCCATGC
AGCACCTGTC 360
TGAGCGTTCC CGAAGGCACC AATCCATCTC TGGAAAGTTC GCTCGATGTC
AAGAGTAGGT 420
AAGGTTCTTC GCGTTGCATC GAATTAAACC ACATGCTCCA CCGCTTGTGC
GGGCCCCCGT 480
CAATTCATTT GAGTTTTAAC CTTGCGGCCG TACTCCCCAG GCGGTCGACT
TATCGCGTTA 540
ACTGCGCCAC AAAGGTCTCG AGGACCCCAA CGGCTAGTCG ACATCGTTTA
CGGCGTGGAC 600
TACCAGGGTA TCTAATCCTG TTTGCTACCC ACGCTTTCGC ACCTCAGCGT
CAGTGTCACT 660
CCAGAAGGCC GCCTTCGCCA CTGGTATTCC TCCCGATCTC TACGCATTTT
ACCGCTACAC 720
NGGGAATTCT ACCTTCCTCT CCTGCACTCT AGCCTGACAG TTCCGGATGC
CGTTCCCAGG 780
TTGAGCCCCG GGCTTTCACA ACCGGCTTAT CAAGCCGCCT ACGCGCGCTT
TACGCCCAGT 840
AATTCGATT AACGCTTGCA CCCTCCGTAT TACCGCGGCT GCTGGCACGG
AGTTAGCCGG 900
TGCTTCTTCT GCGAGTGATG TCCTTCTTGC GGGGTATTAA CCCACAAGCG
TTCTTCCTCG 960
CTGAAAGTGC TTTACAACCC GAAGGCCTTC TTCACACACG CGGCATGGCT
GGATCAGGCT 1020
TTCGCCCAT GTCCAATATT CCCCACTGCT GCCTCCCGTA GGAGTTCGGG
CCGTGTCTCA 1080
GTCCCGATGT GGCTGATCAT CCTCTCAGAC CAGCTACGGA TCGCGGCCTT
GGTGAGCCAT 1140
TACCTACCA ACTAGCTAAT CCGACATAGG CTCATCCGAT AGCGCAAGGT
CCGAAGATCC 1200
CCTGCTTTC CCCTTGGGGC GTATGCGGTA TTAGCTTGAG TTTCTCAAG
TTATCCCCCA 1260
CTACCGGGCA GATTCCTATG CATTACTCAC CCGTCCGCCG CTCGACGCCT
CCTA 5'

MÜ14 İZOLATININ 16S rDNA DİZİSİ

3'AGGCGTCGAG CGGCGGACGG GTGAGTAATG CATAGGAATC TGCCCGGTAG
TGGGGGATAA 60
CTTGAGGAAA CTCAAGCTAA TACCGCATAC GCCCAAGGG GGAAAGCAGG
GGATCTTCGG 120
ACCTTGCGCT ATCGGATGAG CCTATGTCGG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA
ATGGCTCACC 180
AAGGCCGCGA TCCGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC ACATCGGGAC
TGAGACACGG 240
CCCGAACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC AATGGGCGAA
AGCCTGATCC 300
AGCCATGCCG CGTGTGTGAA GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA GCACTTTCAG
CGAGGAAGAA 360
CGCTTGTGGG TTAATACCCC GCAAGAAGGA CATCACTCGC AGAAGAAGCA
CCGGCTAACT 420
CCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGGAGGG TGCAAGCGTT AATCGGAATT
ACTGGGCGTA 480
AAGCGCGCGT AGGCGGCTTG ATAAGCCGGT TGTGAAAGCC CCGGGCTCAA
CCTGGGAACG 540
GCATCCGGAA CTGTCAGGCT AGAGTGCAGG AGAGGAAGGT AGAATTCCCG
GTGTAGCGGT 600
GAAATGCGTA GAGATCGGGA GGAATACCAG TGGCGAAGGC GGCCTTCTGG
ACTGACACTG 660
ACGCTGAGGT GCGAAAGCGT GGGTAGCAAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA
GTCCACGCCG 720
TAAACGATGT CGACTAGCCG TTGGGGTCCT CGAGACCTTT GTGGCGCAGT
TAACGCGATA 780
AGTCGACCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG GTTAAAACTC AAATGAATTG
ACGGGGGGCCC 840
GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC GATGCAACGC GAAGAACCTT
ACCTACTCTT 900
GACATCGAG CGAACTTTCC AGAGATGGAT TGGTGCCTTC GGAACGCTC
AGACAGGTGC 960
TGCATGGCCG TCGTCAGCTC GTGTTGTGAA ATGTTGGGTT AAGTCCCGTA
ACGAGCGCAA 1020
CCCTTGTCCT ATTTGCCAGC GATTCGGTCG GGAActCTAG GGAGACTGCC
GGTGACAAAC 1080
CGGAGGAAGG TGGGGACGAC GTCAGGTCAT CATGGCCCTT ACGAGTAGGG
CTACACACGT 1140
GCTACAATGG CCGGTACAAT GGGCTGCAAT CCCGCGAGGG GGAGCTAATC
TCATAAAGCC 1200
GGTCTCAGTC CGGATCGGAG TCTGCAACTC GACTCCGTGA AGTCGGAATC
GCTAGTAATC 1260
GTGCATCAGA ATGGCACGGT GAA 5'

