

**TUZ GÖLÜ BAKTERİLERİNİN
KARAKTERİZASYONU
VE
MEVSİMSEL DAĞILIMI**

Mehmet Burçin MUTLU
Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos-2006

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41016**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mehmet Burçin MUTLU'nun “**Tuz Gölü Bakterilerinin Karakterizasyonu Ve Mevsimsel Dağılımı**” başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki Doktora Tezi 2006 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof.Dr. Kıymet GÜVEN	
Üye	: Prof.Dr. Merih KIVANÇ	
Üye	: Prof.Dr. İsmail KARABOZ	
Üye	: Doç.Dr. Yağmur TUNALI	
Üye	: Yard. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU	

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

TUZ GÖLÜ BAKTERİLERİNİN KARAKTERİZASYONU VE MEVSİMSEL DAĞILIMI

MEHMET BURÇİN MUTLU

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Kıymet GÜVEN

2006, 191 sayfa

Bu çalışmada Tuz Gölü bakterilerinin karakterizasyonu ve bunların mevsimsel dağılımlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gölün 5 farklı noktasından Ağustos 2003-Ekim 2005 tarihleri arasında örnekleme yapılmıştır. Farklı besiyerleri kullanılarak 122 adet aerobik halofilik bakterinin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu izolatların bazı biyokimyasal ve antibiyotiklere karşı hassasiyet testleri yapılmıştır. Bazı izolatların toplam hücre protein profilleri SDS-PAGE ile çıkarılarak buradan oluşturulan benzerlik dendogramları, referans halofillerle ve kendi aralarındaki ilişkinin ortaya konmasında kullanılmıştır.

Farklı koloni morfolojisine sahip olan izolatlardan 25 tanesi seçilerek bunların 16S rRNA dizi analizlerine göre identifikasyonları gerçekleştirilmiş ve bunların Archaea domaininden *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum* ve *Halomicrobium* ve Bacteria domaininden *Chromohalobacter* genusuna ait oldukları belirlenmiştir.

Mayıs 2005, Temmuz 2005 ve Ekim 2005 örneklerinde ise kültür bağımsız testlerle komünite analizine yönelik çalışmalar olan floresan in situ hibridizasyon (FISH), denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) ve 16S rRNA klonları ile gen kütüphanesi oluşturulması metodları uygulanmıştır. FISH çalışmaları ile Bacteria üyelerinden *Salinibacter*'in Tuz Gölündeki varlığı ilk defa olarak ortaya konmuştur. DAPI boyamaları ile örneklerdeki Archaea, Bacteria ve toplam hücre sayıları açığa çıkarılmıştır.

DGGE yöntemi ile Archaea jelinden *Haloquadra walsbyi*, *Archaeoglobus profundus*, *Halorubrum* sp., *Halobacterium saccharovororum* ve *Halorubrum orientalis*, Bacteria jelinden ise *Cytophaga* sp., *Salinibacter ruber* ve Halophilic eubacterium EHB-2 varlığı ilk defa olarak bildirilmiştir. 16S rRNA kütüphanesi çalışmasıyla da dizi analizleri sonrası Archaea klonları arasında *Haloquadra walsbyi*, *Halosimplex carlsbadense*, *Haloterrigena thermotolerans* ve *Halorubrum* sp., Bacteria klonları için *Salinibacter ruber* strain POLA 13, *Salinibacter ruber* strain POLA 18, *Halophilic eubacterium* EHB-2 ve *Halophilic eubacterium* EHB-4, *Halanaerobacter lacunarum*, *Acinetobacter baumannii* ve *Cytophaga* sp. varlığı ilk defa olarak ortaya konmuştur.

Göldeki baskın Archaea üyesi organizmanın *Haloquadra walsbyi* ve baskın Bacteria üyesinin *Salinibacter ruber* olduğunu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Tuz Gölü, Halofilik Archaea/Bacteria, FISH, DGGE, 16S rRNA Gen Kütüphanesi

ABSTRACT**PhD Thesis****CHARACTERIZATION and SEASONAL VARIATIONS of TUZ LAKE
BACTERIA****MEHMET BURÇİN MUTLU****Anadolu University Graduate School of Sciences****Biology Programme****Supervisor: Prof.Dr. Kıymet GÜVEN****2006, 191 pages**

In this study, characterization and seasonal variations of Tuz Lake bacteria were investigated.

Sampling of the lake was carried out between August 2003 and October 2005 at five different points. A total of 122 aerobic strains were isolated by using different media and biochemical tests and antibiotic resistance were performed. Whole cell protein patterns of some of the isolates were obtained by SDS-PAGE and these profiles were used to produce similarity dendograms and to compare the relation between strains.

25 strains differed in colony morphology were chosen for identification with 16S rRNA sequence. Some of the isolates were identified as *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum* and *Halomicrobium* spp. in Archaea domain and *Chromohalobacter* in Bacteria domain.

May 2005, July 2005 and October 2005 samples were analysed by using culture independent methods such as fluoresceine in situ hybridization (FISH), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and 16S gene library. *Salinibacter ruber* in Tuz Lake was recorded for the first time by using FISH. Archaea, Bacteria and total microorganism numbers were found by using DAPI stainings.

DGGE showed the existence of *Haloquadra walsbyi*, *Archaeoglobus profundus*, *Halorubrum* sp., *Halobacterium saccharovorum* and *Halorubrum orientalis* in Archaea domain, and *Cytophaga* sp., *Salinibacter ruber* ve halophilic eubacterium EHB-2 in Bacteria domain for the first time. Sequence analysis of 16S rRNA clones also showed the existence of Archaeal *Haloquadra walsbyi*, *Halosimplex carlsbadense*, *Haloterrigena thermotolerans* and *Halorubrum* sp., and Bacterial *Salinibacter ruber* strain POLA 13, *Salinibacter ruber* strain POLA 18, *Halophilic eubacterium* EHB-2, *Halophilic eubacterium* EHB-4, *Halanaerobacter lacunarum*, *Acinetobacter baumannii* and *Cytophaga* sp for the first time.

It has been showed that *Haloquadra walsbyi* is the dominant Archaeal organism and *Salinibacter ruber* is the dominant Bacterial organism in Tuz Lake.

Keywords: Tuz Lake, Halophilic Archaea/Bacteria, FISH, DGGE, 16S rRNA Gene Library

TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun seçiminde bana önderlik eden ve araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar, tecrübesi ve bilgileriyle her türlü yardım ve katkılarını benden esirgemeyen, olaylara her zaman farklı açılarla bakabilme yeteneği ve yapılabilecek olanın en iyisini başarma yönündeki tutumuyla her zaman örnek almaya çalıştığım değerli tez hocam Sayın Prof.Dr. Kıymet GÜVEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Erasmus öğrenci değişim programı ile 6 aylık bir süre için bulunduğum Alicante Üniversitesi, İspanya'da, çalışmamın son bölümünü tamamlama fırsatını bana sunan ve laboratuvarını açan Dr. Josefa Anton'a ve oradaki çalışmalarım sırasında bana her türlü yardımı gösteren çalışma arkadaşlarım Dr. Manuel Martinez Garcia, Fernando Santos, Arantxa Pena ve Cristina Lopez'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezim boyunca bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan ve desteğini her zaman hissettiren eski bölüm başkanımız ve değerli hocam Sayın Prof.Dr. Merih KIVANÇ'a ve bölüm başkanımız Sayın Prof.Dr.Ersin YÜCEL'e teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Yard.Doç.Dr. Sulhi ÖZKÜTÜK, Arş.Gör. Nesil ERTORUN, Arş.Gör. Volkan KILIÇ ve Arş.Gör. Harun BÖCÜK'e ve kayınpederim Sayın Hidayet YAMAN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardım ve dayanışmalarından ötürü tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Verdikleri eğitim ve anlayışla bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm çalışmam boyunca yaptığı yardımlar, fedakarlıklar ve özellikle de gösterdiği sabır dolayısıyla eşim Nalan MUTLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
 1. GİRİŞ	 1
1.1. Hipersalin Çevreler ve Tuz Gölü.....	2
1.1.1. Büyük Tuz Gölü, Utah.....	3
1.1.2. Ölü Deniz (The Dead Sea).....	4
1.1.3. Solar Tuzlalar.....	4
1.1.4. Afrika ve Asya'daki Alkalın Hipersalin Göller.....	5
1.1.5. Tuz Gölü ve Özellikleri.....	6
1.2. Halofilik Mikroorganizmalar.....	10
1.2.1. Halofilik Mikroorganizmaların Hücresel Yapıları.....	14
1.2.1.1. Archaea.....	14
1.2.1.2. Bacteria.....	21
1.3. Halofilik Prokaryotların İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	25
1.3.1. İzolasyon.....	25
1.3.2 İdentifikasyon.....	26
1.4. Halofilik Mikroorganizmaların Taksonomisine Bakış.....	28
1.4.1. Halofilik Archaea.....	28
1.4.1.1. <i>Halobacteriales</i> Takımı.....	30
1.4.2. Halofilik Ve Halotolerant Bacteria.....	57
1.4.2.1. <i>Salinibacter ruber</i>	59
1.4.2.2. <i>Chromohalobacter marismortui</i>	60
1.4.3. Halofilik Ve Halotolerant <i>Eucarya</i>	60
1.5. Mikrobiyal Kommünite Analizleri.....	61

1.5.1. 16S rRNA Geni ve Önemi.....	61
1.5.2. 16S rRNA Geni Üzerinden Mikrobiyal Kommünite Analizleri.....	64
1.5.2.1. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH).....	67
1.5.2.2. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE).....	67
1.5.2.3. Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA).....	70
1.5.2.4. Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA (RAPD).....	70
1.6. Halofilik ve Halotolerant Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Potansiyelleri ve Uygulama Alanları.....	71
1.6.1. Halofilik Archaea ile Uygulamalar.....	73
1.6.1.1. Fermente Yiyeceklerin Hazırlanmasında Halofilik Archaea.....	73
1.6.1.2. Halofilik Archaea'nın Biyodegradatif Potansiyeli.....	74
1.6.1.3. Solar Tuz Üretiminde Halofilik Archaea'nın Rolü.....	74
1.6.1.4. Bakteriyorodopsinin Biyoteknolojik Uygulamaları.....	74
1.6.1.5. Halofilik Archaea ile Biyopolimer Üretimi.....	76
2. MATERYAL ve METOD	78
2.1. Materyal.....	78
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	78
2.1.1.1. Medyum A.....	78
2.1.1.2. Medyum B.....	78
2.1.1.3. Medyum C.....	79
2.1.1.4. Medyum D.....	79
2.1.1.5. Medyum E.....	79
2.1.1.6. %12 MGM (Modifiye Geliştirme Medium).....	80
2.1.1.7. %18 MGM (Modifiye Geliştirme Medium).....	80
2.1.1.8. %23 MGM (Modifiye Geliştirme Medium).....	81
2.1.1.9. %25 MGM (Modifiye Geliştirme Medium).....	81
2.1.1.10. Luria Bertani (LB) Besiyeri.....	81
2.1.1.11. Fermentasyon Ortamı (g/l).....	82
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler.....	83

2.1.2.1. %5 Deniz Suyu (SW)) (g/l).....	83
2.1.2.2. %10 Deniz Suyu (SW)) (g/l).....	83
2.1.2.3. %15 Deniz Suyu (SW)) (g/l).....	84
2.1.2.4. %20 Deniz Suyu (SW)) (g/l).....	84
2.1.2.5. %25 Deniz Suyu (SW)) (g/l).....	84
2.1.2.6. %30 Deniz Suyu (SW)) (g/l).....	85
2.1.2.7. %25 lik Tuzlu Su Çözeltisi.....	85
2.1.2.8. %30 luk Tuzlu Su Çözeltisi.....	86
2.1.2.9. TAE 50X (bir litre için).....	86
2.1.2.10. TBE 5X.....	86
2.1.2.11. PBS 10X.....	87
2.1.2.12. Elektroforez için Yükleme Tamponu (6X).....	87
2.1.2.13. Lizozim Solüsyonu (10 mg/ml).....	87
2.1.2.14. %80'lik DGGE Stok Solusyonu.....	88
2.1.2.15. %0'lık DGGE Stok Solusyonu.....	88
2.1.2.16. %10 Amonyum persülfat Solusyonu.....	88
2.1.2.17. %10 SDS Solusyonu.....	88
2.1.2.18. In situ hibridizasyon Tamponu.....	89
2.1.2.19. FISH için Yıkama Tamponu.....	89
2.2. METOD.....	90
2.2.1. Çalışma Alanlarının Seçimi.....	90
2.2.2. Örneklerin Toplanması.....	91
2.2.3. Örneklerdeki Toplam Tuz Değerlerinin ve İyonik Kompozisyonlarının Belirlenmesi.....	91
2.2.3.1. Örneklerin Toplam Tuzluluk Değerlerinin Belirlenmesi.....	91
2.2.3.2. Örneklerin pH Değerlerinin Belirlenmesi.....	92
2.2.4. Su Örneklerinden Archaea ve Bacteria İzolasyonu ve Kültüre Alınmaları.....	92
2.2.5. İdentifikasyon.....	93
2.2.5.1 Morfolojik ve Biyokimyasal Testler.....	93
2.2.5.2 Antibiyotiklere Duyarlılık Testi.....	94
2.2.5.3 Polar Lipid Analizleri.....	95

2.2.5.4 Toplam Hücre Proteinlerinin Eldesi ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) ile Analizi.....	95
2.2.5.5. Nükleik asit analizine dayalı testler.....	98
2.2.6. Halofilik Mikrobiyal Kommunité Analizleri.....	101
2.2.6.1. Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu.....	101
2.2.6.2. 16S rRNA Gen Kütüphanesi Oluşturulması (16S rRNA Genlerinin Klonlanması, Klonların Seçimi ve Klonlardan Dizi Analizleri).....	102
2.2.6.3. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE).....	110
2.2.6.4. Fluoresan in situ Hibridizasyon (FISH).....	115
3. BULGULAR	118
3.1. Çalışma Alanı.....	118
3.2. Örneklerdeki Toplam Tuz Değerlerinin ve İyonik Kompozisyonlarının Belirlenmesi.....	119
3.2.1. Örneklerin Toplam Tuzluluk Değerlerinin Belirlenmesi.....	119
3.2.2. Örneklerin pH Değerlerinin Belirlenmesi.....	119
3.3. Su Örneklerinden Archaea ve Bacteria İzolasyonu ve Kültüre Alınmaları.....	120
3.4. İdentifikasyon.....	122
3.4.1 Morfolojik ve Biyokimyasal Testler.....	122
3.4.2. Antibiyotiklere Duyarlılık Testi.....	127
3.4.3. Polar Lipid Analizleri.....	131
3.4.4. Toplam Hücre Proteinlerinin Eldesi ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Analizi.....	133
3.4.5. Nükleik asit analizine dayalı testler.....	135
3.5. Halofilik Mikrobiyal Kommunité Analizleri.....	140
3.5.1. Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu.....	140
3.5.2. 16S rRNA Gen Kütüphanesi Oluşturulması (16S rRNA Genlerinin Klonlanması, Klonların Seçimi ve Klonlardan Dizi Analizleri).....	141

3.5.3. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE).....	148
3.5.4. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH).....	155
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	160
5. KAYNAKLAR	184

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Tuz Gölü'nün genel özellikleri.....	7
1.2. %10 ve üzerindeki tuz konsantrasyonlarında gelişebilen farklı domainlerdeki mikroorganizmaların filogenetik dağılımı.....	12
1.3. Kültür edilmiş ekstrem halofillerin dağılımını temsil eden soy ağacı.....	13
1.4. Üçgen ve kare şekilli halofilik hücreler.....	15
1.5. Şekil 1.4. Flagellumlu <i>Haloarcula quadrata</i>	17
1.6. Halofilik Archaealarda gaz vezikülleri.....	19
1.7. <i>Haloferax mediterranei</i> hücrelerindeki depo materyalleri.....	20
1.8. Eukaryot ve Prokaryotlardaki Ribozom Genel Yapısı.....	63
1.9. “rRNA yaklaşımı”.....	66
2.1. Örnekleme alanları.....	90
2.2. Gölden örnek alımı.....	91
2.3. pCR2.1 vektörü.....	103
3.1. Örnekleme alanları.....	118
3.2. Farklı pigmentasyona sahip izolatların agar üzerindeki görüntüleri.....	121
3.3. Farklı pigmentasyona sahip izolatların agar üzerindeki görüntüleri.....	121
3.4. Modifiye Gram boyama işlemi sonrası Gram negatif olarak boyanmış çubuk şekilli hücreler.....	123
3.5. Orsinol Ferrik Klorid reagent spreyleneip, 150 °C’de ısıtılması sonrasında oluşan glikolipid spotları.....	132
3.6. Plak üzerine Moybdenum Blue reagent spreylendikten sonra oluşan mavi renkli spotlar fosfolipidler.....	132
3.7. Sırası ile izolatlar: 17, 22, 36, 41, 44, 57, 64, 69, 71, 85, 88, M:Marker.....	133
3.8. Referans halofilik bakterilerin SDS-PAGE ile ortaya konmuş toplam hücre proteinleri.....	133
3.9. Tuz Gölü izolatlarının SDS-PAGE analizi sonrası elde edilen benzerlik dendogramı.....	134
3.10. Tuz Gölü izolatları ve referans halofillerin SDS-PAGE analizi sonrası elde edilen benzerlik dendogramı.....	135
3.11. 16S rRNA geni amplifikasyon ürünleri.....	137

3.12. Su örneklerinden DNA ekstraksiyonu sonrası Mayıs (1.çukur) ve Temmuz (2.çukur) 2005 örneklerine ait DNA'lar ve marker.....	140
3.13. Klonların seçimi için insert büyüklüklerinin kontrolü amacıyla yapılan PCR sonrası elde edilen jel.....	141
3.14. HinfI enzimi ile kesim sonrası %2'lik agaroz jelde yürütülmüş olan örnekler.....	142
3.15. Mbo I enzimi ile kesim sonrası %2'lik agaroz jelde yürütülmüş olan örnekler.....	143
3.16. %2'lik agaroz jelde HinfI ve MboI ile kesim yapılmış aynı set örnekler.....	144
3.17. Plazmid izolasyonu işlemi sonrası (Bacteria klonlarının) %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.....	145
3.18. Archaea ve Eukarya DGGE analizleri için yapılan PCR ları takiben elde edilen jel görüntüsü.....	148
3.19. Bacteria DGGE analizleri için yapılan PCR ları takiben elde edilen jel görüntüsü.....	149
3.20. Tuz Gölü Mayıs, Temmuz (A ve E) ve Ekim 2005 aylarına ait örneklerinden Archaea için yapılan DGGE analizi ve reamplifikasyon için seçilen bantlar.....	150
3.21. Tuz Gölü Mayıs, Temmuz (A ve E) ve Ekim 2005 aylarına ait örneklerinden Bacteria için yapılan DGGE analizi ve reamplifikasyon için seçilen bantlar.....	151
3.22. Tuz Gölü Mayıs (1), Temmuz (A (2) ve E (3)) ve Ekim (4) 2005 aylarına ait örneklerinden Eukarya için yapılan DGGE analizi.....	153
3.23. Archaea jelinden üretilmiş olan benzerlik dendogramı.....	154
3.24. Bacteria jelinden üretilmiş olan benzerlik dendogramı.....	154
3.25. Eukarya jelinden üretilmiş olan benzerlik dendogramı.....	155
3.26. Arc915 probu ile hibridizasyon sonrası ışığa veren Archaea hücreleri....	157
3.27. Eub 338 probu ile hibridizasyon sonrası ışığa veren Bacteria hücreleri...	157
3.28. Eub 338 probu ile hibridizasyon sonrası ışığa veren Bacteria hücreleri...	158
3.29. EHB 1451 probu ile hibridizasyon sonrası ışığa veren <i>Salinibacter</i> hücreleri.....	158

3.30. EHB 1451 probu ile hibridizasyon sonrası ışıma veren <i>Salinibacter</i> hücreleri.....	159
4.1. Karışık mikrobiyal populasyonların genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde kullanılan farklı moleküler yaklaşımlar.....	169
4.2. <i>E.coli</i> 16S rRNA'sının in situ uygunluğunu gösteren harita.....	178

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Büyük Tuz Gölünün sahip olduğu iyonların konsantrasyonları.....	3
1.2. Ölü Denizin ortalama iyon değerleri.....	4
1.3. Tuz Gölü suyunun diğer tuzlu göllerin sularıyla iyonları yönünden karşılaştırılması.....	8
1.4. Hipersalin Çevrelerden İzole Edilmiş Olan Archaea Üyeleri Taksonomisi ve Optimum Tuz Aralıkları.....	28
1.5. Hipersalin Çevrelerden İzole Edilmiş Olan Bacteria Üyeleri Taksonomisi ve Optimum Tuz Aralıkları.....	58
1.6. Halofilik Archaea, Bacteria ve Eukarya'nın kullanıldığı en önemli biyoteknolojik uygulamalar.....	72
1.7. Bakteriyorodopsinin potansiyel biyoteknolojik kullanım alanları.....	75
2.1. SDS-PAGE analizi yapılan referans mikroorganizmalar ve bunların kaynakları.....	96
2.2. Çalışmamızda kullanılan primerler.....	108
2.3. Çalışmada Kullanılan FISH Problarının Özellikleri.....	116
3.1. Örneklerin Arazide Ölçülen Toplam Tuzluluk ve pH Değerleri.....	119
3.2. Örneklerdeki canlı bakteri sayısı (cfu/ml).....	122
3.3. İzolatların farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişme durumları.....	123
3.4. İzolatların farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetleri.....	128
3.5. 16S rRNA ürünlerine göre izolatların ait oldukları domain.....	137
3.6. Genel olarak analizi yapılan izolatların gen bankasındaki en yakın temsalcileri, benzerlik oranları ve izolat sayısı.....	139
3.7. Archaea ve Bacteria klonlarının dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın gen bankası temsalcileri.....	147
3.8.. Elde edilen DGGE bantları ve bunların gen bankasındaki en yakın karşılıkları.....	152
3.9. FISH yöntemi ile Tuz Gölü örneklerindeki Bacteria, Archaea, <i>Salinibacter</i> ve toplam hücre sayıları.....	156

1. GİRİŞ

Sodyum klorürün doyma noktasına yakın ya da doyma noktasında olduğu ortamlar hipersalin (aşırı derecede tuzlu) çevreler olarak adlandırılmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerindeki Büyük Tuz Gölü (Great Salt Lake) ve Ortadoğudaki Ölü Deniz (Dead Sea) bunların en tanınmışlarındandır.

Dünyada çok az benzeri olup, hipersalin (aşırı derecede tuzlu) çevreler sınıfına giren ve ülkemizin en büyük ikinci gölü olan Tuz Gölü'nün mikrobiyolojik olarak incelenerek sahip olduğu halofilik prokaryotik organizmaların tanımlanarak ortaya konması bu çalışmadaki başlıca amacı oluşturmaktadır.

Aşırı derecede halofilik bakteriler, ekstrem koşullara uyum göstermiş özel yapıları nedeniyle biyoteknoloji alanında çalışan bir çok araştırmacının ilgisini çeken organizmalardır. Aşırı tuzluluğa dayanıklı enzimleri, tuzluluğa karşı koyabilmek için kullandıkları stratejiler, zor şartlarda enerji üretimine olanak sağlayan özel proteinlerinin varlığı ve bunlar gibi kendilerine has olan özellikleri, onların biyoteknoloji alanında son derece değerli araçlar olarak görülmelerine yol açmaktadır. Bu nedenle aşırı derecede halofilik bakterilerin tanımlanması ve hücre yapılarının detaylı bir şekilde ortaya konması gerekmektedir.

Tuz Gölünde bulunan halofilik bakterilerin tanımlaması yapılırken bunların mevsimsel olarak farklılıklarını ortaya koymak için gölün 5 farklı noktasından Ağustos 2003'de başlayarak Ekim 2005'e kadar 12 defa örnek alınarak analiz edilmişlerdir. Bu sayede yıl boyunca göldeki bakteri popülasyonlarının kalitatif ve kantitatif olarak sergilenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, kültüre alınmış örneklerden Archaea ve Bacteria domainlerine ait bakteriler izole edilerek saflaştırılmış ve identifikasyonları için geleneksel identifikasyon testlerinin yanısıra nükleik asitlerin kullanımına dayalı yöntemler kullanılmıştır.

Kültür edilemeyen organizmalar Floresan in situ hibridizasyon (FISH), denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) ve 16S gen kütüphanesi gibi farklı moleküler metodlar kullanılarak belirlenmiştir. Tuz Gölü mikrobiyal komünite analizleri ilk defa bu çalışma ile ortaya konmaktadır.

Bu çalışmada tanımlanan izolatlar sahip oldukları benzersiz sistemleri (bakteriosinleri, enzimleri, pigmentleri) nedeniyle çeşitli biyoteknolojik araştırmalarda kullanılma potansiyeline sahiptirler.

1.1. Hipersalin Çevreler ve Tuz Gölü

Hipersalin çevreler “Thalassohalin” ve “Athalassohalin” olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Thalassohalin çevreler deniz suyunun buharlaşmasından kaynaklanmaktadır ve iyonik kompozisyonları deniz suyunun özelliklerini yansıtmaktadır; Na^+ baskın katyon, Cl^- ana anyon ve bunu takiben SO_4^{2-} , hafif alkali veya nötral pH. Hipersalin deniz lagunları ve solar tuzla evaporasyon havuzları bu tip çevrelerdendir. Bununla beraber, deniz suyu evaporasyonla konsantre hale gelmeye başladığında, NaCl doyma noktasına ulaşmadan önce başka mineraller presipitasyona başlarlar. Bunlar CaCO_3 (kalsit veya aragonit olarak) ve $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (gypsum) u içerirler. Bu nedenle evaporasyon süreci içerisinde tuzlu suyun (brine) iyonik kompozisyonunda değişimler meydana gelir. Binlerce yıl önce dünya okyanuslarından kopup ayrılmış olduğundan, Utah’daki Büyük Tuz Gölü’nün sularının tuz kompozisyonu, deniz suyununkine benzerdir. Bu nedenle hala Thalassohalin olarak değerlendirilmektedir (Oren 2002).

Diğer birçok tuzlu su deniz suyundan oldukça farklı olan iyonik kompozisyona sahiptirler ve bunlar Athalassohalin çevreler olarak adlandırılmaktadırlar. Alkalın soda gölleri yüksek konsantrasyonda karbonat/bikarbonat içermekte ve pH değerleri 10-11 ya da daha fazla olabilmektedir. İsrail’deki Ölü Deniz hafif asidik bir göldür ve divalent katyonlar (Mg^{+2} , Ca^{+2}), monovalent katyonlardan (Na^+ , K^+) daha fazla bulunmaktadır. Klorid ve bromid baskın anyonlardır ve sülfat miktarı çok düşüktür. Dünyada başka birçok salin ve hipersalin athalassohalin göller mevcuttur ve bunların iyonik kompozisyonları değişiklik göstermektedir (Oren 2002).

1.1.1. Büyük Tuz Gölü, Utah

Büyük Tuz Gölü hipersalin, bir thalassohalin çöl gölüdür. Kuzey Amerika'nın büyük havzasında yer alır. Günümüzde yüzey alanı 3900 km²'dir. Jeolojik kanıtlar son 100.000 yıl içinde su seviyesinde dramatik artış ve azalmalar meydana geldiğini ve bunun da az tuzlu olan Banneville Gölü'nü yüksek tuzlu Büyük Tuz Gölü'ne çevirdiğini göstermektedir.

Sığ bir göldür. Maksimum derinliği 10 metre kadardır. Hava sıcaklığı kışın en düşük -30 °C, yazın en yüksek 48 °C olarak kaydedilmiştir. Okyanuslarla herhangi bir bağlantısı olmamasına rağmen, tuz kompozisyonu deniz suyununkine benzerdir ve bu nedenle suyu “thalassohaline” olarak sınıflandırılır. NaCl total tuzların %86'sını oluşturur. 1959'da gölü iki kısma bölen bir demiryolu geçidi göl üzerine inşa edilmiş ve bu zamana kadar ortalama 200 g/l tuzluluğa sahip olan göl suyu bundan sonra güney kısmın tatlı sularla daha çok beslenmesi nedeniyle güney kısımda 120 g/l, kuzey kısımda ise tuzluluğun artması ile 330 g/l tuzluluğa sahip olmuştur (Oren 2002).

Büyük Tuz Gölü'nün ana iyonlarının konsantrasyonları Tablo 1.1.'de gösterilmektedir.

İyon (g/l)	Güney Kısım	Kuzey Kısım
Na ⁺	35.9	105.4
Mg ⁺²	4.2	11.1
K ⁺	3.0	6.7
Ca ⁺²	0.2	0.3
Li ⁺	0.02	0.07
Cl ⁻	65.3	181.0
SO ₄ ⁻²	8.7	27.0
Br ⁻	0.09	0.2
B	0.02	0.03
HCO ₃ ⁻ +CO ₃ ⁻²	ND	0.72
Total Çözünmüş Tuz	117.43	332.53
pH	8.2	7.7

Tablo 1.1. Büyük Tuz Gölünün sahip olduğu iyonların konsantrasyonları

1.1.2. Ölü Deniz (The Dead Sea)

Ölü Deniz İsrail ve Ürdün arasında sınırda yer alan hipersalin çöl gölüdür. Gölün kıyı kısmı deniz seviyesinin 415 metre altında yer almaktadır. Bu nedenle dünyadaki en alçak yerdir ve en derin noktası (-730 metre) ise kıtasal en derin noktadır. Gölün yüzey alanı yaklaşık 760 km²'dir (Oren 1999; Oren 2002).

Gölün toplam tuz oranı ortalama 340 g/l dir. Suyunun iyonik kompozisyonu oldukça farklıdır ve deniz kökenli (thalassohaline) brine'lardan tamamen farklıdır. Ölü Deniz'in athalassohaline suları divalent katyonlarca domine edilmiştir. Tuzlu suyun yoğunluğu ortalama 1.237 g/cm³'tür (Oren 1999).

Ortalama iyon değerleri Tablo 1.2.' de gösterilmektedir.

İyon (mol/l)	
Na ⁺	1.594
Mg ⁺²	1.887
K ⁺	0.199
Ca ⁺²	0.436
Cl ⁻	6.33
SO ₄ ⁻²	0.005
Br ⁻	0.068
pH	6.0

Tablo 1.2. Ölü Denizin ortalama iyon değerleri

1.1.3. Solar Tuzlalar

Solar tuzlalar dünya çapında, tropik ve subtropik alanlarda yer alan ve deniz suyundan halit (NaCl) üretimi için yapılmış olan yapay ve sıg havuzlardır. Genellikle çoklu havuz sistemleri olarak kurulurlar. Deniz suyu ilk set havuzlara pompalanır ve belirli bir tuzluluğa ulaşınca kadar buharlaştırılırlar. Sonra su diğer bir seri havuzlara aktarılır ki her aşamada tuzluluğu artar. Sonunda halitin çöktüğü kristalize edici havuzlarda, NaCl ile doymuş brine elde edilir. Tuzluluğun deniz suyunun 2 ya da 3 kat fazlasına ulaştığı erken safhalarda CaCO₃, aragonit

ve/veya kalsit formunda presipite olur. Tuz konsantrasyonu deniz suyu konsantrasyonunun 4 katına çıktığında CaSO_4 çözünübilirlik limitine ulaşır ve bu toplu gipsum ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) presipitasyonu ile sonuçlanır. NaCl kristalleri (halit), total tuz konsantrasyonu 300 g/l üzerine çıktığında oluşur. NaCl'nin çoğu kristalize edici havuzların dibinde presipite olduktan sonra, konsantre olmuş brine temelde Mg^{+2} , K^+ , Cl^- ve SO_4^{-2} içermektedir. Bu tuzlu sular genellikle denize geri döndürülür ya da KCl veya diğer tuzların eldesi için işleme sokulurlar.

Çoklu havuzlu solar tuzlalar halofilik mikroorganizma çalışmaları açısından her zaman popüler olmuşlardır. Deniz suyundan halit saturasyonuna kadar tüm tuzluluk aralıklarını yansıtabilirler. Mikrobiyal komünite yoğunlukları genellikle yüksek olarak sayılır ve havuzlar en kolay ulaşılabilir örnekleme alanlarıdır (Oren 1999; Oren 2002).

1.1.4. Afrika ve Asya'daki Alkalın Hipersalin Göller

Alkalın hipersalin göllerin çoğu tropik veya subtropik kuşaklarda bulunur. Alkalın tuzlu brine'lar şu şartlarda oluşabilirler:

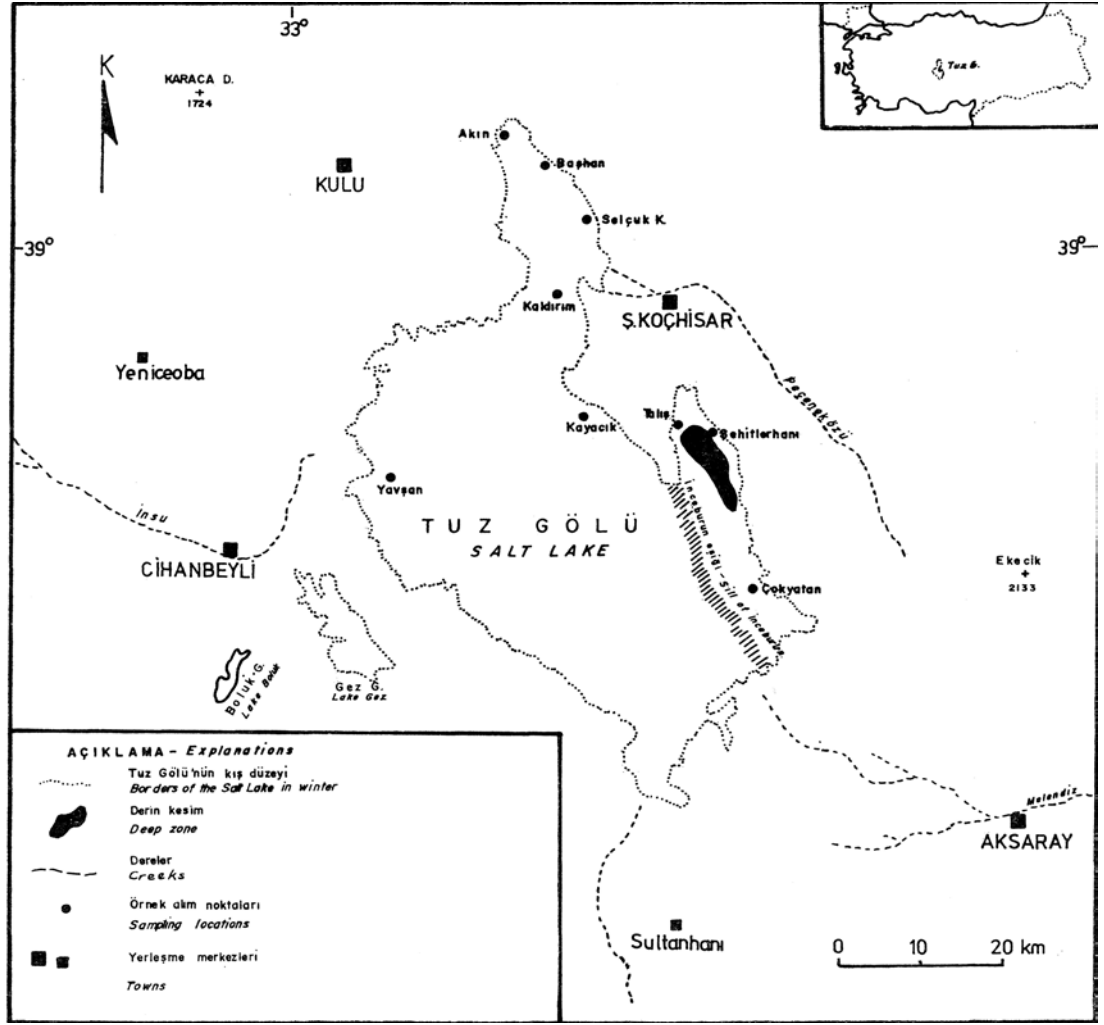
- a) Jeolojik oluşum alkalın su akıntılarının oluşumuna izin vermeli
- b) Topografi uygun olmalı, genellikle kapalı havzadan yüzey suyunun dışarı akışı engellenmiş olmalı
- c) İklim koşulları buharlaşma ile konsantrasyona elverişli olmalı

Böyle hipersalin soda göllerine Kenya'daki Magadi Gölü ve Doğu Afrika'daki bazı diğer göller, Wadi Natrun'un sığ gölleri, Çin ve Hindistan'daki soda gölleri, Kaliforniya'daki Mono Gölü örnek olarak gösterilebilir.

Na^+ , Cl^- , HCO_3^- ve CO_3^{-2} brine'daki majör iyonlardır. Sülfat konsantrasyonu thalassohaline brine'lara göre düşüktür. En ekstrem durumlarda (Magadi Gölü, Wadi Natrun'daki bazı göller) tuzluluk halit saturasyonuna kadar ulaşabilir ve karbonat konsantrasyonu çok yüksek olabilir. Böyle brine'ların pH'ı 10-11 hatta daha fazla olabilmektedir. Trona (sodyumseskekikarbonat, $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) böyle çevrelerde sıklıkla presipite olur (Oren 1999; Oren 2002).

1.1.5. Tuz Gölü ve Özellikleri

Tuz Gölü, İç Anadolu Bölgesinde Ankara, Konya ve Aksaray illeri sınırları içerisinde yer almaktadır. 1665 km² lik alanı ile Türkiye'nin ikinci büyük gölü olan Tuz Gölü (bu çalışmada sadece bu isimle anılacaktır) "karasal tuz tavaları (Salzpfannen)" ile "tuzlu göller" (Salz Seen) arasında mevsimsel bir geçiş tipini canlandıran bir karasal buharlaşma ortamıdır. En büyük uzunluğu 85 km, en büyük genişliği ise 45 km ye varır (Şekil 1). Yaklaşık 16.000 km² lik bir beslenme havzasına sahip olan Tuz Gölü'ne doğuda Peçeneközü ve Melendiz, batıda ise İncesu dereleri ulaşırlar. Dışarıya akımı yoktur. Gölün en derin yeri doğuda sürekli su altında bulunan kesimde yer alır, 1,5-2 m dolayındadır. Buna karşılık asıl göl kış-ilkbahar aylarında 60-80 cm derinlik göstermekte, yaz sonunda ise göl çoğunlukla kurumaktadır. Ancak gölün dengesi Konya ovasının fazla sularını ileten büyük bir kanalın açılmasıyla bozulduğundan, göl 1974 yılından bu yana tümüyle kurumamakta, tuz üretimi de son derece güçleşmektedir. Tuz Gölü'nün benzerleri olan Great Salt Lake-Utah, Owens Lake, Salton Sea, Searles Lake(A.B.D.) ile Ölü Deniz (İsrail), Magadii Lake (Kenya) gibi göller uzun yıllar boyunca gerek hidrolojik, gerekse jeokimya ve mineralojik yönlerden ayrıntılı olarak araştırılmışlardır. Tuz Gölü üzerine sağlıklı veriler ise oldukça azdır. Salamon-Calvi ve Kleinsorge (1939) göl suyunun kimyasını, Irion (1970, 1972, 1973) mineralojisini incelemişlerdir. Elektrik İşleri Etüt İdaresi (E.İ.E.) tarafından kaldırım tuzlasında su düzeyi ile Peçeneközü ve İncesu derelerinde debi ölçümleri yapılmaktadır. Devlet Meteoroloji İşleri Genel Müdürlüğü'nün de halen havzada yağış veya buharlaşma ölçümü yapan 8 istasyonu bulunmaktadır (Uygun ve ark. 1978; Çamur ve Mutlu 1995).



Şekil 1.1. Tuz Gölü'nün genel özellikleri (Uygun ve Şen 1978).

	Büyük Tuz				
	Tuz Gölü ¹	Ölü Deniz ²	Gölü ³	Searles G. ⁴	Deniz Suyu ⁵
	Salt Lake	Dead Sea	Salt Lake Great	Searles L.	Sea water
Na+	112.5 g/1	36.68 g/1	97.35 g/1	110.000 ppm	11 g/1
K+	1.2 "	6.70 "	8.18 "	26.000 "	0.35 "
Ca++	0.84 "	15.72 "	0.35 "	16 "	0.4 "
Mg++	3.4 "	39.40 "	11.38 "	—	1.3 "
HCO ₃	0.1 "	0.09 "	—	27.100 ppm	0.1 "
+ CO ₃					
Cl-	180.0 "	204.7 "	182.4 "	121.000 "	19.0 "
SO ₄ --	7.9 "	0.56 "	21.41 "	46.000 "	2.65 "
Li+	60 mg/1	17.5 mg/1	60 mg/1	81 "	0.2 mg/1
B	45 "	—	60 "	3.380 "	5 "
Br-	94 "	4.75 g/1	160 "	860 "	65 "
Sr++	13 "	0.31 "	5 ppm	—	7 "

- 1) Tuz Gölü, Kayacık, Haziran (June) 1976
- 2) Nissenbaum (1977),
- 3) Whelan (1973), Whelan ve Petersen (1977),
- 4) White ve diğerleri (1963).
- 5) Collins (1975).