MÜ19 İZOLATININ 16S rDNA DİZİSİ

3'CGCGTCCGAC GAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ATGCATAGGA ATCTGCCCCG
TAGTGGGGGA 60
TAACTTGAGG AAACCTCAAGC TAATACCGCA TACGCCCCAA GGGGGAAAGC
AGGGGATCTT 120
CCGACCTTGC GCTATCGGAT GAGCCTATGT CGGATTAGCT AGTTGGTGAG
GTAATGGCTC 180
ACCAAGGCCG CGATCCGTAG CTGGTCTGAG AGGATGATCA GCCACATCGG
GACTGAGACA 240
CGGCCCCAAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGGAATATTG GACAATGGGC
GAAAGCCTGA 300
TCCAGCCATG CCGCGTGTGT GAAGAAGGCC TTCGGGTTGT AAAGCACTTT
CAGCGAGGAA 360
GAACGCTTGT GGGTTAATAC CCNGCAAGAA GGACATCACT CGCAGAAGAA
GCACCGGCTA 420
ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGGA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA
ATTACTGGGC 480
GTAAAGCGCG CGTAGGCGGC TTGATAAGCC GGTTGTGAAA GCCCCGGGCT
CAACCTGGGA 540
ACGGCATCCG GAACTGTCAG GCTAGAGTGC AGGAGAGGAA GGTAGAATTC
CCGGTGTAGC 600
GGTGAAATGC GTAGAGATCG GGAGGAATAC CAGTGGCGAA GGCGGCCTTC
TGGACTGACA 660
CTGACGCTGA GGTGCGAAAG CGTGGGTAGC AAACAGGATT AGATACCCTG
GTAGTCCACG 720
CCGTAAACGA TGTCGACTAG CCGTTGGGGT CCTCGAGACC TTTGTGGCGC
AGTTAACGCG 780
ATAAGTCGAC CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGTAAAA CTCAAATGAA
TTGACGGGGG 840
CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGATGCAA CGCGAAGAAC
CTTACCTACT 900
CTTGACATCG AGCGAACCAT CCAGAGATGG ATGGGTGCCT TCGGGAACGC
TCAGACAGGT 960
GCTGCATGGC CGTCGTCAGC TCGTGTGTG AAATGTTGGG TTAAGTCCCG
TAACGAGCGC 1020
AACCCTTGTC CCTATTTGCC AGCGATTCGG TCGGGAAGTC TAGGGAGACT
GCCGGTGACA 1080
AACCGGAGGA AGGTGGGGAC GACGTCAGGT CATCATGGCC CTTACGAGTA
GGGCTACACA 1140
CGTGCTACAA TGGCCGGTAC AATGGGCTGC AATCCCGCGA GGGGGAGCTA
ATCTCATAAA 1200
GCCGGTCTCA GTCCGGATCG GAGTCTGCAA CTCGACTCCG TGAAGTCGGA
ATCGCTAGTA 1260
ATCGTGCATC AGAATGGCAC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAC
CGCCCGTCAC 1320
ACCATGGGAG TGGACTGCAC CAGAAGTGGT TAGCC 5'