Tablo 1.3. Tuz Gölü suyunun diğer tuzlu göllerin suları ile iyonları yönünden karşılaştırılması (Uygun ve Şen 1978)

Tuz Gölü çukuru, kenarlarında bükülme ve kırılma izleri bulunan tektonik kaynaklı bir depresyondur. Prof. Chajlu'ye göre gölün doğu kısmında Aksaray ile Paşa Dağı arasında uzanan arazide faylar ve fleksürler mevcuttur. Tuz Gölü havzası Üst Neogen'den sonra oluşan bir depresyondur. Gölün doğusundaki Eosen formasyona ait Ada çıkıntısı da bu çöküntü çanağının ortasında yükselen bir horst sayılmaktadır (İnandık 1955; Koday 1999).

Tuz Gölü depresyonunun çevresinde bulunan yeni depolara göre, Kuaterner esnasında gölün daha geniş bir yayılım sahası olduğu anlaşılmaktadır. Göl kenarlarında aynı zamanda daha yeni seviyelere ait ve bugünkü, gölden pek az yüksekte olan tıraş kırıntıları da mevcuttur. Bugün bir çok kesimlerde alüvyal ova görünümü veren eski göl tabanının alçak yerlerinde bir takım göller de görülmektedir. Bunların en büyüğü Tuz Gölü'nün 8 km batısında bulunan Gez (Tersakan) Gölü'dür (İnandık 1955).

Göl sulan kışın rüzgar yönüne bağlı olarak belirli bölümlere toplanmakta ve bu bölgelerde seviye kabarmalarına neden olmaktadır. Özellikle de kışın

poyraz, göl sularını güneye sürükleyerek buralarda su seviyesinin yükselmesine sebep olmaktadır. İlkbaharda ise güneyden esen lodos rüzgarları suyu kuzeye yığmaktadır(Koday 1999). Şerefli Koçhisar Tuz Gölü beslenme yetersizliği ve şiddetli buharlaşmadan dolayı yazın sonlarına doğru oldukça küçülür (İnandık 1955).

Tuz Gölü 'nün alanı mevsimden mevsime büyük bir değişikliğe uğramaktadır ve yaz aylarında göl kenarında çok özel bir görüntü oluşmaktadır. Suları çekilmiş gölün tabanının “Tuz Çölü” görünümünde olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Bu kesimler halofilik karakterdeki bitkilerin bile gelişmeye imkan bulamadıkları tuz alanlarıdır. (İnandık 1955).

Yaz ve kış ayları arasında 1-1.5 metrelik seviye farkı gösteren Tuz Gölü'nün büyük bir kısmı sıgıdır. Bu sıgı kısımlar yaz aylarında şiddetli buharlaşmadan dolayı tamamen kuruyarak 5-30 cm kalınlıkta tuz tabakası oluşturur (İnandık 1955; Koday 1999).

Kimyasal bileşimi bakımından bu tuz saf yemeklik tuzdur (NaCl). Bu göldeki sodyum klorür oranı, magnezyum klorür ve sodyum sülfat oranlarından çok yüksektir. Göldeki tuz birikiminin bir çok faktöre bağlı olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Göl çevresindeki jips ve tuz tabakaları içeren Oligosen formasyonunun bulunuşunun gölün tuzlulaşmasında önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (İnandık 1955). Başka bir görüşe göre, göldeki tuzun çok kurak bir iklim sonucunda yıllarca süren aşırı buharlaşma nedeniyle ortamda biriktiği ileri sürülmüştür. Ayrıca tuzluluğu, gölün tuzlu yüzey suları ile beslenmesine bağlayan veya göl tabanı kaynaklarından gelen tuzlu sulardan kaynaklandığını belirten görüşler de vardır. Yapılan araştırmalar bölgedeki göllerin, çevrelerinden gelen sular kadar bulundukları yerlerdeki suların da etkisi altında bileşimlerini kazandıklarını, buharlaşmaların ise göl sularındaki yabancı madde yoğunluğunun artmasında rol oynadığını belirtmişlerdir (Koday 1999).

Tuz Gölü yüzeyindeki 1200 km^2 'lik bir alanda tuz oluştuğu ve göldeki tuz miktarının 210 milyon ton olduğu ileri sürülmüştür. Göldeki NaCl oluşumu sebebinin, Neogen'den beri kapalı havza konumunda kalan göle uzun periyodik dönemler sonucunda gelen Na ve Cl iyonlarının devamlı birikmesi, uygun jeokimyasal şartlar altında kaya tuzu çökelişinin başlaması ve tabandaki dom ve

tuz duvarlarının tektonik hatlar boyunca tuzlu su getirmesi sonucu olduğu açıklanmıştır (Koday 1999).

Tuzlu göl sularından tuz üretimi, suların güneş altında buharlaşması sonucu tuzun kristalleşmesi esasına dayanmaktadır. Tuz Gölü'nde tuz yoğunluğu yüksek olduğundan tuz üretimi kolaylaşmaktadır ve tuz yaz mevsiminde kendiliğinden oluşmaktadır. Nisan ve Mayıs aylarında hava sıcaklıklarının artması nedeniyle suyun içindeki tuz oranı yükselmeye başlar ve Haziran ayından itibaren bu oran % 25'e ulaşır. Bu yükselme ile birlikte yoğunluk artarak, ham tuz çökmeye başlar ve Ağustos ayına kadar çökme devam eder. Bu ayda tuzun çöküp, kalan suların buharlaşmasıyla göl kurur ve 10-15 cm tuz tabakası oluşur. Gölden ham tuz üretimi de bu şekilde gerçekleşir.

Tuz Gölü'nün mikrobiyolojisi üzerine az sayıda çalışma vardır. Birbir ve ark. (2003), gölden izole ettikleri mikroorganizmaların biyokimyasal özelliklerine göre karakterizasyonlarını yapmışlardır. Kallı (2000) yaptığı çalışmada Tuz Gölünden izole ettiği organizmaların halofilik Archaea grubu organizmalar olabileceğini bildirmiş, fakat daha üst düzey teknikler kullanılarak bu verilerin doğrulanması gerektiğini belirtmiştir.

1.2. Halofilik Mikroorganizmalar

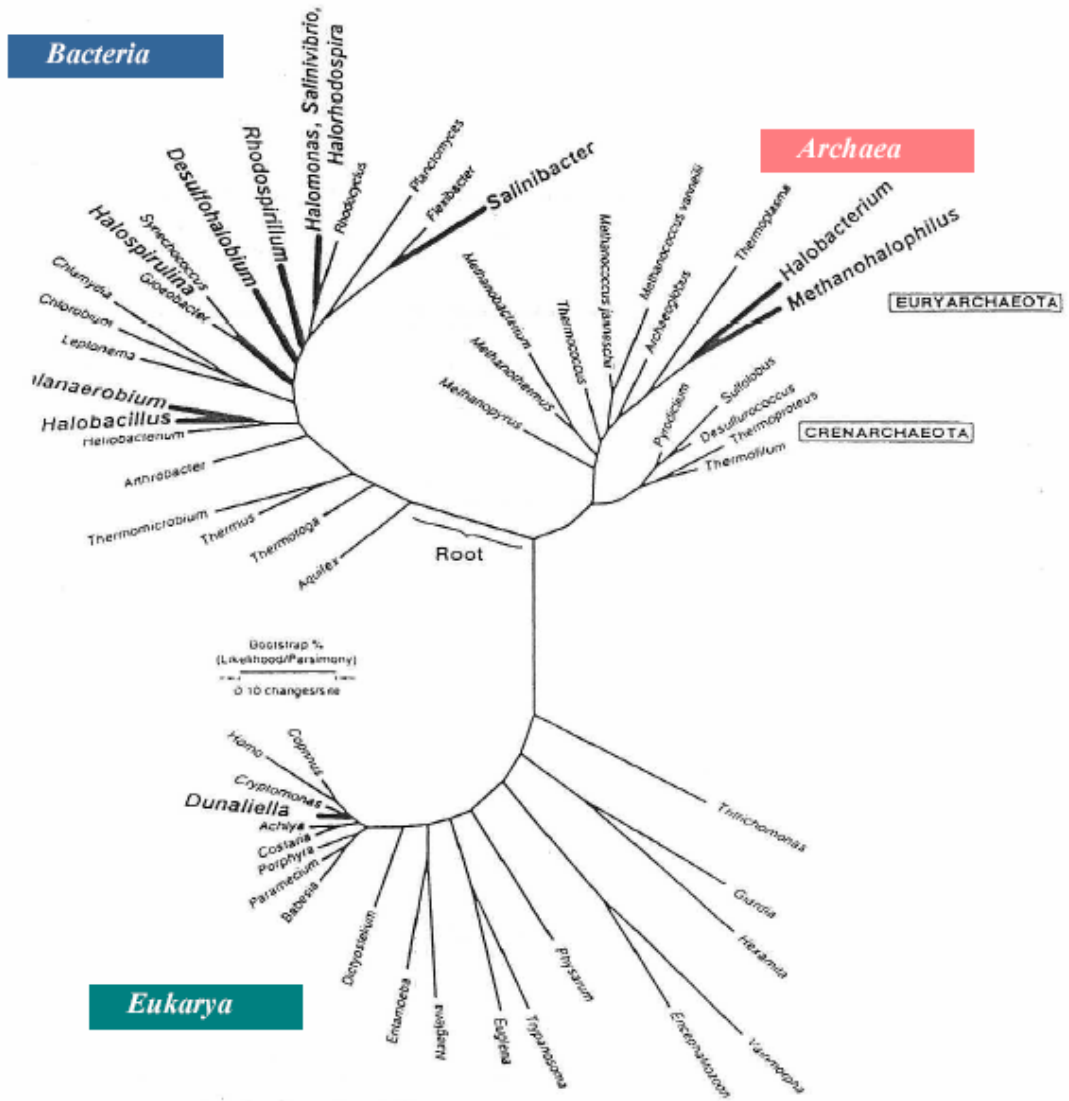
Halofiller, gelişmek için yüksek miktarda tuz konsantrasyonuna gereksinim duyan ve bu tipteki tuzcul çevrelerde yaşayabilmek için farklı stratejiler geliştirmiş olan, hem prokaryotik hem de eukaryotik temsilcileri bulunan geniş bir gruptur. Kushner 1985'de halofilleri gelişebilmek için ihtiyaç duydukları optimal NaCl miktarına göre sınıflandırmıştır :

- a) Halofilik olmayanlar, gelişebilmek için %1'in altında NaCl ye ihtiyaç duyanlardır.
- b) Az halofiller, %1-3 arasında NaCl ihtiyaçları olanlardır.
- c) Orta derecede halofiller, %3-15 arası NaCl ye ihtiyaç duyanlardır.
- d) Aşırı halofiller, gelişmek için %15'den daha fazla NaCl ye ihtiyaç duyarlar (Kushner 1985).

Bunların dışında “Halotolerant” lar olarak adlandırılan bir grup daha vardır ki bunlar tuz varlığında veya yokluğunda gelişebilen organizmalardır.

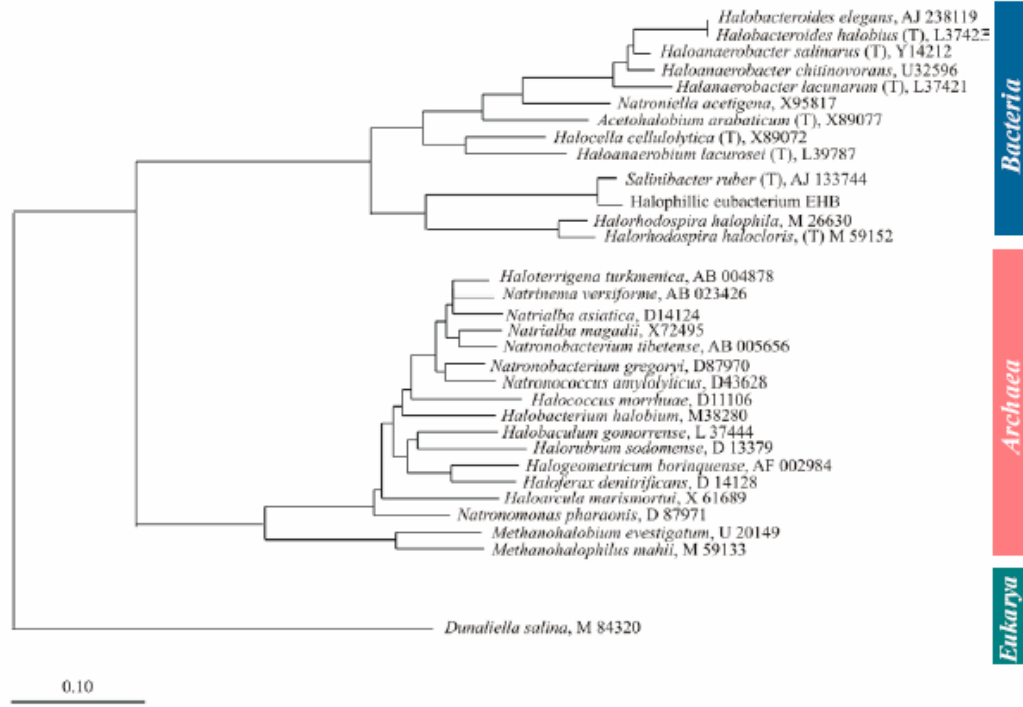
Aşırı derecede halofiller (ekstrem halofiller) içerisinde Archaea, Eukarya ve Bacteria olarak bilinen 3 domainin de temsilcileri bulunmaktadır. Halofilik metanojenik ya da heterotrofik archaealar, halofilik fotosentetik ya da heterotrofik bakteriler, tek hücreli fotosentetik eukaryotlar ve *Artemia* gibi çok hücreli Crustaceae üyeleri ya da *Ephedra* genusu gibi böcekler tuzcul çevrelerde bulunabilmektedirler. Bunun yanında farklı hipersalin çevreler birçok farklı kuş türü (özellikle Flamingolar) ne ev sahipliği yapmaktadır.

Pratik olarak halofilik bir mikroorganizma 100 g/l’den daha yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişim gösterebilen organizma olarak tanımlanabilir. Şekil 1.2. de farklı domainlerde yer alan halofilik mikroorganizmalar filogenetik ağaç üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 1.2. %10 ve üzerindeki tuz konsantrasyonlarında gelişebilen farklı domainlerdeki mikroorganizmaların filogenetik dağılımı (Oren 2002)

16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması mikroorganizmaların filogenisi hakkında oldukça yararlı bilgiler sunmaktadır. Şekil 2.2.'de kültür edilmiş ekstrem halofillerin dağılımını temsil eden filogenetik ağaç verilmiştir.



Şekil 1.3. Kültür edilmiş ekstrem halofillerin dağılımını temsil eden soy ağacı (Oren 2002)

Genel olarak, halofiller, ortamlarındaki yüksek osmotik basınca karşı iki tip osmoadaptasyon mekanizması geliştirmişlerdir. Bunlardan birincisi, K^+ , Na^+ ya da Cl^- gibi inorganik iyonların yüksek konsantrasyonlarda hücre içinde biriktirilmesi yoluyla osmozun dengelenmesidir (Da Costa ve ark. 1998). Bu strateji yüksek konsantrasyondaki iyonların varlığında çalışabilen hücre içi enzim adaptasyonlarını gerektirmektedir. Bu mekanizma Archaea domaini içerisindeki *Halobacteriaceae* familyası üyelerinde, Bacteria domaininde *Halanaerobiales* grubu (Da Costa ve ark. 1998; Oren 2002) ve *Salinibacter* genusu üyelerinde filogenetik olarak ilişkili olmayan ekstrem halofiller içerisinde görülmektedir (Anton ve ark. 2002; Müller ve Oren 2003; Oren 2002).

İkinci strateji, farklı mikroorganizmalarda görülen “compatible solute” ya da organik osmotiklerin biriktirilmesidir (Galinski 1995). Bu, hücrel proteinlerin kendilerini çevreleyen yüksek tuz konsantrasyonuna karşı bir adaptasyonu değil, hücrenin değişen koşullara hızlı bir adaptasyonudur. Muhtemelen bu mekanizma her üç domainde de bulunmaktadır.

1.2.1. Halofilik Mikroorganizmaların Hücresel Yapıları

1.2.1.1. Archaea

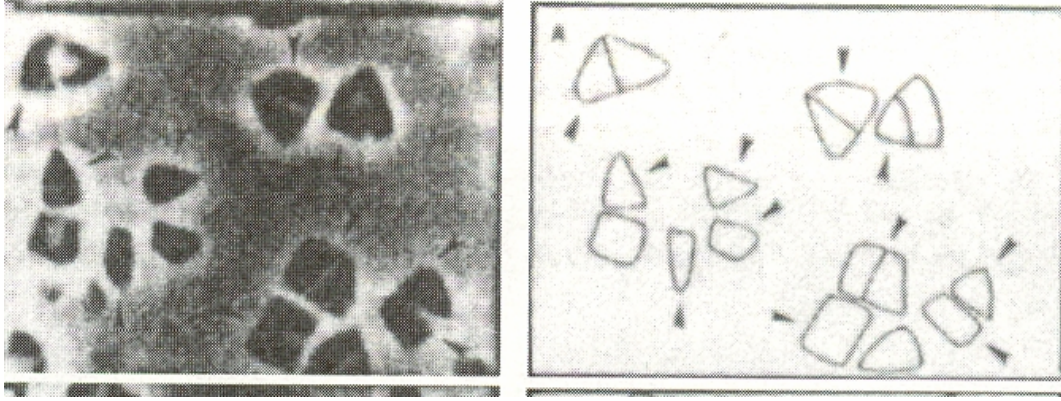
Halofilik Archaea'da Hücre Duvarı

Halofilik Archaea'larda hücre şekli, diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi, kendi hücre duvarları tarafından belirlenir. *Halobacteriaceae* familyasının türleri farklı farklı şekillere sahiptirler. Çubuk (*Halobacterium* ve diğerleri) ve küre (*Halococcus*, *Natronococcus*)'ye ek olarak *Haloferax* gibi yassı pleomorfik türler de mevcuttur. Henüz yeni kültive edilebilmiş ve son derece ince ve mükemmel bir kare şeklinde olan türün dışında, *Haloarcula japonica* gibi diğerleri üçgen ya da paralelkenar hücreler de bulunur. Böylesi alışılmadık biçimler halofilik Archaea'ların önemli bir turgor basıncına sahip olmamasının eseridir.

Üçgen şekilli halofilik Archaea, ilk defa 1986'da Japonya'da Horikoshi'nin grubunca rapor edilmiştir. İzolat *Haloarcula japonica* olarak tanımlanmıştır. Üçgen şekilli hücrelerin sıvı kültürdeki sayısı toplam popülasyonun %80'ini geçmektedir (Oren 2002).

Üçgen şekilli hücrelerden bile daha alışılmadık olarak; ince, yassı ve kare şekilli Archaea ilk defa Walsby tarafından 1980'de Mısır'da brine havuzlarında gözlenmiştir. Kare şekil doğada çok az meydana gelir. Alışılmadık kare şekilli yapılar silindirik gaz veziküllerine sahiptir. Kare şekilli hücreler üçgene doğru gelişirler ve sonra bölünürler (Oren 2002).

Şekil 1.3. böyle kare ya da üçgensel hücrelerin elektron mikrograflarını göstermektedir.



Şekil 1.4. Üçgen ve kare şekilli halofilik hücreler (Oren 2002).

Kardeş hücreler bazen bölünmeden sonra birlikte kalarak posta pullarını andıran yassı hücrelerce oluşturulmuş tabakalar meydana getirirler. Bu kare hücreler son derece ince ($0.25-0.1 \mu\text{m}$ ye kadar) dir.