MÜ21 İZOLATININ 16S rDNA DİZİSİ

3'TCGAGCGGAA CGATCCTAGC TTGCTAGGAG GCGTCGAGCG GCGGACGGGT
GAGTAATGCA 60
TAGGAATCTG CCCGGTAGTG GGGGATAACT TGAGGAAACT CAAGCTAATA
CCGCATACGC 120
CCCAAGGGGG AAAGCAGGGG ATCTTCGGAC CTTGCGCTAT CGGTGAGCCT
ATGTCGGATA 180
GCTAGTTGGT GAGGTAATGG CTCACCAAGG CCGCGATCCG TAGCTGGTCT
GAGAGGATGA 240
TCAGCCACAT CGGGACTGAG ACACGGCCCG AACTCCTACG GGAGGCAGCA
GTGGGGAATA 300
TTGGACAATG GCGGAAAGCC TGATCCAGCC ATGCCGCGTG TGTGAAGAAG
GCCTTCGGGT 360
TGTAAGCAC TTTCAGCGAG GAAGAACGCT TGTGGGTAA TACCCGCAA
GAAGGACATC 420
ACTCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACCTCCG GCCAGCAGCC GCGGTAATAC
GGAGGGTGCA 480
AGCGTTAATC GGAATTACTG GCGGTAAAGC GCGCGTAGGC GGCTTGATAA
GCCGGTTGTG 540
AAAGCCCCGG GCTCAACCTG GGAACGGCAT CCGGAACTGT CAGGCTAGAG
TGCAGGAGAG 600
GAAGGTAGAA TTCCCGGTGT AGCGGTGAAA TGCGTAGAGA TCGGGAGGAA
TACCACTGGC 660
GAAGGCGGCC TTCTGGACTG AACTGACGC TGAGGTGCGA AAGCGTGGGT
AGCAAACAGG 720
ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA CGATGTGCGAC TAGCCGTTGG
GGTCCTCGAG 780
ACTTTGTGG CGCAGTTAAC GCGATAAGTC GACCGCCTGG GGAGTACGGC
CGCAAGGTTA 840
AAACTCAAAT GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT
TAATTGATG 900
CAACGCGAAG AACCTTACCT ACTCTTGACA TCGAGCGAAC TTTCCAGAGA
TGGATTGGTG 960
CCTTCGGGAA CGCTCAGACA GGTGCTGCAT GGCCGTCGTC AGCTCGTGTT
GTGAAATGTT 1020
GGGTAAAGTC CCGTAACGAG CGCAACCCTT GTCCCTATTT GCCAGCGATT
CGGTCGGGAA 1080
CTCTAGGGAG ACTGCCGGTG ACAAACCGGA GGAAGGTGGG GACGACGTCA
GGTCATCATG 1140
GCCCTTACGA GTAGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGCCGG TACAATGGGC
TGCAATCCCG 1200
CGAGGGGGAG CTAATCTCAT AAAGCCGGTC TCAGTCCGGA TCGGAGTCTG
CAACTCGACT 1260
CCGTGAAG 5'

BG1 İZOLATININ 16S rDNA DİZİSİ

3'AACTACCCTA CAGAGAACGA TAACCTCGGG AAAGTGGAGC TAATAGTTCA
TACGGGAGTC 60
ATGCTGGAAT GCCGACTCCC CGAAACGCTC AGGCGCTGTA GGATGTGGCT
GCGGCCGATT 120
AGGTAGACGG TGGGGTAACG GCCCACCCTG CCGATAATCG GTACGGGTTG
TGAGAGCAAG 180
AGCCCGGAGA CGGAATCTGA GACAAGATTC CGGGCCCTAC GGGGCGCAGC
AGGCGCGAAA 240
CCTTTACACT GCACGCAAGT GCGATAAGGG GACCCCAAGT GCGAGGGCAT
ATAGTCCTCG 300
CTTTTCTCGA CTGTAAGGCG GTCGAGGAAT AAGAGCTGGG CAAGACCGGT
GCCAGCCGCC 360
GCGGTAAATAC CGGCAGCTCA AGTGATGACC GATATTATTG GGCCTAAAGC
GTCCGTAGCC 420
GGCCACGAAG GTTCATCGGG AAATCCGCCA GCTCAACTGG CGGGCGTCCG
GTGAAAACCA 480
CGTGGCTTGG GACCGGAAGG CTCGAGGGGT ACGTCCGGGG TAGGAGTGAA
ATCCCGTAAT 540
CCTGGACGGA CCACCGATGG CGAAAGCACC TCGAGAAGAC GGATCCGACG
GTGAGGGACG 600
AAAGCTAGGG TCTCGAACCG GATTAGATAC CCGGGTAGTC CTAGCTGTAA
ACGATGCTCG 660
CTAGGTGTGA CACAGGCTAC GAGCCTGTGT TGTGCCGTAG GGAAGCCGAG
AAGCGAGCCG 720
C 5'

BG5 İZOLATININ 16S rDNA DİZİSİ

3'AGACGGAATC TGAGACAAGA TTCCGGGCCC TACGGGGCG CAGCAGGCGC
GAAACCTTTA 60
CACTGCACGC AAGTGCGATA AGGGGACCCC AAGTGCGAGG GCATATAGTC
CTCGCTTTTCT 120
CGACTGTAAG GCGGTCGAGG AATAAGAGCT GGGCAAGACC GGTGCCAGCC
GCCGCGGTAA 180
TACCGGCAGC TCAAGTGATG ACCGATATTA TTGGGCCTAA AGCGTCCGTA
GCCGGCCACG 240
AAGGTTATC GGGAAATCCG CCAGCTCAAC TGGCGGGCGT CCGGTGAAAA
CCACGTGGCT 300
TGGGACCGGA AGGCTCGAGG GGTACGTCCG GGGTAGGAGT GAAATCCCGT
AATCCTGGAC 360
GGACCACCGA TGGCGAAAGC ACCTCGAGAA GACGGATCCG ACGGTGAGGG
ACGAAAGCTA 420
GGGTCTCGAA CCGGATTAGA TACCCGGGTA GTCCTAGCTG TAAACGATGC
TCGCTAGGTG 480
TGACACAGGC TACGAGCCTG TGTTGTGCCG TAGGGAAGCC GAGAA 5'

BG6 İZOLATININ 16S rDNA DİZİSİ

3'AACTACCCTA CAGAGAACGA TAACCTCGGG AAAGTGGAGC TAATAGTTCA
TACGGGAGTC 60
ATGCTGGAAT GCCGACTCCC CGAAACGCTC AGGCGCTGTA GGATGTGGCT
GCGGCCGATT 120
AGGTAGACGG TGGGGTAACG GCCCACCCTG CCGATAATCG GTACGGGTTG
TGAGAGCAAG 180
AGCCCGGAGA CGGAATCTGA GACAAGATTC CGGGCCCTAC GGGGCGCAGC
AGGCGCGAAA 240
CCTTTACACT GCACGCAAGT GCGATAAGGG GACCCCAAGT GCGAGGGCAT
ATAGTCCTCG 300
CTTTTCTCGA CTGTAAGGCG GTCGAGGAAT AAGAGCTGGG CAAGACCGGT
GCCAGCCGCC 360
GCGGTAATAC CGGCAGCTCA AGTGATGACC GATATTATTG GGCCTAAAGC
GTCCGTAGCC 420
GGCCACGAAG GTTCATCGGG AAATCCGCCA GCTCAACTGG CGGGCGTCCG
GTGAAAACCA 480
CGTGGCTTGG GACCGGAAGG CTCGAGGGGT ACGTCCGGGG TAGGAGTGAA
ATCCCGTAAT 540
CCTGGACGGA CCACCGATGG CGAAAGCACC TCGAGAAGAC GGATCCGACG
GTGAGGGACG 600
AAAGCTAGGG TCTCGAACCG GATTAGATAC CCGGGTAGTC CTAGCTGTAA
ACGATGCTCG 660
CTAGGTGTGA CACAGGCTAC GAGCCTGTGT TGTGCCGTAG GGAA 5'