Halococcus genellikle düzensiz hücre kümeleri olarak bulunur. Bu organizmalar önce $20 \mu\text{m}$ ya da daha büyük çapta amorf hücre toplulukları halinde gelişirler. Bu hücre kütlesi çok sayıda iç hücrel bölünme ile küboid hücrelerden oluşan çok hücreli bir yapı haline dönüşür. Bu hücreler sonra birbirinden ayrılıp, uzayıp, hareketli hale gelirler ve tekrar çoğalmaya başlarlar. Böyle kompleks bir yaşam döngüsü olan başka bir tür *Halorubrum distributum*’dur. Düzensiz şekilli hücrelerin farklı düzlemlerde füzyonu ile birçok hücre paketlenmiş durumda yapılar meydana getirir ve bunlar genel bir kapsülle çevrili durumdadırlar. Çok tabakalı hücre duvarlarını içeren dinlenme formları (halokist) da tespit edilmiştir (Oren 2002).

Kokkoid *Halococcus* ve *Natronococcus* kalın ve sert bir hücre duvarına sahiptirler ve yapısal stabiliteleri için yüksek tuza bağımlı değildirler. Diğer *Halobacteriaceae* üyeleri genellikle S-tabakası denilen ve büyük glikoprotein alt ünitelerinden yapılmış olan hücre duvarına sahiptirler. Bu amino asitler ve teikoik asitler gibi “normal” hücre duvarı yapılarının *Halobacterium*’ca içerilmediği, Archaea domaini tanımlanmadan önce bilinmekteydi.

Glikoproteinler *Halobacterium*’un çubuk şeklini, *Haloferax* ve *Haloarcula*’da yassı disk veya üçgen şeklini muhafaza etmesi açısından önemlidir.

Yüksek NaCl konsantrasyonuna ek olarak, göreceli olarak yüksek miktarda magnezyum veya divalent katyonlarda hücre duvarının yapısal stabilitesinde gereklidir (Oren 2002).

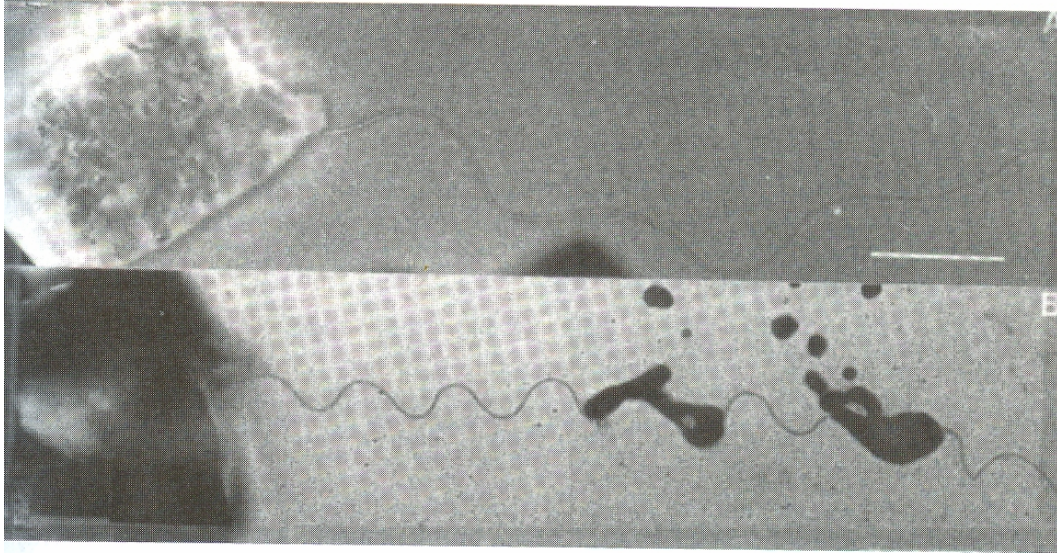
Halofilik Archaea'da Ekstraselüler Kapsüller

Belirli halofilik Archaea türleri hücre duvarı dışında polisakkarit kapsül biriktirirler. Çok miktarda ekzopolisakkarit *Haloferax* genusu tarafından salgılanır. *Haloferax mediterranei* üzerine yapılan ilk analizler ekstraselüler kısmın mannozun majör komponent olduğu heteropolisakkarit yapısında olduğunu göstermiştir. Glukoz, galaktoz ve diğer belirlenememiş bazı şekerler ve bunlar kadar amino asit şekerleri ve uronik asit de tespit edilmiş ve bunların sülfat bağları içerdikleri belirlenmiştir (Oren 2002).

Halofilik Archaea'da Flagella

Halobacteriales'in birçok üyesi flagellumları yardımıyla hareketlidir. Halobacterial flagella sağa dönümlü heliks yapısındadır ve sola dönümlü Bacteria'dan farklıdır.

Hareketlilik en çok *Halobacterium salinarium*'da çalışılmıştır. İzole edilmiş flagellumun SDS poliakrilamid jel elektroforezi 23.5, 26.5 ve 31 kDa moleküler büyüklüğündeki üç proteinin ayrımıyla sonuçlanmıştır. Bu üç flagellin glikoproteinlerle ilişkilidir ve sülfatlanmış oligosakkaritleri taşır. Halofilik Archaea flagellumunun saat yönündeki rotasyonu hücrenin ileri doğru hareketiyle, saat yönü tersine rotasyon ise geriye doğru hareket ile sonuçlanır. Şekil 1.4.'de flagelluma sahip *H. quadrata* görülmektedir (Oren 2002).



Şekil 1.5. Şekil 1.4. Flagellumlu *Haloarcula quadrata* (Oren 2002).

Sitoplazmik Membran ve Lipidleri

Sitoplazmik membran lipid ve proteinlerden yapılmıştır. Nutrientlerin ve diğer bileşiklerin, iyonların dışarı ve içeri transferi, dış çevre hakkında bilgi alan sensörleri, solunum elektron transportu için gerek duyulan tüm fonksiyonları barındıran yapıdır. Bunlara ek olarak, retinal iyon pompası bakteriorodopsin ve halorodopsin birçok halofilik Archaea membranında bulunur. Bakteriorodopsin protein pompası bazen mor membran denilen yapının oluşmasını sağlar.

Halobacteriaceae üyeleri gliserole eter bağlı dallanmış 20 karbon (fitanil) ve bazen 25 karbon (sesterpenil) zincirlerinden oluşmuş Archaeal tip lipidlere sahiptirler.

Farklı glikolipidler farklı *Halobacteriales* üyelerinde tanımlanmışlardır. Bunlar iki, üç ve dört glikozil dieter lipidleri içerirler. Bu glikolipidler şeker bölgelerinde sülfat grubu taşırlar.

-DGD-1 *Haloferax* türlerinde az miktarda bulunur.

-DGD-2 Mor komponent olarak *Haloarcula* türlerinde bulunur. Mannoze ve glukoz içeren bilinmeyen bir yapının minör digliserid lipididir.

-DGD-4 Haloalkalofilik strainlerden rapor edilmiştir. İki muhtemel yapısı şu şekillerde önerilmiştir:

-S-DGD-1 *Haloferax* genusunun major glikolipididir. *Halococcus* ve *Halorubrum*'da, *Halobaculum* da da tek ya da minör glikolipid olarak bulunur. S-DGD-1 Archaeal bloom döneminde Ölü Deniz biomasındaki majör ya da tek glikolipiddir.

-S-DGD-3 Bazı *Halorubrum* türlerinin glikolipididir.

-S-DGD-5 *Halorubrum trapanicum*'da bulunur.

-S₂-DGD-1 Bissülfatlanmış glikolipiddir. *Natrialba asiatica*'da bulunur.

-TGD-1 *Halobacterium salinarium*'un minör glikolipididir.

-TGD-2 Çoğu *Haloarcula* türlerinin tek ya da majör glikolipididir.

-S-TGD-1 *Halobacterium*'da bulunur.

-TeGD *Halobacterium salinarium*'da minör glikolipiddir.

-S-TeGD *Halobacterium*'da bulunur.

-Yeni bir kompleks fosfosülfoglikolipid *Halobacterium salinarium*'da mor membran ile birleşik olarak identifiye edilmiştir.

Nötral lipidler halofilik Archaeaların toplam lipid içeriğinin %10'u kadarını yansıtabilirler. Aşağıdaki tipleri rapor edilmiş durumdadır:

-Karetonoidler

-Quinonlar

-C₂₀ isoprenoid lipidleri

-Nötral gliserol fitanil eterleri

-C₃₀ isoprenoid bileşikleri

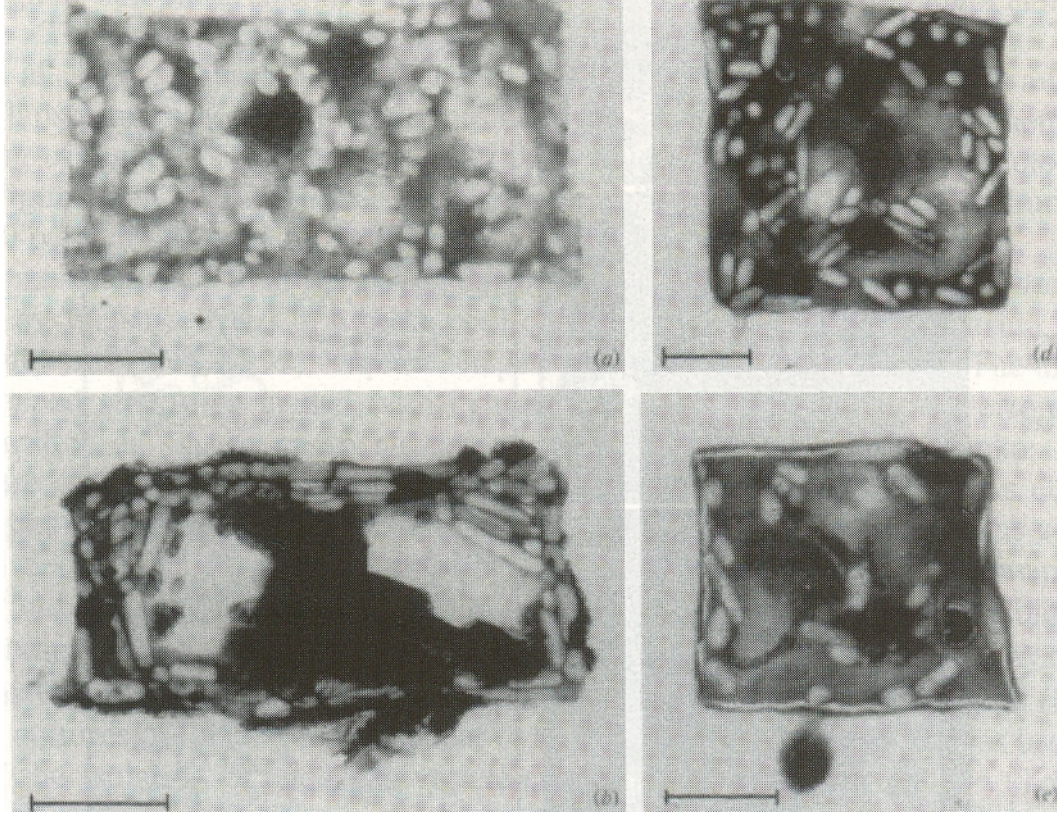
-İndol, (Oren 2002).

Gaz Vezikülleri

Gaz vezikülleri, *Halobacterium salinarium*, *Haloferax mediterranei*, *Halorubrum vacuolatum* ve *Halogeometricum borinquense*'de rapor edilmiştir. Buna ek olarak Walsby'nin "yassı kareleri" içinde de mevcuttur.

Gaz vezikülleri protein alt ünitelerinden yapılmış silindirik yapılardır. Gaz vezikül proteinleri de halofilik Archaeanın stabilizasyonu için tuza fereksinim duymayan az sayıda proteinlerinden birisidir. *Halobacteriaceae*'de gaz vezikülleri basınca karşı hassastır ve düşük basınçlarda bile parçalanabilirler.

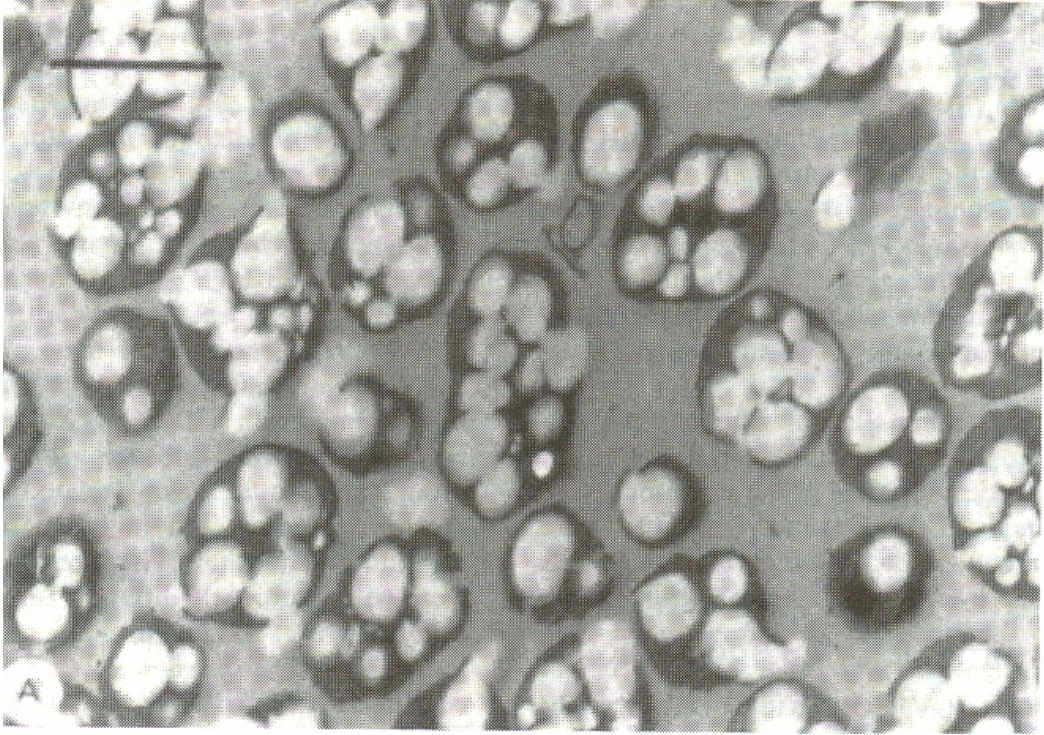
Gaz veziküllerine sahip olma ve brine yüzeyi üzerinde yüzebilme aerobik halofilik mikroorganizmalar açısından avantajdır. Çünkü tuzca doymuş tuzlu sularda (brinelarda) oksijen ve diğer gazların çözünürlüğü azdır. Şekil 1.5.'de halofilik archaealardaki gaz vezikülleri gösterilmiştir (Oren 2002).



Şekil 1.6. Halofilik Archaealarda gaz vezikülleri (Oren 2002).

Depo Materyalleri

Bazı *Halobacteriaceae* üyeleri çok miktarda polihidroksialkonat (PHA) polimeri üretirler. Özellikle *Haloferax mediterranei* ve *Haloarcula marismortui* PHA biriktirmektedir. Şekil 1.6. da *Haloferax mediterranei* hücrelerindeki depo materyalleri görülmektedir (Oren 2002).



Şekil 1.7. *Haloferax mediterranei* hücrelerindeki depo materyalleri (Oren 2002).

Kistler ve Endosporlar

Halorubrum distributum, muhtemelen dinlenme safhası için kalın duvarlı kist benzeri yapılar oluştururlar. Yaygın kültürlerin hücre duvarı ile bu kistlerin hücre duvarları arasında karşılaştırmalı bir bilgi yoktur. Gerçek endospor oluşumu Archaeal domainde şu ana kadar tanımlanamamıştır (Oren 2002).

1.2.1.2. Bacteria

Halofilik ve halotolerant Bacteria'nın hücresel yapı özellikleri halofilik Archaea'ya göre daha az çalışılmıştır.

Halofilik Bacteria Hücre Duvarı

Halomonas elongata'nın hücre zarfı hidrofobisitesi açısından farklılık gösterir. Yüzey hidrofobisitesi büyük ihtimalle hücre duvarı yapısı ve sitoplazmik membranın ortak bir fonksiyonudur. Yüksek NaCl konsantrasyonlarında yüklü fosfolipidlerin sayıca artışı güçlendirilmiş hidrofilik eğilimi açıklayabilir. Hidrofilik hücre yüzeyi yüksek tuzluluktaki suyun az olduğu ortamlarda hücreyi su molekülü açısından daha çekici hale getirir ve bu sayede hücrenin su kaybetmesini önler.

Halomonas peptidoglukanının ilginç bir özelliği hidrofobik aminoasit lösin'in varlığıdır ki bu tüm hücre duvarı hidrofobisitesine katkı yapar.

Fotosentetik mor non-sülfür bakterisi *Rhodothalassium salexigensis* hücre duvarı periodik aralıklı alt ünitelerce oluşturulmuş bir S tabakasıyla çevrilidir ve hücre duvarında hiç lipopolisakkarit bulundurmamaktadır.

Actinopolyspora halophila hücre duvarı geleneksel peptidoglukan hücre duvarına sahiptir (Oren 2002).

Halofilik Bacteri'da Ekstraselüler Kapsül

Halomonas eurihalina ilginç özellikli bir ekzopolisakkarit üretir. %42 karbohidrat (çoğunlukla heksoz) ve %15'i proteindir. Kalan kısmının yapısı bilinmemektedir. Polimer oldukça vizkoz, özellikle asidik pH'da, ve termostabildir (Oren 2002).

Halofilik Bacteria’da Flagella

Flagella ile hareket halofilik Bacteria’da oldukça yaygındır. Özellikle kalın, kalkanlı polar flagella haloalkalifilik fotosentetik sülfür bakterisi *Halorhodospira abdelmalehii*’de gözlenir (Oren 2002).

Sitoplazmik Membran ve Lipidleri

Hücre membranı özelliklerindeki tuz bağımlı değişiklikler fosfolipid tipleri düzeyinde ve lipidlerdeki yağ asidi zincirleri tipleri düzeyinde identifiye edilmiştir. “Haloadaptasyon” hücre zarfının osmotik strese karşı bir cevabı olarak görülmektedir (Oren 2002).

Halofilik Bacteria’da Polar Lipidler

Çoğu türde bulunan majör polar lipidler fosfotidilkolin (PC) ve fosfotidiletanolamin (PE) dir. Kardiolipin (CL) ve glikolipidler gibi diğer tip lipidler de oluşturulabilir.

Genellikle tuzluluk arttıkça negatif yüklü fosfolipidler (PC, CL), nötral fosfolipidlerin düzeyine kadar artmaktadır (Oren 2002).

Halofilik Bacteria’da Yağ asitleri

Çubuk şekilli gram negatif halofilik bakteriler (*Halomonas*, *Chromohalobacter* ve benzerleri) membran lipidlerinde genellikle düz zincirli doymuş ve monodoymamış yağ asitlerini (C16:0, 16:1 ve özellikle 18:1) içerirler.

Siklopropan yağ asitleri birçok izolatta tespit edilmiştir (Oren 2002).

Çeşitli yağ asitlerinin gaz kromatografik karşılaştırılmasını içeren mikroorganizmaların yağ asitlerine göre profillendirilmeleri bireysel bakterilerin hücre membran lipidlerini içine almaktadır. Böyle profiller her bir yağ asidinin büyüklüğüne (karbon sayısı), tipine ve çift bağların yerleşimine göre tanısını sağlamaktadır. Vreeland ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, çok eski bir tuz

kristalinden izole edilen bir “Permian” bakteri ile bu izolatin modern akrabaları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yağ asit profillerine göre bu organizmaları karşılaştırdıklarında bu yaklaşımın tür düzeyinde ayırım yapmadığı ancak farklılıkları da ortaya koyabildiği sonucuna varmışlardır (Vreeland ve ark, 2006).

Halofilik Bacteria’da Solunum Quinonları

Hem ubiquinon hem de menaquinon tipte isoprenoid quinonlar halofilik Bacteria’da tespit edilmiştir.

Ubiquinonlar (Q-7, Q-8 ve Q-9) halofilik *Proteobacteria*’da farklı miktarlarda bulunur. *Salinivibrio costicola* hem ubiquinonları (Q-8) hem de menaquinonları (MK-8) içerir. *Actinopolyspora halophila*’da kısmen hidrojene olmuş menaquinonlar daha sık bulunur (Oren 2002).

Halofilik Bacteria’da Fotosentetik Membranlar

Fotosentetik prokaryotlar fotosentetik aparatın yer aldığı intraselüler membran sistemlerine sahiptirler. Grup içinde halofilik temsilcilere sahip *Cyanobacteria*, intraselüler tillakoidleri içerir.

İntraselüler fotosentetik membranların çok farklılık gösteren tipleri halofilik anoksijenik fotosentetik bakteriler arasında görülmektedir.

Halochromatium ve *Thiohalocapsa* veziküler tip intraselüler membrana sahiptirler. Veziküler tip fotosentetik membran *Rhodovibrio salinarium* ve *Rhodovibrio sodomensis*’de de bulunur.

Rhodothalassium salexigensis sitoplazmik membrana paralel yer alan fotosentetik membrana sahiptir. Tillakoidimsi membranlar orta derecede halofilik *Ectothiorhodospira* ve gerçek halofilik *Halorhodospira*’da görülür.

Tüm tillakoidlerde ışıklandırma periplazmik boşluk ile yapılmaktadır (Oren 2002).

Halofilik Bacteria'da Gaz Vezikülleri

Halofilik Archaea'da sıkça görülen gaz veziküllerine, halofilik Bacteria'da nadiren rastlanır. *Cyanobacteria*'nın gerçek halofilik temsilcileri gaz vezikülleri içermemektedir.

Ectothiorhodospira vacuolata gaz vezikülleri üretmesiyle karakterizedir. Ancak bu tür hafif derecede halofiliktir ve yalnızca 10-60 g/l NaCl'de gelişebilir.

Sporohalobacter lortetii ve *Orenia sivashensis* gaz vezikülleri içermez. Bununla beraber endospor oluşumu başlarken gaz vezikülleri sentezlenir ve bunlar olgunlaşmış endospora bağlı kalır ki bunların sporun çevresel dağılmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Oren 2002).

Halofilik Bacteria'da Endosporlar

Isı toleranslı endosporlar bazı halofilik Bacteria gruplarınca üretilir. *Clostridiaceae*'den *Clostridium halophilum*, *Halanaerobiaceae*, *Halobacteriodaceae*, *Orenia* türleri, *Bacillaceae*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus* ve *Salibacillus* üyelerinde endospor oluşumu görülmektedir.

Hipersalin sediment örneklerinin pastörizasyonu, *Halanaerobiales* ordosu anaeroblarının seçici izolasyonu için güvenilir bir yöntemdir (Oren 2002).

1.3. Halofilik Prokaryotların İzolasyonu ve İdentifikasyonu

1.3.1. İzolasyon

Halofilik Archaea'ların cins düzeyinde zenginleştirme ve izolasyon prosedürleri Tindall (1982)'a göre farklı cinsler için aşağıdaki gibi özetlenebilir;

Cins I.: *Halobacterium*: Kuvvetli nötral tuzlu sular, ham solar tuzlar ve tuzlanmış ürünler *Halobacterium* türleri için potansiyel kaynaklardır. Materyal direkt olarak agarlı besiyeri yüzeyine sürülebilir. Petriler, kurumayı önlemek amacıyla plastik çantalarla taşınır ve 37-40 °C'de inkübe edilir. 4-21 gün sonra kırmızı koloniler ortaya çıkar. Kuvvetli bir çalkalama ile iyi havalandırmalı sıvı ortamlarda zenginleştirme elde edilebilir. *Halobacterium* ve diğer *Halobacteria* üyeleri bu prosedürlerle elde edilebilir.

Cins II: *Haloarcula*: Bu organizmalar *Halobacteria*'nın kültürleri için kullanılan birçok standart besiyerinde çok iyi gelişirler. Bu grup organizmaların zenginleştirilmesi için bilinen özel bir besiyeri yoktur.

Cins III: *Haloferax*: Bu grup organizmalar Ölü Deniz ve İspanya'nın Akdeniz tuzlarından izole edilmiştir. *Haloferax volcanii* 0.2 M Mg^{+2} ve 4 M NaCl içeren kompleks bir besiyerinde zenginleştirilmiştir, fakat çoğu diğer *Halobacteria*'da bu besiyerinde gelişmiştir. Yüksek Mg^{+2} toleransı ve göreceli olarak düşük NaCl isteği ve karbonhidratları kullanabilmesi önemli faktörlerdir. Rodriguez- Valera ve arkadaşları (1980) NaCl ile desteklenmiş deniz suyu temelli basit karbon kaynaklı bir besiyeri kullanmışlardır.

Yüksek Mg^{+2} tuzlu sular agarlı besiyeri üzerine direkt olarak yayılabilir, kurumayı önlemek için inkübe edilen petriler kapalı plastik çantalara alınır. 3-14 gün sonra 37 °C' de koloniler oluşmaya başlar.

Cins IV: *Halococcus*: Materyal direkt olarak agarlı besiyerine sürülebilir. Petriler, kurumayı önlemek amacıyla plastik çantalarla taşınır ve 37-40 °C' de inkübe edilir. 4-21 gün sonra kırmızı koloniler ortaya çıkar. Kuvvetli bir çalkalama ile iyi havalandırılmalı sıvı ortamlarda zenginleştirme elde edilebilir.

Cins V.: *Natronobacterium*: *Natronobacterium* türleri, agarlı besiyeri üzerine, direkt olarak, soda tuzları ya da soda göllerinden kaynaklanan kırmızı pigmentli tuzlu suların yayılması ile izole edilebilir. İnkübe edilen petriler kurumayı önlemek için plastik çantalara konur. 37 °C' de 3-10 gün sonra koloniler oluşur. Aynı içerikli sıvı besiyerinde çalkalamalı olarak zenginleştirme de mümkündür. *Natronobacterium pharaonis*, Wadi Natrun'dan, glutamik asit, trisodyum sitrat ve kazamino asit içeren pH'ı 10'a ayarlanmış bir besiyerinde zenginleştirilerek izole edilmiştir.

Morth ve Tindall (1985) 'ın yeast extract ve kazein hidrolizat besiyeri de iyi sonuçlar verir. *Natronobacterium pharaonis*, *Natronobacterium gregoryi* ve *Natronobacterium magadii*' yi ayırt edebilecek seçici şartlar bilinmemektedir.

Cins VI.: *Natronococcus*: *Natronococcus occultus*, %1 yeast ekstrakt ve %0.1 KNO₃ ile desteklenmiş, çalkalamasız olarak, 37 °C'de Magadi Gölü tuzlarının inkübasyonu ile izole edilmiştir. Bununla beraber, bu zenginleştirme prosedürünün verim oranı üzerine karşılaştırmalı bir çalışma yapılmamıştır.

Organizma haloalkalifilik besiyerinde iyi gelişir. pH 9.5 olarak ayarlanmalıdır.

1.3.2 İdentifikasyon

Oren ve arkadaşları (1997), bakteriyolojide yeni türlerin ilk tanımlamalarının yapıldığı bir organ olan International Journal of Systematic Bacteriology'de yayımlanan çalışmalarında *Halobacteriales* ordosunda yeni bir taksonun tanımlaması yapılırken gerekli olan minimal standartları ortaya koymuşlardır (Oren ve ark. 1997). Bu kriterler uygulandığı zaman farklı hipersalin ortamlardan izole edilmiş örneklerin adı konabilecektir. Halobakteriyel

taksonların tanımlanabilmesi için gerekli olan kriterler sırasıyla şöyledir: Koloni morfolojisi, hücre morfolojisi, hareketlilik, pigmentasyon, Gram boyama, hücre lizisini önleyen tuz konsantrasyonu miktarı, büyüme için gerekli optimum NaCl ve MgCl₂ miktarı, büyümenin gerçekleştiği tuz konsantrasyonu aralığı, büyüme için gerekli sıcaklık ve pH, nitrat varlığında anaerobik büyüme, nitrattın nitrite çevrimi, nitrattan gaz oluşumu, arjinin varlığında anaerobik büyüme, çeşitli karbonhidratlardan asit oluşumu, tek karbon kaynağında büyüme durumu, katalaz ve oksidaz aktiviteleri, indol oluşumu, nişasta-jelatin-kazein ve tween 80'in hidrolizi, farklı antibiyotiklere duyarlılığı, polar lipid karakterizasyonu, DNA'nın G+C oranı ve 16S rRNA nükleotid dizilim bilgisi.

Buna göre, *Halobacteriales* ordosu için günümüzde geçerli olan sınıflandırma üç çeşit veri sonucuna göre yapılmaktadır:

- (i) Fenotipik veriler (Hücre morfolojisi, büyüme özellikleri gibi),
- (ii) (ii) Kimyasal veriler (Polar lipid patternler),
- (iii) (iii) 16S rRNA dizilimi bilgisi (Oren ve ark. 1997).

Fenotipik verilerin eldesi amacıyla yukarıda sayılan temel biyokimyasal testler uygulanmaktadır. Bu testler her ne kadar kendi başlarına yeterli olmasa bile diğer verilerle birlikte ayırt edici hale gelebilmektedirler (Oren ve ark. 1997; DasSarma 2001; Oren 2001).

Polar lipid analizleri de özellikle genus düzeyinde ayırma olarak sağlamaktadır. Polar lipid analizleri için ince tabaka kromatografisi yöntemi kullanılarak incelenen örneklerde fosfotidilgliserolsülfat (PGS) ve farklı glikolipidlerin varlığı araştırılmaktadır (Oren 1999).

Halofilik bakterilerin, sahip oldukları pigmentlere göre de analiz edilebileceklerine ilişkin çalışmalar vardır. Litchfield ve ark. (Litchfield ve diğ., 2000) biri İsrail ve bir diğeri de Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan iki hipersalin ortamın pigment analizlerini yaparak kayda değer farklılıklar bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Doğal örneklerden filogenetik olarak bilgi sağlayıcı moleküllerin (tipik olarak 16S rDNA ların) PCR yöntemiyle eldesi prokaryotik sınıflandırma üzerine yeni yaklaşımlar getirilmesine olanak sağlamaktadır. Geleneksel saf kültür teknikleri, örneklemenin yapıldığı doğal ortamdaki mevcut çeşitlilik içinde çok

kısıtlı sayıdaki bir grubu ortaya koyabilmektedir. Bu nedenle hipersalin ortamlardaki durumun ortaya konması amacıyla moleküler teknikler kullanılarak başarılı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Martinez-Murcia 1995; Arahall ve ark. 1996; Garcia-Martinez 1999; Benlloch ve ark. 2001; Benlloch ve ark. 2002).

1.4. Halofilik Mikroorganizmaların Taksonomisine Bakış

1.4.1. Halofilik Archaea

Archaea domaini içindeki halofilik mikroorganizmalar 3 familyada bulunurlar: *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae*, *Methanosarcinaceae*.

Methanospirillaceae ve *Methanosarcinaceae* tuzlu ve aşırı tuzlu şartlara uyum sağlamış organizmaları olduğu kadar halofilik olmayan organizmaları da içermektedirler. Bunlardan bazıları 300 g/l tuz konsantrasyonlarında dahi gelişebilmektedirler. *Halobacteriales* takımı içindeki tek familya *Halobacteriaceae* tamamiyle halofillerden oluşmuştur. Tüm mikroorganizmalar içinde en çok tuza ihtiyaç duyan ve tuza en toleranslı olanlar bu familya içinde yer almaktadır.

Tablo 1.4. de hipersalin çevrelerden izole edilmiş olan archaea üyelerinin taksonomisi ve optimum tuz aralıkları gösterilmektedir (Oren 2002).

Tablo 1.4. Hipersalin Çevrelerden İzole Edilmiş Olan Archaea Üyeleri Taksonomisi ve Optimum Tuz Aralıkları (Oren, 2002)

<i>Haloarcula</i>	<i>Har. marismortui</i>	200-230
Phylum Euryarchaeota		
Ordo Methanosarcinales	<i>Har. vallismortis</i>	200-250
Fam. Methanosarcinaceae	<i>Har. hispanica</i>	250
Genus	Species	Optimum tuz aralığı (g/l)
<i>Methanohalobium</i>	<i>M. argentum</i>	150-300 ^a
<i>Methanohalophilus</i>	<i>M. mukohataei</i>	120-200
	<i>M. portucalensis</i>	190-250
<i>Halobacterium</i>	<i>H. salinarum</i>	190-250
<i>Halobacterium</i>	<i>H. gomorrhense</i>	190-250
Halobacteriales	<i>Hcc. morrhuae</i>	200-260
Fam. Halobacteriaceae	<i>Hcc. saccharolyticus</i>	250
<i>Halobacterium</i>	<i>Hbc. salifodinae</i>	100-250

<i>Haloferax</i>	<i>Hfx. volcanii</i>	100-150
	<i>Hfx. gibbonsii</i>	200-250
	<i>Hfx. denitrificans</i>	170
	<i>Hfx. mediterranei</i>	170
<i>Halogeometricum</i>	<i>Hgm. borinquense</i>	200-250
<i>Halorhabdus</i>	<i>Hrd. utahensis</i>	270
<i>Halorubrum</i>	<i>Hrr. saccharovororum</i>	200-265
	<i>Hrr. sodomense</i>	100-150
	<i>Hrr. lacusprofundi</i>	150-200
	<i>Hrr. coriense</i>	130-160
	<i>Hrr. distributum</i>	ND
<i>Haloterrigena</i>	<i>Htg. turkmenica</i>	ND
	<i>Htg. thermotolerans</i>	175-200
<i>Natrialba</i>	<i>Nab. asiatica</i>	200-240
	<i>Nab. taiwanensis</i>	200
	<i>Nab. aegyptia</i>	150-175
	<i>Nab. magadii</i>	200
<i>Natrinema</i>	<i>Nnm. pellirubrum</i>	200-250
	<i>Nnm. pallidum</i>	200-250
	<i>Nnm. versiforme</i>	200-250
<i>Natronobacterium</i>	<i>Nbt. gregoryi</i>	175
	<i>Nbt. nitratireducens</i>	200
<i>Natronococcus</i>	<i>Ncc. occultus</i>	200-220
<i>Natronomonas</i>	<i>Nmn. pharaonis</i>	200
<i>Natronorubrum</i>	<i>Nrr. bangense</i>	225
	<i>Nrr. tibetense</i>	200

ND: belirlenmemiş

1.4.1.1. *Halobacteriales* Takımı

Halobacteriales takımı çomak, kok, üçgen, kare ve disk şekline kadar birçok involusyon formu içine alır. Dinlenme safhalarının varlığı bilinmemesine rağmen, bazı strainlerde “halokist” olarak değerlendirilen yapılara ait raporlar da vardır. Hareketsiz veya polar kirpik ile hareketlidir. %2 asetik asit ile muamele edildikten sonra Gram pozitif ya da Gram negatif olarak boyanırlar. Nitrat varlığında veya yokluğunda fakültatif anaeorob ya da aerobtur. Bazı strainler arjinin varlığında fermentasyon yaparlar.

Bu mikroorganizmaların gelişmeleri için gerekli olan minimum tuz konsantrasyonu 1.5 M NaCl dir. Çoğu straini 3.5-4.5 M NaCl de en iyi gelişmektedir. Birçok türün kolonileri C₅₀ karotenoidlerinin (bakterioruberin) varlığından dolayı farklı kırmızı tonlarına sahiptir. Retinal kökenli pigmentler, hücre membranı boyunca iyonların ışık bağımlı hareketlerini oluşturabilme yeteneğindedirler ya da çoğu strainde fotosensör görevini yapan birimler olarak bulunurlar. Bu pigmentlerden biri olan ışık enerjisi tarafından yönlendirilen bir proton pompası olarak görev yapmaktadır.

Büyümeleri için gerekli optimum sıcaklık 35-50°C arasındadır. Kemoorganotrofikler, karbonhidrat veya aminoasitleri karbon kaynağı olarak kullanırlar. ABB^{TC} tipinde RNA polimeraza sahiptirler. Doğada tuz konsantrasyonunun yüksek olduğu çevrelerde, örneğin tuz ve soda göllerinde, tuzlalarda bulunurlar. Tuzlanmış ürünlerde (balık, deri) yaygındırlar. Aynı zamanda toprak altındaki tuz madenlerinde de bulunabilirler.

Hücrelerin DNA'sı yaygın olarak major ve minör komponentleri içerir. Minör komponent toplam DNA'nın %10-30'unu oluşturabilmektedir. DNA'nın G+C oranı 59-71 (majör komponent) ve 51-59 (minör komponent) dur. Tip genus *Halobacterium*'dur (Boone ve ark. 2001).

***Halobacteriaceae* Familyası**

***Halobacterium* Cinsi**

Halobacterium hücreleri optimum şartlar altında geliştiklerinde çomak şekillidirler (0.5-1.2 x 1.0-6.0 µm). Pleomorfik formlar yaygın olarak görülür (eğri ve şişkin çubuklar, düz şeritler, sopa, küreler). Hücreler ikiye bölünme ile çoğalırlar. Bilinen bir dinlenme safhaları yoktur. Gram negatiftirler. Hareket polar kirpik ile olmaktadır. Çoğu zorunlu aerobtur, fakat bazıları fakültatif anaerob olarak gelişebilmektedir. 3-5.2 M lık NaCl içeren besiyerlerinde gelişebilen extreme halofillerdir. Çoğu strain en iyi 3.5-4.5 M NaCl de gelişirler. Optimum sıcaklık 35 -50°C; maksimum sıcaklık 55°C, minimum sıcaklık ise 15-20°C'dir. Gelişimleri için pH aralığı 5.5-8.5'tur. Kemoorganotrofturlar. Amino asitler büyümeleri için gereklidir. Çoğu strain proteolitikdir.

DNA genellikle major ve minor komponentlere sahiptir. Minor komponent toplam DNA'nın %10-30'unu oluşturur. Minor komponente sahip türler genellikle büyük plazmidlere sahiptir (144 kb). Major komponentteki G+C'nin mol yüzdesi 67.1-71.2, minor komponentin G+C mol yüzdesi ise 57-60'dır. Örnek tür *Halobacterium salinarum*' dur (Boone ve ark. 2001).

Halobacterium salinarum

Bu türün hücreleri çomak şekilli (0.5-1.0 x 1.0-6.0 µm veya daha uzun) ve şekilsiz formdadır. Bazıları gaz kesecikleri içerir. Polar kirpik sayesinde hareketlidirler. Genelde aeropturlar. Dimetilsülfoksit, trimetilamin N-oxide ve fumarat varlığında anaerobik olarak veya arjinin varlığında fermentasyonla gelişirler. 3.5-4.5 M NaCl'de en hızlı büyüme gerçekleşir. Optimum gelişme 5.2 M NaCl'de gözlenir. Fakat bu tür 3 M NaCl'nin altındaki tuz konsantrasyonlarında gelişmez. Gelişme için sıcaklık 20-55°C'dir. optimum sıcaklık 50° C'dir. Mg⁺² ihtiyacı 0.05-0.1 M,- pH aralığı ise 5.5-8.0'dir. Kemoorganotrofturlar. Gelişim için amino asidlere ihtiyaç duyar. Karbonhidratlar kullanılmaz ancak gliserol varlığında gelişmenin uyarıldığı gözlenmiştir. Nişasta sindirilmez. İndol pozitifdir.

Jelatin ise sindirilir. Amino asitlerin dekarboksilasyon veya deaminasyonu sonucu besi ortam alkali hale gelir. Üreaz negatiftir. Arjinin dehidrolaz enzimi mevcuttur.

Yaygın olarak nötral tuz göllerinde, deniz tuzlarında, tuzlanmış proteinli gıdalarda ve eski tuz kristallerinde bulunmaktadır.

DNA major ve minör komponentlerden oluşmuştur. DNA'nın G+C mol yüzdesi 66-70.9 ve 57-60'dır (minör komponent) (Boone ve ark. 2001).

***Haloarcula* Cinsi**

Haloarcula türleri, Gram negatif, hareketli veya hareketsiz, aerop ya da fakültatif anaerop, üçgen, kare, düzensiz disk veya aşırı düzensiz çomak şeklinde olabilirler. Çomak şeklindeki hücreler genellikle 1-3 μ uzunluğundadırlar. Bu organizmaların dinleme safhalarının varlığı bilinmemektedir. 2.0-5.2 M NaCl içeren ortamda gelişen aşırı halofilik olan *Haloarcula* türlerinde oksidaz ve katalaz pozitifdir. Bu organizmaların gelişmeleri için optimum NaCl konsantrasyonu 2.5-3.0 M, optimum sıcaklık ise 40-45°C'dir. Gelişmeleri için gerekli olan Mg ⁺² ihtiyacı 0.005-0.05 M'dir. Kemoorganotrof olan ve bakterioruberin içeren bu organizmalar karbon ve enerji kaynağı olarak bir çok substratı kullanırlar ve şekerlerden asit üretirler fakat gelişmeleri için aminoasitlere ihtiyaç duymazlar (Rodriguez-Valera 1988; Boone ve ark. 2001).