BG13 İZOLATININ 16S rDNA DİZİSİ

3'CGGCTTCCCT ACGGCACAAC ACAGGCTCGT AGCCTGTGTC ACACCTAGCG
AGCATCGTTT 60
ACAGCTAGGA CTACCCGGGT ATCTAATCCG GTTCGAGACC CTAGCTTTTCG
TCCCTCACCG 120
TCGGATCCGT CTTCTCGAGG TGCTTTCGCC ATCGGTGGTC CGTCCAGGAT
TACGGGATTT 180
CACTCCTACC CCGGACGTAC CCCTCGAGCC TTCCGGTCCC AAGCCACGTG
GTTTTACCG 240
GACGCCCGCC AGTTGAGCTG GCGGATTTCG CGATGAACCT TCGTGGCCGG
CTACGGACGC 300
TTTAGGCCCA ATAATATCGG TCATCACTTG AGCTGCCGGT ATTACCGCGG
CGGCTGGCAC 360
CGGTCTTGCC CAGCTCTTAT TCCTCGACCG CCTTACAGTC GAGAAAAGCG
AGGACTATAT 420
GCCCTCGCAC TTGGGGTCCC CTTATCGCAC TTGCGTGCAG TGTAAGGTT
TCGCGCCTGC 480
TGCGCCCCGT AGGGCCCGGA ATCTTGTCTC AGATTCCGTC TCCGGGCTCT
TGCTCTCACA 540
ACCGTACCG ATTATCGGCA CGGTGGGCCG TTACCCACAC GTCTACCTAA
TCGGCCGCAG 600
CCACATCCTA CAGCGCCTGA GCGTTTCGGG GAGTCGGCAT TCCAGCATGA
CTCCCGTATG 660
AACTATTAGC CTCAGTTTCC CGAGGTATC GTTCTCTG 5'

EK D. Örnek ABI Kromatogram Çıktıları

**BIO
TRACE**

BioEdit version 7.0.4.1 (2/13/05)

Model 3100
KB.bcp
6278250-02 6286207-01 6278003-02 6258005-00
Lane 1

File: ACH_YENI2_2006-02-24.BG6f.ab1

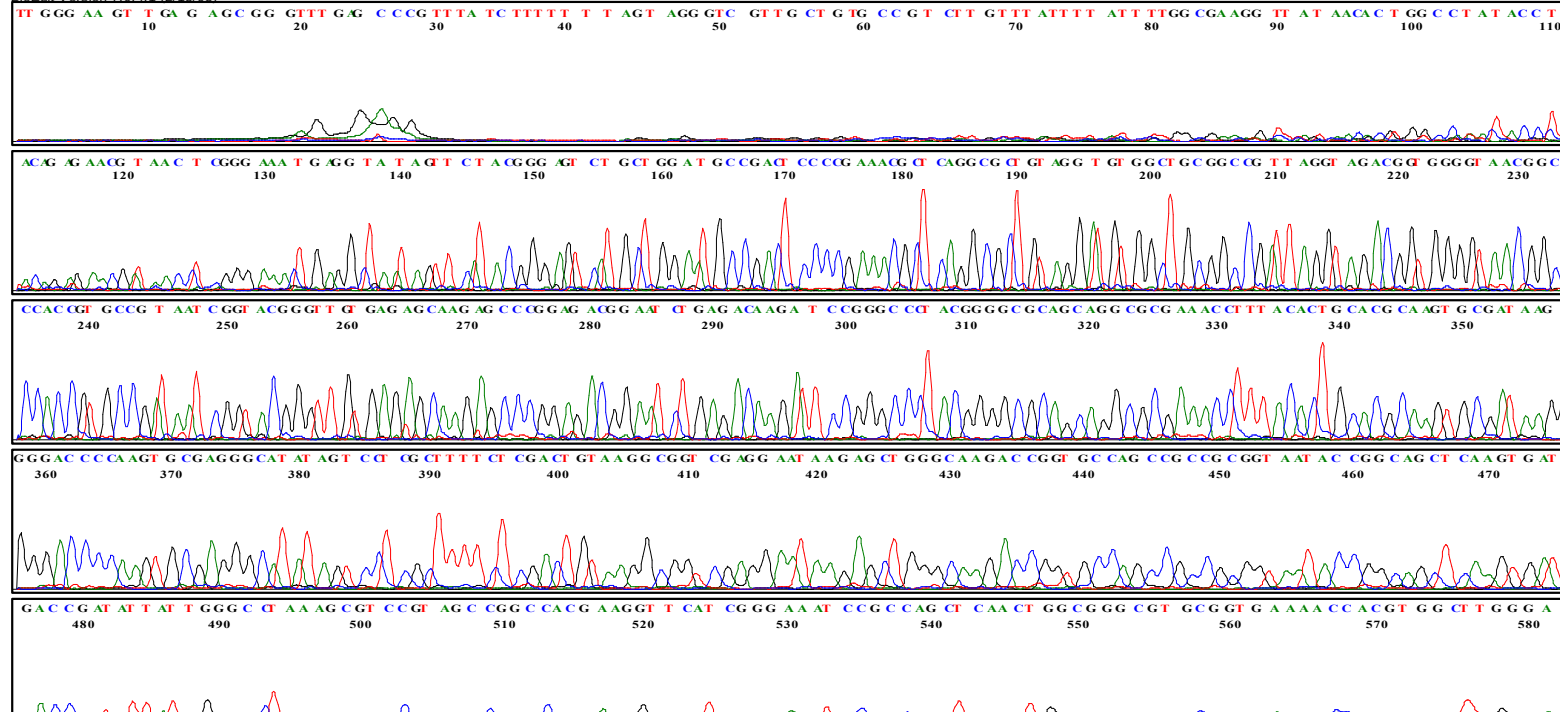
ebru

6278003-02 6258005-00

Lane 1

Signal G:1249 A:1436 T:790 C:820
KB_3130_POP7_BDTV3.mob
?? no 'MTXF' field
Points 1532 to 12314