DNA'daki G+C'nin mol yüzdesi 60.1-65.0 dir. *Haloarcula vallismortis* bu cinse ait en iyi ömektir. (Boone ve ark. 2001).

Tüm ömekler penisilin, kloramfenikol, streptomisin ve tetrasikline karşı dirençli, anisomisin, basitrasin ve novobiosine duyarlıdır (Boone ve ark. 2001).

Bu organizmalar, Ölü Deniz ve Ölü Vadi'deki tuz yatakları ve deniz tuzlarında bulunurlar. *Haloarcula* hücrelerinin düzensiz hücre yapısı, zengin karbon kaynağı kullanmaları ve düşük Mg ⁺² 'ye ihtiyaç duymaları gibi özellikleri bu cinsi diğer düzensiz hücre yapısına sahip olan örneklerden ayırmaya yeterli değildir. Bu organizmalar yalnızca kemotaksonomik veya moleküler yöntemler kullanılarak diğer halobakterilerden tam olarak ayırt edilebilir. Ayrıca 16S rRNA dizi analizlerinin. karşılaştırılması da farklılık tayininde mümkündür. Bu organizmaları ayırt etmek için kullanılan en basit yol, polar lipidlerdeki TGD-

2'nin varlığının araştırılmasıdır (Boone ve ark. 2001). Ancak bu cinse ait *Haloarcula mukohataei* farklı lipid kompozisyonuna sahip olması ve ait olduğu cinsin 16S rDNA dizisinin yakın karakteristik özelliğini içermemesi sebebiyle ayrı bir cins altında yer almıştır (Oren ve ark. 2002).

Haloarcula vallismortis

Düzensiz çomaklar halinde olan bu türün hücreleri (0.6- 1.0 x 3-5 µm) hareketlidir. üptimum büyüme 4.3 M NaCl'de gerçekleşir, 2.5 M altında gelişme görülmez. Minimum Mg^{+2} konsantrasyonu 0.005 M'dir. Büyüme için sıcaklık 20-45°C, en iyi 40°C'dir. Gelişme için pH 5.5-8.5, en. iyi 7.4-7.5'dir. Nitrat varlığında fakültatif anaerobik olan bu türler karbon ve enerji kaynaklarını (glukoz, fruktoz, galaktoz, sukroz, maltoz, trebaloz; gliserol ve glukonat) kullanırlar. Şekerlerden asit üretilir. Nitrat indirgenir ve gaz açığa çıkar. Nişasta sindirilir, indol üretilir. Sisteinden H₂S üretilir. Proteolitik bir organizma olmayan bu türde katalaz, oksidaz ve DNAaz reaksiyonları pozitifdir. Tween 20 çok a 40, 60 ve 80 sindirilmez.

Haloarcula vallismortis, Kaliforniya'daki Ölü Vadi'den izole edilmiştir. DNA'nın G+C mol yüzdesi 64.7 'dir (Boone ve ark. 2001).

Haloarcula argentinensis

Polar kirpik sayesinde hareketli, üçgen ve düz hücrelere sahip, 0.3 x 1.0 µm uzunluğunda olan bu türün kolonileri katı besiyerinde kırmızımsı turuncu renkli ve mukoid görünümündedirler. Kemoorganotrof ve zorunlu aeropturlar. Glukoz ve diğer şekerlerden (sukroz, maltoz, galaktoz, mannoz, riboz, gliserol ve froktoz) asit üretilir. Gelişme 2.0-4.5 M NaCl'de gözlenir. Optimum büyüme 2.5-3.0 M NaCl ve 40°C'de olur. Minimal ve optimum Mg^{+2} konsantrasyonu 0.03 ve 0.1 M'dir.

Arjantin'deki tuzlalardan izole edilen bu türü n G+C mol yüzdesi 62'dir (Boone ve ark. 2001).

Haloarcula hispanica

Küçük, düzensiz, çomaklar halinde olan hücreler 0.5-1.0 x 0.3µm uzunluğunda ve polar kirpikle hareketlidir. 2.5-5.2 M NaCl içeren besiyerinde gelişme görülür. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.5-4.2 M'dır. Minimum Mg^{+2} konsantrasyonu 0.005 M'dır. Sıcaklık 25-50°C'dir. Optimum büyüme 35-40°C'de olur. Gelişme için pH 6-8 ve optimum pH 7.0'dır. Nitrat varlığında fakültatif anaerobiktirler. Karbon ve enerji kaynağı olarak çeşitli bileşikler (glukoz, laktoz, sukroz, gliserol, mannitol, sorbitol, asetat, sitrat, laktat, malat, pruvat, süksinat, arjinin, glutamin ve lizin) kullanırlar. Şekerlerden asit üretilir. Nişasta ve kazein sindirilir. Nitrat gaz üretimiyle indirgenir. Yalnızca yüksek konsantrasyonda basitrasine hassastır.

İspanya'daki deniz tuzlarından izole edilen *Haloarcula hispanica*'nın DNA' sının G+C mol yüzdesi 62.7'dir (Tm) (Boone ve ark. 2001).

Haloarcula japonica

Düzensiz şekilli, üçgen ve düz olan hücreler 0.2-0.5 x 2.0-5.0 µm uzunluğunda olup, hareketlidirler. Gaz kesecikleri üretilmez. Gelişme 2.5-5.0 M Na Cl'de olur. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.5 M'dır. Minimum ve optimum Mg^{+2} konsantrasyonu 0.04 M ve 0.08 M'dır. Gelişme için sıcaklık 24-45°C ve optimum sıcaklık 42-45 °C'dir. pH 6-8 arasındadır, optimum pH 7-7.5'tir. Kemoorganotrof olan bu tür, karbon ve enerji kaynağı olarak çeşitli bileşikler (glukoz, fruktoz, galaktoz, arabinoz, ksiloz, rhamnoz, sukroz, gliserol, mannitol ve sorbitol) kullanılır. Şekerlerden asit üretilir. Nitrat ve nitrit gaz oluşumuyla indirgenir. Kazein, jelatin ve nişasta sindirilmez. İndol pozitifdir. Tiyosülfattan H_2S üretilir.

Japonya'daki tuzlalarından izole edilen bu türün minör DNA komponenti veya plazmidi yaklaşık 145 kb olarak tespit edilmiştir. DNA'nın G+C mol yüzdesi 63.3'tür (Boone ve ark. 2001).

Haloarcula marismortui

Şekilsiz, düz ve disk şeklinde olan hücreler 1.0-2.0 x 2.0-3.0 µm uzunluğundadır. Hücreler hareketlidir, ancak hareketin gözlenmesi çoğu zaman güçtür. 1.7-5.1 M NaCl içeren besiyerinde gelişme gözlenir. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.4-3.9 M'dir. Gelişme için optimum sıcaklık 40-50°C'dir. Kemoorganotrof olan bu türler karbon ve enerji kaynaklarını (glukoz, fruktoz, sukroz, gliserol, asetat, suksinat ve malat) kullanırlar. Glukoz, fruktoz, riboz, ksiloz, maltoz, sukroz, mannitol, sorbitol ve gliserolden asit üretilir. Anaerobik şartlarda nitrat kullanımı mevcuttur. Nişasta az olarak sindirilir.

Ölü Deniz'den izole edilen bu türün DNA'sının G+C mol yüzdesi 55 'dir (Boone ve ark. 2001).

Haloarcula mukohataei

Arjantin'deki tuzlalardan izole edilen bu türün fosfolipid ve glikolipid profillerinin ve 16S rRNA dizi analizlerinin *Haloarcula* cinsinin temel özelliklerine uymaması nedeniyle *Halomicrobium mukohataei* olarak değiştirilmiştir.

Gram negatif ve peritrik kirpik sayesinde hareketli olan bu türün hücreleri içerdikleri farklı besiyeri içeriğine bağlı olarak kısa veya uzun çomaklar (1-3 veya 3.8 x 0.5 µm) halinde olabilirler. Kemoorganotrofturlar ve nitrat varlığında aerobik ve anaerobik olarak nitrit ve gaz oluşumu ile ürerler. Arjinin varlığında anaerobik üreme göstermezler. Katalaz ve oksidaz pozitifdir. Aşırı halofilik olan bu organizmalar gelişme için. 2.5-4.5 M NaCl'ye ihtiyaç duyarlar. Optimum büyüme 3.0-3.5 M NaCl'de ve 40-45°C'de gerçekleşir. pH 6.2-8.0'dır. Minimum Mg⁺² konsantrasyonu 3 mM'dir. Glukoz, galaktoz, sukroz, maltoz ve gliserolden asit üretilir. Ayrıca bunlar tek karbon ve enerji kaynakları olarak büyümeyi desteklerler. Nişasta sindirilir. Jelatin, kazein ve Tween 80 sindirilmez. Triptofandan indol üretilmez. Polar lipidleri PG, Me-PGP, PGS' tir. Gaz kromatografisinde yapılan çalışmalar bu türün polar lipidlerinin TGD-2'den

yoksun olduğunu göstermiştir. Kloramfenikol, kanamisin ve penisiline dirençli; anisomisin, novobiosin ve pravastatine karşı hassastırlar.

Arjantin'in tuzlarından izole edilen bu türün DNA' sının G+C mol yüzdesi 65'tir (Boone ve ark. 2001; Oren ve ark. 2002).

Haloarcula quadrata

Kare bakteri ilk olarak 1980 yılında Walsby tarafından Mısır' daki Sinai Yarımada'sının tuz gölü kıyısında Gavish Sabkha'da gözlenmiştir.

Gram negatif, bir veya daha fazla polar kirpik sayesinde hareketli olan türün hücreleri düzensiz şekilli, baskın olarak düz ve kare şeklindedirler (2-3 J.µm). 2.7-4.3 NaCl içeren ortamlarda gelişme gözlenir. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.4-4.3 M ve Mg^{+2} konsantrasyonu 0.1-0.5 M'dir. Kare morfolojilerinin korunabilmesi için gerekli Mg^{+2} en az 50-100 mM olmalıdır. Gelişme için optimum sıcaklık 53⁰C, optimum pH ise 6.5-7.0'dir. Kırmızımsı turuncu renkli kolonilere sahip olan bu tür kemoorganotroftur. Glukoz, sukroz ve maltozu tek karbon ve enerji kaynakları olarak kullanırlar. Galaktoz, mannitol, sorbitol, gliserol, suksinat ve pruvat ile gelişmenin uyarıldığı gözlenmiştir. Glukoz, galaktoz, sukroz, ksiloz ve ribozdan asit üretimi gerçekleşir. Nitrat varlığında anaerobik büyüme nitrit ve gaz oluşumuyla birlikte gözlenir. Oksidaz ve katalaz pozitifdir. Nişasta sindirilir. Jelatin, kazein, Tween 20 ve Tween 80 sindirilmez. İndol de üretilmez. Basitrasin, novobiosin ve anisomisine karşı hassas; penisilin, rifampisin, ampisilin, kloramfenikol, neomisin ve eritromisine karşı dirençlidir.

Bu türün G+C mol yüzdesi 60.1 'dir (Tm) (Oren ve ark. 1996a; Oren ve ark. 1999b; Boone ve ark. 2001).

Haloarcula californiae

Düzensiz şekilli, düz, dikdörtgen veya kare şeklinde olan hücrelerdir. Polar lipid kompozisyonunun benzerliği sonucu *Haloarcula* cinsine dahil edilmişlerdir.

Ayrıca DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucu da *Haloarcula marismortui*'ye çok yakın benzerliği tespit edilmiştir.

Kaliforniya tuzlarından izole edilen bu türün DNA' sının G+C mol yüzdesi 59.8'dir (Boone ve ark. 2001).

Haloarcula sinaiensis

Kızıl Deniz sabkhadan izole edilen bu türün lipid profilleri *Haloarcula* cinsine uygunluk göstermektedir. Ayrıca 16S rRNA dizi analizleri de bu türün *Haloarcula vallismortis*'le yakinen ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. DNA'nın G+C mol yüzdesi 59.7' dir (Boone ve ark. 2001).

***Halobaculum* Cinsi**

Halobaculum türleri Gram negatif çomaklar halindedir. Aşırı halotilik olan bu bakteriler optimum gelişme için 1-2.5 M NaCl ve 0.6-1 M MgCl₂'ye ihtiyaç gösterirler. Optimum sıcaklık 40°C'dir. Küçük, dairesel, konveks, kenar düz, ışığı geçirgen ve kırmızımsı turuncu kolonilere sahiptir. Kemoorganotrof ve zorunlu aerob olan *Halobaculum* türlerinde katalaz ve oksidaz pozitifdir. Nitrat nitrite indirgenir, ancak nitrat veya arjinin varlığında anaerobik olarak gelişme gözlenmez. Maya özütü ve kazamino asitin düşük konsantrasyonları iyi birer organik besin kaynağıdır. Tek karbon kaynaklarında gelişme gözlenmemiştir. Glukoz, maltoz, sukroz, galaktoz, ksiloz, trehaloz, nişasta ve gliserolden asit Üretimi gözlenir. Gelişme laktat ile uyarılabilir. Nişasta sindirilir, jelatin sindirilmez, indol üretilmez.

Halobaculum türlerinin ana polar lipidleri C₂₀C₂₀'nin türevleri olan fosfatidil gliserol (PG), fosfatidil gliserofosfatın metil esteri (PGP-Me) ve sülfatlı diglikosil dieter glikolipididir (s-DGD-I). DNA'daki G+C mol yüzdesi 70'dir. Bu cinsin en iyi bilinen türü *Halobaculum gomorense* 'dir.

Bu cinse ait hücreler bakterioruberin içerirler, ancak bakteriorhodopsin içermezler. *Halobaculum* türleri novobiosin, basitrasin, anisomisin, vibrostat

ayıracılarına (0/129), taurokolate ve deoksikolata duyarlı ve penisilin, ampisilin, kanamisin, kloramfenikol, streptomisin ve neomisine karşı dirençlidir.

Halobaculum cinsi, diğer çoğu arkealardan, polar lipidlerindeki sülfatlı diglikosil dieterin (s-DGD-1) varlığı ve fosfatidil gliserosülfatın (PGS) yokluğu ile karakterize edilir. Ancak *Halobaculum* ve *Haloferax* aynı polar lipid kompozisyonlarına sahip olmakla birlikte yalnızca 16S rRNA nükleotid dizisinin karşılaştırılmasıyla anlaşılabilir (Tindall 1992; Boone ve ark. 2001).

Halobaculum gomorrense

Hareketsiz, çomak şekilli (5-10 x 0.5-1 µm) olan hücreler gaz keseciklerinden yoksundur. Gelişmeleri için en az 1 M NaCl'ye (0.8 M MgCl₂ varlığında) ihtiyaç gösterirler. Optimum gelişme 1.5-2.5 M NaCl ve 0.6-1.0 M MgCl₂ ile olur. Optimum sıcaklık ise 40°C'dir. Aerobiktir ve nitrat veya arjinin varlığında anaerobik gelişme gözlenmez. Nitrat nitrite indirgenir. Triptofandan indol üretilmez. Novobiosin, basitrasin, anisomisin, vibrostatik ajanlar (0/129) taurokolat ve deoksikolata duyarlı; penisilin, ampisilin, kanamisin, kloramfenikol, streptomisin ve neomisine karşı da dirençlidir. Glukoz, maltoz, sukroz, galaktoz, ksiloz, trehaloz, nişasta ve gliserol asit üretimi ile büyümeyi uyarır. Mannoz, fruktoz, riboz, laktoz, arabinoz, mannitol ve sorbitolden asit üretilmez. Laktat ile gelişme uyarılır.

Ölü Deniz'den izole edilen bu türün DNA' sının G+C mol yüzdesi 70'tir (HPLC) (Boone ve ark. 2001).

***Halococcus* Cinsi**

Halococcus türleri kok, diplokok, tetrat, sarcina ve düzensiz kümeler halinde bulunabilirler. Kok şeklinde olan hücrelerin çapları 0.8-1.5 µm'dir. *Halococcus* hücreleri septum oluşumu ile bölünürler ve spor oluşumu görülmez (Boone ve ark. 2001).

Hareketsiz ve zorunlu aerop olan *Halococcus* kolonilerinin rengi içerdikleri karotenoidlerden dolayı kırmızı ile portakal renklidir. Genelde Gram

negatifirler, ama bazı hücreleri Gram pozitif boyanır. Kemoorganotrof olup, oksidaz ve katalaz pozitifdir. Gelişmeleri için en az 2.5 M NaCl gereklidir, fakat en iyi gelişme 3.5-4.5 M NaCl varlığında olur. Optimum sıcaklık 30-40°C'dir. Maksimum 50°C, minimum 28°C'de gelişme gösterirler. Hipotonik çözeltilerde *Halococcus* türlerinin hücre yapılarını korudukları görülmüştür (Rodriguez-Valera ve ark. 1982b; Boone ve ark. 2001).

DNA'daki G+C mol yüzdesi 59.5-67'dir. *Halococcus* cinsinin 9 türünde DNA'nın G+C yüzdesinin 60.5 ile 65.8 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu organizmaların major DNA komponentin G+C mol yüzdesi 67, minör komponentin ise 59 olduğu saptanmıştır. *Halococcus morrhuae* bu cinsin en iyi örneğidir (Boone ve ark. 2001).

Hücre duvarı yapısında şekerler yanında amino şekerler, üronik asitler ve glisin içerdikleri gözlenmiştir. Ayrıca *Halococcus* cinslerinin kompleks yapıda sülfatlanmış heteroglikan oluşturduğu ve bununda hücre duvarının sert yapısını sağladığı ve hipotonik çözeltilerde hücre yapısını patlamaya karşı koruduğu tespit edilmiştir (Boone ve ark. 2001).

Ana lipidleri C₂₀C₂₀ ve C₂₀C₂₅'dir. Her ikisi de PG, PGP-Me, TGD-2 ve sülfatlanmış diglikosil glikolipid ve s-DGD-l 'in türevleri olduğu düşünülmektedir (Boone ve diğ., 2001). *Halococcus* hücreleri C₅₀ bakterioruberin yapısında olan menaquinones karotenoidleri içerirler. Bu organizmalar doğal tuz göllerinde ve deniz tuzlarında daha çok bulunurlar. Tuzlanmış balık ve derilerde de bozulmaya neden oldukları gösterilmiştir. Aynı zamanda deniz suyundan ve çok tuzlu topraklardan da izole edilmişlerdir (Valera ve ark. 1979; Boone ve ark. 2001).

Diğer halobakteriler gibi penisilin, kloramfenikol, streptomisin ve tetrasikline karşı dirençli; anisomisin, basitrasin, novobiosine karşı duyarlıdırlar (Boone ve ark. 2001).

Halococcus morrhuae

Zorunlu aerob olan bu türler gelişme için optimum 7.2 pH'ya ihtiyaç duyarlar. Amino asitler gelişme için ve enerji kaynağı olarak kullanılırlar. Glukoz

ana karbon kaynağı olarak kullanılmaz ve glukozdan asit ve gaz üretilmez. Katalaz ve oksidaz pozitifdir. Nitrat nitrite indirgenir. Tiyosülfattan ve sisteinden H₂S üretilir. Üreaz negatiftir. Bazı türler indol üretir, jelatin ve nişasta sindirilir. Karbon ve enerji kaynakları olarak N-asetilglukozamin ve bütirat; karbon, azot ve enerji kaynakları olarak da L-glutamin, L- histidin, L-prolin ve L-valin kullanılır.

Deniz suyu, tuzlu göller ve tuzlalardan izole edilen bu türün DNA'sının G+C mol yüzdesi 61-66'dır (Tm) (Boone ve ark. 2001).

Halococcus saccharolyticus

Zorunlu aerob olan türlerde optimum pH 7.2, sıcaklık ise 37 C'dir. Katalaz ve oksidaz pozitifdir. D-glukozdan asit üretilir. Ancak laktoz, sukroz ve Dmannitolden üretilmez. Tween 80, kazein, esculin ve tirozin sindirilmez. Jelatin sindirilir. İndol pozitifdir. Tiyosülfattan değil de sisteinden H₂S üretilir. Nitrat nitrite indirgenir. Novobiosine dirençlidir. Karbon ve enerji kaynakları olarak N-asetilglukozamin, amigladin, D-fruktoz, D-glukoz, laktoz, maltoz, D-mannoz, D-salisin, trehaloz, adonitol, ethanol, gliserol, D-mannitol, propanol, D-sorbitol, pruvat ve süksinat kullanılır.

Deniz tuzlarından izole edilen bu türün DNA'sının G+C mol yüzdesi 59.5'tur (Tm) (Boone ve ark. 2001).

Halococcus salifodinae

Halococcus cinsine ait olan morfolojik karakterlere sahip özellikleri içeren bu tür zorunlu aerobtur. Oksidaz ve katalaz pozitifdir. Nitrat nitrite indirgenir, jelatin sindirilir. Karbon kaynakları olarak D-galaktoz, D-rhamnoz, D-ksiloz, D-arabinoz, D-glukoz, D-ftuktoz, D-trehaloz, D-rafinoz veya gliserol kullanılır. Gelişme için optimum pH 6.8-9.5 ve sıcaklık ise 40°C'dir. pH 6.0 veya 10.5'te gelişme gözlenmez.

Avustralya'daki tuz madenlerinden izole edilen bu tür kloramfenikol ve tetrasikline duyarlıdır. DNA'nın G+C mol yüzdesi 62'dir (HPLC) (Boone ve ark. 2001).

***Haloferax* Cinsi**

Aşırı düzensiz ve dinlenme safhaları olduğu bilinmeyen *Haloferax* türlerinin hücreleri disk veya kupa şeklindedir. Uygun koşullar altında bile çomak şekilli hücrelere nadiren rastlanır. Hücre boyutu 1-3 x 2-3 µm'dir. Hareketsiz veya hareketlidirler, genelde hareket zor gözlenir. Sadece bir türünde hava kesecikleri görülmüştür. Koloniler mukoid görünüştür. Oksidaz ve katalaz pozitifdir. Anaerop koşullar altında nitrat indirgenebilir. Optimum tuz konsantrasyonu 2.5 M NaCl olmasına rağmen 1.5-4.5 M NaCl içeren ortamlarda da gelişirler. Gelişmeleri için sıcaklık aralığı 30 -55 °C olup, optimum gelişme sıcaklığı 35 °C'dir. Gelişmeleri için pH aralığı 5-8'dir ve optimum pH 7'dir. Bu organizmaların gelişmeleri için Mg⁺² ihtiyacı 0.01-0.04 M dir (Valera, 1988; Boone ve ark. 2001).

Bir çok substratı karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığından kemoorganotroftur ve şekerlerden asit oluştururlar (Boone ve ark. 2001).

PG, PGP, DGD-I ve S-DGD'nin türevleri olan C₂₀C₂₀ ana polar lipidleridir (Toneblanca ve diğ., 1986; Oren, 1994a; Oren, 1994b; Oren ve Gurevich, 1993). PGS-2'nin yokluğu polar lipidleri karakterize eder. DNA' daki G+C'nin mol yüzdesi 59.1-65.5'tir. Bu cinse ait en iyi örnek *Haloferax volcanii*'dir.

Haloferax türleri bakterioruberinleri ve retinal pigmentleri içermesine rağmen bakteriorhodopsin içermeyebilirler. PG, PGP-Me, DGD-I ve s-DGD-I 'nin türevleri olan C²⁰C²⁰ ana polar lipidleridir (Torreblanca ve diğ., 1986). Tüm örnekler penisilin, kloramfenikol, streptomisin ve tetrasikline karşı dirençli, anisamisin, basitrasin, novobiosin ve vibrostat ayırıcılarına (0/129) karşı duyarlıdır.

Diğer organizmalar gibi *Haloferax* türleri de, Ölü Deniz'den, Akdeniz tuzlarından izole edilmiştir ve yüksek Mg⁺² içeren ortamlarda thallasohaline tuzlarında bulundukları düşünülmektedir. Yüksek Mg⁺²'ye ihtiyaç duyan *Haloferax* türleri sadece taksonomik yöntemlerle diğer halobakterilerden ayırt edilebilir.

Bu organizma karakteristik olarak s-DGD-I polar lipidlerini ve bunun sülfatlanmamış türevlerini içermektedir. Bu organizmalarda PGS bulunmaması bu grubu ayırt etmekte kullanılan en basit yoldur (Boone ve ark. 2001).

Haloferax volcanii

Aşırı düzensiz, genelde düz, disk şeklinde veya küp şekilli hücrelere (1-2 x 2-3 μm) sahip olan bu tür, gelişme için 1.5-2.5 M NaCl ve en az 0.02 M Mg^{+2} 'ye ihtiyaç gösterirler. Optimum sıcaklık ise 45°C'dir. Kemoorganotrofturlar. Jelatin, nişasta ve Tween 80 bu tür tarafından sindirilmez. Nitrat nitrite indirgenir, indol üretilir ve tiyosülfattan H_2S yapılır. Gaz keseciklerine sahip olmayan bu türde tek karbon kaynaklarında gelişme gözlenir ve glukozdan asit üretilir.

Ölü Deniz'den izole edilen bu türün DNA'sı major ve minör komponentleri içerir ve plazmidler mevcuttur DNA'nın major komponentinin G+C mol yüzdesi 63.4 (Tm) ve 66.5; minör komponentinin G+C mal yüzdesi ise 55.3'dir (Boone ve ark. 2001).

Haloferax denitrificans

Hareketsiz, turuncumsu kırmızı kolonilere sahip olan bu türün hücreleri disk şekillidir (0.8-1.0 x 2.0-3.0 μm). Gaz keseciklerine sahip değildir. Gelişmeleri için 1-5-4.5 M NaCl'ye ve 30-55°C sıcaklığa ihtiyaçları vardır. Optimum pH 6.7'dir (37°C sıcaklıkta). Kemoorganotrofturlar ve çeşitli karbon ve enerji kaynaklarını kullanırlar. Anaerobik şartlar altında nitratı nitrite indirgeyebilirler. Tween 40 ve jelatin hidroliz edilir, ancak üre, nişasta ve Tween 80 sindirilmez. İndol negatiftir ve tiyosülfattan sülfid üretilir.

San Francisco, Kaliforniya tuzlarından izole edilen bu türün G+C mol yüzdesi 64.2'dir (Tm) (Boone ve ark. 2001).

Haloferax gibbonsii

Düzensiz, kısa çomaklar (0.4 x 0.5-2.5 μm) halinde olan hücreler polar kirpik sayesinde hareketlidir. Gelişebilmek için 1.5-5.2 M NaCl'ye gereksinimleri vardır. Optimum konsantrasyon 40°C'de 3-4 M, 30°C'de 2-3 M'dir. Optimum sıcaklık 35-40°C'dir. Optimum pH ise 6.5-7.0'dır. Kemoorganotrof olan bu tür şekerlerden (arabinoz, fruktoz, galaktoz, glukoz, mannoz, maltoz, sukroz ve

ksiloz) asit üretebilir. İndol pozitifdir. Nişasta sindirilez. Tween 20, 40, 60 ve 80 sindirilir. Nitrat nitrite indirgenebilir.

İspanya'daki deniz tuzlarından izole edilen bu türün DNA'sının G+C mol yüzdesi 61.5'dir (Tm) (Boone ve ark. 2001).

Haloferax mediterranei

Koloniler 37°C de 5-7 günlük inkübasyon sonunda pembe renkli, düzensiz çomaklar (0.5 x 2.0 µm) halindedir. Gelişebilmeleri için 20-55°C sıcaklığa ve 1.0-5.2 M NaCl'ye gerek duyan bu türün optimum pH'sı 6.5'tir. Kemoorganotrofturlar. Karbon ve enerji kaynakları olarak çeşitli bileşikler (glukoz, sukroz, fruktoz, laktoz, gliserol, maltoz, mannitol, sorbitol, ksiloz, arabinoz, suksinat, malat, laktat, pruvat, sitrat ve arjinin) kullanırlar. Şekerlerden (glukoz, fruktoz, maltoz ve sukroz) asit üretirler. Nitrat nitrite indirgenir. İndol pozitifdir. Nişasta, jelatin ve Tween 80 sindirilir. Basitrasine dirençlidir (Garrrity 2001).

İspanya'daki deniz tuzlarından izole edilen bu türün DNA'sında minor komponente rastlanmamıştır. Ancak büyük plazmidlere sahiptir. DNA'nın G+C mol yüzdesi 60.0 (Tm) ve 62.2 'dir (Boone ve ark. 2001).

Haloferax alicantei

İspanya tuzlarından izole edilen bu tür, polar lipid kompozisyonu ve 16S rRNA dizi analizlerinin karşılaştırmalı çalışmaları sonucu *Haloferax* cinsine ait olduğu saptanmıştır. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları da bu cinse ait olduğunu destekler yöndedir (Boone ve ark. 2001).

***Halogeometricum* Cinsi**

Halogeometricum türleri Gram negatif, kare, üçgen, oval şekilli, kısa ve uzun çomaklar halinde düzensiz hücreler içerir. Bu aşırı. halofilik bakteriler gelişebilmek için optimum 3.5-4.0 M NaCl ve 0.04-0.08 M MgCl₂'ye ihtiyaç duyarlar. Optimum sıcaklıkları 40°C'dir. Küçük, mukoid, pembe renkli kolonilere

sahiptir. Kemoorganotrof ve zorunlu aerop olan bu organizmalar katalaz ve oksidaz pozitifler. Anaerobik olarak nitrat nitrite indirgenerek gaz ürünlerinin oluşumu gözlenir. Arjinin varlığında anaerobik gelişme göstermezler. Maya özütü ve kazamino asit organik besinlerin kaynağıdır. Bazı şekerler karbon kaynağı olarak maya özütünün düşük konsantrasyonlardaki varlığında kullanılabilir. Glukoz, maltoz, fruktoz, ksiloz, trehaloz, sellobioz, rafinoz ve gliserol gelişmeyi teşvik eder ve asit üretimini sağlar. Nişasta sindirilmez, jelatin ise kuvvetli olarak sindirilir, indol üretilir.

Hücreler bakterioruberinden dolayı pembe renklidir. Ana polar lipidleri fosfatidil gliserol (PG) ve fosfatidil gliserofosfatın metil esteri (PGP-Me)'dir. Fosfatidil gliserosülfatın (PGS) ile karakterizedir.

DNA'nın G+C mol yüzdesi 59-60.5'dir. Novobiosin, basitrasin ve trimetoprim+ sulfametoksazol'e duyarlı; penisilin, ampisilin, kanamisin, kloramfenikol, vankomisin, tetrasiklin ve eritromisine karşı dirençlidir (Boone ve ark. 2001).

Halogeometricum borinquense

Cabo Rojo, Puerto Rico tuzlarından izole edilen Gram negatif olan bu aşırı halofilik arkea düzensiz, kısa veya uzun çomaklar, kare, üçgen veya oval şekilli hücreler (1-3 x 1-2 µm) içerir. Peritrik kirpik sayesinde hareketli olan hücreler gaz kesecikleri içerirler. Hücrenin yapısal bütünlüğünün sağlanabilmesi için yüksek tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyulur. Gelişme için en az 1.4 M NaCl gerekir. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.0-3.5 M ve MgCl₂ konsantrasyonu 0.04-0.08 M'dir. Tuz konsantrasyonu 1 M'ın altına düşerse hücreler küresel şekil alabilir. Optimum sıcaklık 40°C'dir. Çeşitli şeker türevleri (glukoz, fruktoz, maltoz, ksiloz, trehalaz, rafinoz ve gliserol) büyümeyi uyarabilir. Fruktoz, riboz, laktoz, arabinoz, ksilaz ve sukrozdan asit üretilir. Nişasta sindirilmez, jelatin sindirilir, triptofandan indol üretilir. Aerop olan bu tür nitrat varlığında anaerobik olarak gelişir, ancak arjinin varlığında anaerobik gelişme gözlenmez. Novobiosin, basitrasin ve trimetoprim+sulfametoksazol'e duyarlı; penisilin, ampisilin,

kanamisin, kloramfenikol, vankomisin, tetrasiklin ve eritromisine karşı dirençlidir.

Bakterioruberinlerin varlığı sayesinde pembe renkli olan hücrelerin ana polar lipidleri PG, PGP-Me ve sülfat içermeyen glikolipidlerdir. PGS varlığına rastlanmamıştır. DNA'nın G+C mol yüzdesi 59.1 'dir (HPLC) (Montalvo-Rodriguez ve ark. 1988, Boone ve ark. 2001).

***Halorubrum* Cinsi**

Halorubrum cinsinin hücreleri çomak şeklinde veya düzensiz hücreler olup 1-1.2 x 0.5-1.2 µm'dir. Spor oluşturmazlar. Kolonileri kırmızımsı-turuncu, düz, dairesel, konvektir ve gaz kesesine sahip olan türlerde parlak pembedir. Bazı türler hareketlidir. Zorunlu aerop ve kemoorganotrofturlar. Karbon ve enerji kaynağı olarak şekerleri de içeren bazı maddeleri kullanırlar. Oksidaz ve katalaz pozitifler. Nitrattan nitrit üretebilirler. Gelişebilmeleri için 1.5-5.2M NaCl'ye ve 4-56⁰C'lik sıcaklık aralığına ihtiyaçları vardır.

Minör DNA komponenti bulunur DNA'nın G+C mol yüzdesi 62.7-71.2'dir. *Halorubrum* türleri genelde düz çomaklar halinde bulunur. Ancak uygun olmayan gelişme şartlarında çeşitli formlara dönüşebilirler. Örneğin nütrofilik ve gaz kesesine sahip bir tür olan *Halorubrum vacuolatum* sıvı besiyerinde durgunluk dönemine girdiğinde ve katı besiyerinde küresel bir şekil alır.

Bu bakterilerde C50 karotenoidleri ve pigmentasyon gözlenir. Polar lipidleri C₂₀C₂₀'nin türevleri olan fosfatidil gliserofosfatın metil esteri (PGP-Me), fosfatidil gliserosülfat (PGS) ve sülfatlı mannosil-glukosil-gliserol dieterleridir.

Halorubrum türleri fiziksel ve kimyasal özellikler bakımından farklı olan tuzlu ortamlardan; deniz tuzlaları, tuz yatakları, Antarktika Tuz Gölü, Ölü Deniz, Magadi Gölü'nden elde edilmiştir (Boone ve ark. 2001).

Halorubrum saccharovorum

Çomak şekilli, 0.6-1.2 x 2.5 µm uzunluğunda olan hücreler uygun olmayan şartlar altında düzensiz şekilli olabilirler. Gram negatif, hareketli ve gaz keseciklerine sahip olmayan bu tür zorunlu aeroptur. Turuncumsu kırmızı olan koloniler gelişme için optimum 1.5-5.2 M NaCl ve 0.005 M Mg⁺²'ye ihtiyaç duyarlar. Optimum sıcaklık ise 50 °C'dir. Oksidaz ve katalaz pozitifdir. Jelatinaz, kazeinaz, üreaz ve amilaz negatifdir. İndol üretilir. Kemoorganotrofturlar ve gelişme için amino asitlere ihtiyaç duyarlar.

Polar lipidleri fosfatidil gliserol (PG), fosfatidil gliserofosfatın metil esteri (PGP-Me), fosfatidil gliserosülfat (PGS) ve sülfatlı mannosil-glukosil-gliserol dieterin C₂₀C₂₀ türevleridir. Minör DNA komponenti bulunur ve DNA'nın G+C mol yüzdesi 71.2' dir (McGenity ve Grant 1995; Boone ve ark. 2001).

Halorubrum coriense

Gram negatif, hareketli, düzensiz şekilli veya kısa çomak ve küp şekilli olan hücreler uzun çomaklar (0.5-5.0 µm) halinde de bulunur. Kırmızımsı turuncu renkli ve kemoorganotrof olan koloniler zorunlu aeropturlar ve gelişmek için optimum NaCl konsantrasyonu 2.2-2.7 ve Mg⁺² konsantrasyonu 0.005 M'dır. Optimum sıcaklık 50°C'dir. Katalaz ve oksidaz pozitifdir. İndol üretilir. Amino asitler gelişme için gerekli değildir. (Boone ve ark. 2001).

Halorubrum distributum

Çomak şekilli 0.8-1.0 x 2.5-7.0 µm uzunluğunda olan hücreler hareketli ve gaz keseciklerinden yoksundurlar. Kırmızımsı turuncu renkli olan koloniler zorunlu aeropturlar ve gelişme için optimum NaCl 2.5-4.3 M'dır. Sıcaklık ise 37-45°C'dir. Oksidaz ve katalaz pozitifdir. Jelatinaz ve amilaz ise negatifdir. Şekerler (galaktoz, sukroz ve' glukoz) büyümeyi uyarmazlar. Polar lipidleri PG, PGP-Me, PGS ve mannosil-glikosil-gliserol dieterin C₂₀C₂₀ türevleridir. DNA'nın G+C mol

yüzdesi 63.6 (major komponenti) ve 54.6 (minör komponenti)'dir (Oren ve Ventosa 1996b; Boone ve ark. 2001).

Halorubrum lacusprofundi

12 µm uzunluğunda ince çomaklar halinde olan hücreler hareketli ve gaz keseciklerine sahip değildir. Koloniler turuncumsu kırmızı renkli olup, zorunlu aeropturlar. Gelişme için optimum NaCl konsantrasyonu 2.5-3.5 M ve Mg^{+2} konsantrasyonu 0.005 M'dir. Optimum sıcaklık ise 31-36 °C'dir. Oksidaz ve katalaz pozitifdir. Jelatinaz, kazeinaz, üreaz ve amilaz negatifdir. İndol üretilmez, Tween ise sindirilmez. Kemoorganotrof olan bu tür şekerlerde (riboz, galaktoz, glukoz, mannoz ve laktoz) asit üretimini gerçekleştirir. Polar lipidleri PG, PGP-Me, PGS ve sülfatlı mannosil-glukosil-gliserol dieterlerinin $C_{20}C_{20}$ türevleridir.

Derin Göl'den izole edilen bu türün DNA' sının major komponentinin G+C mol yüzdesi 65.3-65.8, minör komponentinin G+C mol yüzdesi ise 54.8-56.5 'tir (Boone ve ark. 2001).

Halorubrum sodomense

Gram negatif, polar kirpik ile hareketli olan hücreler 0.5 x 2.5-5.0 µm uzunluğundadır. Kırmızımsı turuncu renkli olan koloniler zorunlu aeropturlar. Optimum NaCl konsantrasyonu 1.7-2.5 M, Mg^{+2} konsantrasyonu ise 0.005 M'dir. Optimum sıcaklık 40°C'dir. Oksidaz ve katalaz pozitifdir. Jelatinaz negatifdir. İndol üretilmez. Kemoorganotrof olan bu tür şekerlerden (ksiloz, fruktoz, glukoz, maltoz, sukroz) asit üretir. Polar lipidleri PG, PGP-Me, PGS ve mannosil-glukosil-gliserol dieterlerinin $C^{20}C^{20}$ türevleridir.

Ölü Deniz'den izole edilen bu türün DNA' sının G+C mol yüzdesi 67.4 (Bd) ve 66 (Tm)'dir (Boone ve ark. 2001).

Halorubrum trapanicum

Gram negatif, hareketsiz, çomak şekilli olan hücreler 0.7-1.0 x 1.5- 3.0 µm uzunluğundadırlar. Karotenoidlerin azlığından dolayı koloniler soluk turuncu renkli veya renksizdirler. Gelişme için optimum NaCl konsantrasyonu 2.5-5.2 M, sıcaklık ise 37°C'dir. Kemoorganotrof olan bu türde oksidaz ve katalaz pozitifdir. Jelatinaz ve amilaz negatifdir. İndol üretilmez. Amino asitler gelişme için gereklidir. Nitrattan gaz üretilir. Fruktoz, galaktoz, glukoz, mannoz, maltoz, sukroz, trehaloz ve gliserolden asit üretilir. Polar lipidleri PG, PGP-Me, PGS ve mannosil-glukosil-gliserol dieterlerinin C₂₀C₂₀ türevleridir.

Trapani'den izole edilen bu türün DNA'sının G+C mol yüzdesi 64.3 'tür (Boone ve ark. 2001).

Haloterrigena Cinsi

Haloterrigena türlerinin hücreleri, Gram negatif çomaklar veya oval şekilli ve hareketsizdirler. Aşırı halofilik olan bu organizmalarda katalaz ve oksidaz pozitifdir. Gelişmeleri için en az 2 M NaCl'ye ihtiyaç duyarlar ve optimum sıcaklık 45°C'dir. Koloniler C₂₀ karotenoidlerinden dolayı kırmızı veya parlak pembe pigmentlidir. Aerobik ve kemoorganotrofturlar. Polar lipidleri fosfatidil gliserol (PG), fosfatidil gliserofosfatlıl1 metil es teri (PGP-Me)'nin gliserol dieter analogları ve sülfatlı diglikosil dieter (s2-DGD) glikolipidleridir.