Page 1 of 2
2/24/2006
Spacing: 12,5479078292847



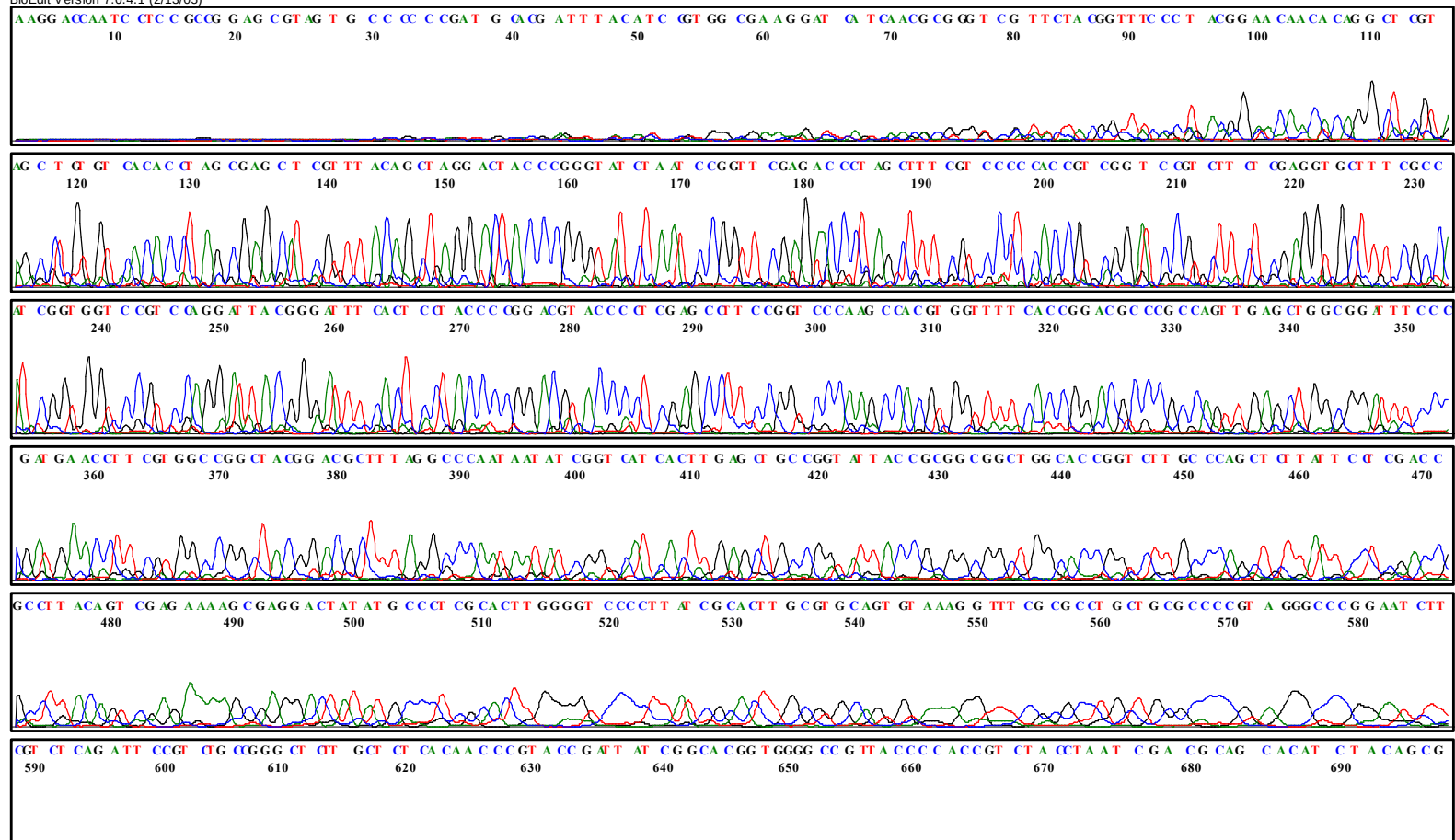


BioEdit version 7.0.4.1 (2/13/05)

Model 3100 File: ACH_YENI2_2006-02-24.BG6r.ab1
KB.bcp ebru
6278250-02 6286202-01 6278003-02 6258005-00
Lane 2

Signal G:1277 A:1615 T:1478 C:1078
KB_3130_POP7_BDTv3.mob
?? no 'MTXF' field
Points 2008 to 13257

Page 1 of 2
2/24/2006
Spacing: 12,6468563079834



EK E

Arkea İzolatlarının Büyüme Değerleri

Tablo.E.1. 37°C’de Arkea İzolatlarının Haloarcula Besi Yerinde Ölçülen OD_{660nm} Değerleri

Zaman(gün)	BG1	BG5	BG6	BG13
2	0.00	0.01	0.00	0.01
3	0.00	0.13	0.00	0.01
5	0.00	5.09	0.01	0.00
6	0.01	9.70	0.01	0.00
7	0.00	15.58	0.02	0.01
8	0.00	17.04	0.03	0.01

Tablo.E.2 39°C’de Arkea İzolatlarının Brown(1963) ve Haloarcula Besi Yerlerinde Ölçülen OD_{660nm} Değerleri

İzolat İsmi	BG1		BG5		BG6		BG13	
Zaman(gün)	B.B	H.B.	B.B.	H.B	B.B.	H.B.	B.B.	H.B.
2	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.88	0.00
3	0.01	0.00	0.02	0.02	0.02	0.00	1.48	0.00
5	0.01	0.00	0.05	1.60	0.05	0.01	2.24	0.00
6	0.01	0.00	1.55	5.47	0.08	0.02	2.18	0.00
7	0.01	0.00	3.01	7.35	0.09	0.00	2.05	0.00
8	0.01	0.00	4.28	12.70	0.19	0.04	1.97	0.01

ÖZGEÇMİŞ

30.10.1982 tarihinde Ankara’da dünyaya geldim. Lise eğitimimi Ankara Çankaya Lisesi (YDAL)’nde tamamladım. 2000 yılında Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nde lisans eğitimime başladım ve 2004 yılında lisans eğitimimi tamamladım. Aynı yıl Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı Biyokimya Bölümü’nde yüksek lisans eğitimime başladım ve halen yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.