DNA'nın G+C mol yüzdesi 59.2-60.2'dir. *Haloterrigena* cinsinin *Halobacteriaceae* familyasının diğer cinsleriyle olan farklılığı, 16S rRNA'nın karşılaştırmalı analizlerinin yanında s2-DGD'nin varlığıdır (Boone ve ark. 2001).

Haloterrigena turkmenica

Hareketsiz, oval veya yuvarlak şekilli olan hücreler 1.5-2.0 µm çapındadırlar. Optimum gelişme için %15-25 NaCl'ye ihtiyaç vardır. Optimum sıcaklık 45°C'dir. Glukoz, fruktoz, mannoz, riboz ve sukrozdan asit üretilir. İndol

üretilemez. Nitrat nitrite gaz çıkışı ile indirgenir. Nişasta ve jelatin sindirilemez, H₂S üretilmez.

Ana polar lipidleri PG, POP-Me ve S2-DGD'dir. Türkmenistan'daki tuzlu topraklardan izole edilen bu türün DNA'sının G+C mol yüzdesi 59.8'dir (Tm) (Kamekura ve ark. 1999; Boone ve ark. 2001).

Haloterrigena thermotolerans

Çomak şekilli ve hareketsiz olan hücrelerin gelişebilmeleri 2 M NaCl varlığında olur. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.0-3.5 M'dir. Magnezyuma düşük oranlarda ihtiyaç duyarlar. Normal morfolojinin gözlenebilmesi için 5 mM Mg⁺² bulunmalıdır. Gelişme için pH 6.5-8.2, optimum pH 7.0-7.5 olmalıdır. Sıcaklık 50°C'dir. 60°C üzerinde zayıf gelişme görülür. Dairesel, düz kenarlı, konveks, opak ve soluk kırmızı renkli olan kolonilerin çapı 0.5-1.0 mm'dir. Zorunlu aerob ve kemoorganotrofturlar. Karbon ve azot kaynakları kazamino asitlerdir. Karbon kaynakları olarak şekerler (glukoz, fruktoz, sukroz, riboz ve diğerleri) ve gliserol kullanılmaz ve asit üretimi gerçekleşmez. Nitrat nitrite indirgenir. Nitrat ve L-arjinin varlığında anaerobik büyüme gözlenmez. Katalaz ve oksidaz pozitifdir. Tween 80 parçalanır.

C₂₀C₂₀ ve C₂₀C₂₅ dieter lipidlerine sahip olan bu türün ana polar lipidleri PG, PGP-Me fosfolipidleri ve s2-DGD-1 glikolipididir. PGS'in varlığı gözlenmemiştir.

Anisomisin, basitrasin, novobiosin, vibrostatik ajanlar (0/129) ve trimetoprim+sulfametoksazol'e duyarlı; ampisillin, penisilin, kloramfenikol, eritromisin, neomisin, streptomisin, tetrasiklin, kanarnisin ve vankomisine karşı dirençlidir.

Puerto Rico, Caba Rojo'nun tuzlalanından izole edilen bu türün DNA'sının G+C içeriği 63.3'tür (HPLC) (Montalvo-Rodriguez ve ark. 2000; Boone ve ark. 2001).

Natrialba Cinsi

Natrialba hücreleri, gelişmenin optimum şartlar altında olduğu durumlarda çomak şeklindedir. Genellikle 0.5-1.0 x 1.0-5.0 J-µm uzunluğundadır. Gram negatif, hareketli, zorunlu aerob olan mikroorganizmalarda katalaz ve oksidaz pozitifdir. Bu organizmalar 2.0 M ve 5.3 M (doymuş) NaCl içeren ortamlarda gelişirler. Tuz gölleri, sahil kumlan, tuzlu soda gölleri gibi tuzlu ortamlardan izole edilmiştir. Bu cinsin bütün türleri C₂₀C₂₅ dieter lipidlerine sahiptir. İnce tabaka kromatografisinde veya kütle spektrofotometre analizlerinde polar lipid komponentlerinin fosfatidil gliserol (PG) ve fosfatidil gliserofosfatın metil esteri (PGP-Me) tespit edilmiştir.

Bu cinsin bazı türleri nötrofilik, bazıları ise alkalifiliktir. Bazı türün hücreleri kırmızımsı pembe pigment içerirken, bazıları da pigmente sahip değildirler. DNA'nın G+C mol yüzdesi 60.3-63.1 'dir (Tm) (Boone ve ark. 2001).

Natrialba asiatica

Hindistan'daki Smbhar Tuz Gölü'nün alkali tuzlu suyundan izole edilmiştir. Hücreler sıvı kültürde hareketli ve 0.5-0.8 x 4-10 µm büyüklüğünde uzun çomaklar halindedir. Katı besiyerinde ise küresel, 1-1.5 mm çapındadır. Zorunlu alkalifilik olan halofiller optimum gelişme için %17.5 NaCl'ye ve pH 9.5'a ihtiyaç gösterirler.

NaCl'ye olan gereksinim kısmen KCl ile de yer değiştirebilir. Büyüme %6 NaCl ve %12 KCl ile sağlanabilir. Ancak %20 KCl'de büyüme görülmez. Koloniler açık pembe ve gaz keselerinin varlığında mattır.

C₂₀C₂₀ ve C₂₀C₂₅ polar lipidlerini içerirler. Hücre membranı s2-DGD-1 glikolipidlerinin az bir miktarını bulundurur. DNA'nın G+C mol yüzdesi 60.2±004 'tür (Tm) (Kamekura ve Dyall- Smith, 1995; Boone ve ark. 2001).

Natrinema Cinsi

Natrinema hücreleri çomak şeklinde, 1-5 x 0.6-1.0 µm uzunluğundadır. Ancak uygun olmayan koşullar altında düzensiz şekilli olabilirler. Koloniler parlak kırmızımsı-turuncu veya açık turuncu renklidir. *Natrinemalar* katı besiyerinde 1-2 mm çapında , düz, kare, dairesel ve konveks olarak gelişirler. Gram negatif olan hücreler kemoorganotrof ve zorunlu aeropturlar. Nitrojen kaynakları kazamino asitler, karbon kaynakları ise kazamino asitler ve gerekli şekerlerdir. Gelişebilmeleri için optimum tuz konsantrasyonları 3.4-4.3 M'dır ve optimum pH 7.0-7.6'dır. Jelatin sindirilir, nişasta ise sindirilmez, sülfat ve indol üretimi olmaz.

C₂₀C₂₀ ve C₂₀C₂₅ dieter lipidlerine sahiptirler. Ayrıca karakteristik ama henüz tanımlanmamış çeşitli glikolipidlere sahiptir. *Natrinema* türleri fosfatidil gliserol (PG) ve fosfatidil gliserofosfatın metil esteri (PGP-Me) içerirler.

Major komponentin G+C mol yüzdesi 69.9 ve minör komponentin mol yüzdesi ise 60.0'dır.

Natrinema türleri anisomisin; basitrasin, novobiosin ve vibrostat ayıraçlarına (0/129) ve trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı duyarlıdır.

Natrinema cinsleri bozulmuş tuzlu balıklar ve deriden izole edilmiştir. Ayrıca tuz göllerinden ve deniz tuzlarından da benzer türler izole edilmiştir (McGenity ve ark. 1998; Boone ve ark. 2001).

Natrinema pellirubrum

Çomak şekilli olan hücreler 1-4 x 0.6-1.0 µm uzunluğundadırlar. Koloniler içerdiği karotenoidlerden dolayı parlak kırmızı veya turuncu renklidirler. Gelişme için optimum NaCl 3.4-4.3 M'dır. Kemoorganotrof ve zorunlu aerop olan bu türün azot kaynağı kazamino asittir. Karbon kaynakları ise, kazamino asitler fruktoz, laktoz, riboz ve glukozdur. Jelatinaz pozitifdir. Nitrat nitrite indirgenir ve gaz oluşumu gözlenmez. İndol üretilmez, nişasta sindirilir. C₂₀C₂₀ ve C₂₀C₂₀ dieter lipidlerine ve glikolipidlere sahiptir. Anisomisin, basitrasin, novobiosin,

vibrostatik ajanlar (0/129) ve trimetoprim+sulfametoksazol'e duyarlı; ampisilin, kloramfenikol, rifampisin, streptomisin ve tetrasikline dirençlidir.

Tuzlanmış derilerden izole edilen ve büyük plazmidlere (144 kb) sahip olan bu türün DNA' sının major komponentinin G+C mol yüzdesi 69.9 (Bd), minör komponentinin ise 60.0 (Bd)'dır (Boone ve ark. 2001).

Natrinema pallidum

Çomak şekilli ve 1.5-6.0 x 0.7-1.0 µm uzunluğunda olan hücreler kötü koşullar altında düzensiz şekil alırlar. Soluk turuncu renkli veya genellikle renksiz olan koloniler küresel, düz, konveks ve 1-2 mm çapındadırlar. Gelişebilmeleri için optimum pH 7.2-7.6, optimum NaCl 3.4-4.3 M, sıcaklık ise 37-40°C'dir. Kemoorganotrof ve zorunlu aeropturlar. Azot kaynakları kazamino asitlerdir. Karbon kaynakları ise kazamino asitler, glukoz, fruktoz ve laktozdur. Nitrat nitrite indirgenir. İndol ve amilaz negatiftir. Tuzlanmış balık ve derilerden izole edilen bu tür C₂₀C₂₀ ve C₂₀C₂₅ dieter lipidlerine sahiptir. Anisomisin, basitrasin, novobiosin, vibrostatik ajanlar (0/129) ve trimetoprim+sulfametoksazol'e duyarlı; ampisilin, kloramfenikol, eritromisin, streptomisin ve tetrasikline dirençlidir (Boone ve ark. 2001).

***Natronobacterium* Cinsi**

Natronobacterium logaritmik üreme fazında sıvı ortamlarda çomaklar şeklindedir. Genellikle 0.5-1.0 x 2-15 µm. Gram negatif, kemoorganotrof, hareketsiz ve zorunlu aerop olan mikroorganizmaların dinlenme safhaları bilinmemektedir. Aşırı halofilik olan *Natronobacterium*'larda katalaz ve oksidaz pozitifdir. Nitrat ve nitrit indirgenmez. Jelatin sindirilir, nişasta sindirilmez. Tiyosülfattan sülfite üretilir (Boone ve diğ., 2001). Bu organizmalar 2-5.2 M NaCl içeren ortamda gelişirler ve gelişmeleri için optimum tuz konsantrasyonu 3.5 M'dir. *Natronobacterium* minimum 20-25°C'de pH 8.5 -11.0 olan alkalifilik ortamlarda gelişir fakat optimum gelişme 37°C'de 3.5 M NaCl içeren ve pH 9.5

olan ortamlarda olur. Bu organizmalann glikolipidleri bulunmamaktadır (Boone ve ark. 2001)

Natronobacterium'lar, katı besiyerinde üreyen 1-1.5 mm çapında olan ve koklar halinde gelişen hücrelerdir. Hücre duvarında antijenik olarak farklı olan büyük bir glikoprotein yapısı bulunmaktadır. Hücreler bakterioruberinlere ve retinal pigmentlere sahiptir fakat bakteriorhodopsin içermezler. Polar lipidleri 2,3-di-O fitanil-sn-gliserol ($C_{20}C_{20}$) ve 2-O-sesterterpanil fitanil-3-O- fitanil gliserol ($C_{25}C_{20}$) dieterleridir. Az miktarda 2,3-di-O-sesterterpanil gliserol ($C_{25}C_{25}$) dieterleri bazı suşlarda olabilir. Tüm türlerde oldukça benzer yapıda polar lipidler bulunmaktadır.

Bir kaç minor fosfolipidlerin varlığına veya yokluğuna göre farklılık oluştururlar. Ana polar lipidleri ise PG ve PGP'nin türevleri olan $C_{20}C_{20}$ ve $C_{25}C_{20}$ ile az miktardaki bir kaç karakterize olmamış fosfolipidlerdir (Morth ve Tindall 1985; Tindall 1992; Boone ve ark. 2001).

Tüm türler penisilin, kloramfenikol, streptomisin ve tetrasikline karşı dirençli, anisomisin, basitrasin, novobiosin ve vibrostat ayıraçlarına (0/129) karşı duyarlıdır. (Boone ve ark. 2001).

Mısır'daki Natrun Vadisi, Kenya'daki Magadi Gölü ve Kaliforniya'daki Owens Gölü'nün mikroorganizma populasyonunun önemli bir kısmını *Natronobacterium*'lar oluşturur. Magadi Gölü'ndeki tuzların rengi bu organizmaların varlığından dolayıdır.

Natronobacterium'ların genellikle soda göllerinde bulunduğu bildirilmiştir. DNA' daki minor komponent toplam DNA'nın %10-30'dur ve minor komponenti olan türler genellikle büyük plazmidlere sahiptir (144 kb). Major komponentin G +C mol yüzdesi 61.2-64.6 ve minor komponentin mol yüzdesi ise 49.7-51.9 dur. (Boone ve ark. 2001).

Natronobacterium gregoryi

Bu türün tüm özellikleri cinsin altında verilenleri kapsamaktadır. Gelişme riboz, fruktoz, glukoz, mannoz ve sukroz ile uyarılır. Ampisilin ve tetrasikline

karşı dirençlidir. Novobiosin, basitrasin, anisomisin, siprofloksasin ve perfloksasine karşı duyarlıdır.

Bu türü n DNA'sının G+C mol yüzdesi 65.0 (Tm); 63.2-65.0 'dir (Boone ve ark. 2001).

***Natronococcus* Cinsi**

Dinlenme safhaları bilinmeyen ve Gram reaksiyonları değişken olan *Natronococcus*'ların 1-2 µm çapında koklar olduğu bildirilmiştir. Sıvı kültürden alınarak mikroskopta incelenen preparatlar bu organizmaların monokok, diplokok ve kümeler halinde görüldüğünü açıklamıştır. Hareketsiz, zorunlu aerop ve halofilik olan bu *Natronococcus* türlerinde oksidaz ve katalaz pozitifdir. Karbonhidratlar tarafından gelişme uyarılabilir. Nitrat indirgenebilir. Jelatin ve nişasta sindirilir. Tiyosülfattan sülfite üretilir (Tindall 1992; Boone ve ark. 2001).

Bu organizmalar 1.4-5.2 M NaCl içeren ortamlarda gelişimlerini sürdürürler. Düşük konsantrasyonlarda magnezyuma (>10mM) ihtiyaç gösterirler. Kemoorganotrof olan ve glikolipidleri bulunmayan bu organizmaların gelişmeleri için optimum tuz konsantrasyonu 2.5-3.0 M' dir. Optimum sıcaklık 35- 40°C ve optimum pH ise 9.5 olan bu organizmaların ayrıca maksimum 45°C, minimum 20-25°C. ve pH 8.5-11 'de geliştikleri de açıklanmıştır (Valera, 1988; Boone ve ark. 2001).

Monokok veya diplokoklar oluşturan *Natronococcus* bakterileri 4 M NaCl' den daha fazla tuz konsantrasyonunda gelişirler. Bu organizmaların hücre duvarında glikoprotein varlığı tespit edilmemiştir (Tindall 1992; Valera 1988; Boone ve ark. 2001).

Natronococcus'ların DNA' sının major G+C mol yüzdesi 64.0 ve minor komponentindeki mol yüzdesi ise 55.7 'dir. (Boone ve ark. 2001).

Katı besiyerinde 37°C'de 5-7 günlük inkübasyon sonucunda *Natronococcus* kolonilerinin yuvarlak, mat, 2-3 mm çapında soluk kahverengi renkli oldukları açıklanmıştır. Bazı durumlarda bu organizmaların pürüzlü yüzeyler oluşturdukları saptanmıştır. Bakterioruberinlerin varlığı bilinmemektedir. Hücrelerin retinal pigmentler içerdikleri fakat bakteriorhodopsin

içermedikleri ifade edilmiştir. Polar lipidlerinin 2,3-di -O-fitanil-sn-gliserol ($C_{20}C_{20}$) ve 2-O-sesterterpanil-3-O-fitanil-sn gliserol ($C_{20}C_{25}$) dieterlerinden olduğu saptanmıştır. Polar lipidleri fosfatidil gliserol (PG) ve metil fosfatidil gliserofosfat (PGP-Me)'m dieter türevlerine sahiptir (Morth ve Tindall 1985; Boone ve ark. 2001).

Natronococcus occultus

Küre şeklinde olan hücreler hareketsiz ve aerobiktirler. Gelişme için optimum NaCl konsantrasyonu 3.5-3.6 M, Mg^{+2} konsantrasyonu ise 10 mM'dır. Optimum sıcaklık ise 35-40°C'dir. Soluk kahverengi olan kolonilerin gelişmesi glukoz, riboz ve sukroz ile uyarılır. Nitrat indirgenir. Jelatin sindirilir. Tiyosülfattan sülfid üretilir. Ampisilin, kloramfenikol, polimiksin, streptomisin ve tetrasikline dirençli; novobiosin, basitrasin ve anisomisine hassastır. Polar lipidleri $C_{20}C_{20}$ ve $C_{20}C_{25}$ dieter türevleridir.

Bu türün DNA'sının major komponentinin G+C mol yüzdesi 61.2, minör komponentinin ise 51.9' dur (Boone ve ark. 2001).

Natronomonas Cinsi

Kısa çomaklar halinde olan *Natronomonas* hücreleri sıvı besiyerinde 0.8 x 1-3 µm uzunluğundadır. Hücreler Gram negatiftir ve hareketleri polar kirpik yardımıyla olur. Kemoorganotrof ve zorunlu aerob ve halofilik olan bu türler 2-5.2 M NaCl içeren ortamlarda gelişirler ve optimum konsantrasyonları 3.5 M NaCl'dir. Alkalifilik olan bu türler pH 7-10 aralığında gelişir ve optimum pH 8.5-9.5'tir. 25-30 °C'de gelişme gösterirler. Bu mikroorganizmalar şekerlerden faydalanmazlar. Azot kaynağı olarak kazamino asitler ve glutamati kullanırlar. Birçok tür tarafından jelatin sindirilir. Tiyosülfattan sülfid oluşturulur. Triptofandan indol yapılır. Nişasta ve kazein sindirilmez. Nitrat nitrite indirgenir. Koloniler C_{50} karotenoidlerinin varlığından dolayı kırmızı renklidir.

Polar lipidleri fosfatidil gliserol (PG), fosfatidil gliserofosfatın metil esteri (PGP-Me), fosfatidik asit (PA) ve tanımlanmamış fosfolipid (PL1)'in gliserol

dieter analoglarıdır. Difitanil ($C_{20}C_{20}$) ve fitanil-sesterpanil ($C_{20}C_{25}$) tespit edilmiştir.

DNA'nın G+C major komponentlerinin mol yüzdesi 61.2 (Bd)-64.3 (Tm); minor komponentinin mol yüzdesi ise 51.9 (Bd)' dur. Büyük plazmidlere (144 kb) sahiptir.

Natronomonas'ların kolonileri 37°C'de 5-7 günlük gelişme sonunda, 1-2 mm boyutunda, ışığı geçiren ve kırmızı renkli koloniler oluşturdıkları tespit edilmiştir. İlk alkalifilik aşırı halofil olarak tanımlanmıştır (Boone ve ark. 2001).

Natronomonas pharaonis

Kırmızı renkli ve 1-2 mm çapında olan koloniler hareketli çomaklar halindedirler. Bu türe ait diğer özellikler cins altında belirtildiği şeklindedir. Wadi Soda Gölü'nün alkali tuzlasından elde edilen bu türün DNA'sının major komponentinin G+C mol yüzdesi 64.3 (Tm) ve 61.2 (Bd), minör komponent i ise 51.9 (Bd)' dur (Boone ve ark. 2001).

Natronorubrum Cinsi

Gram negatif, düzensiz, düz şekilli hücreler olan *Natronorubrum*'lar aşırı halofilik ve alkalifiliktirler. En az 2 M NaCl ve 8.0- 11.0 aralığındaki pH değerine ihtiyaç duyarlar. Optimum pH 9.0-9.5 ve optimum sıcaklık 45°C'dir. Kolonileri kırmızı renklidir. Kemoorganotrof ve aéropturlar. Katalaz ve oksidaz pozitifdir. Maya özütü ve kazamino asitler organik besinlerin kaynağıdır. Çeşitli karbonhidratlar (glukoz, maltoz, fruktoz, sukroz ve laktoz) büyümeyi ve bazen de asit üretimini uyarır. Nişasta sindirilmez, indol üretilir.

Polar lipidler $C_{20}C_{20}$ ve $C_{20}C_{25}$ 'in türevleri olan fosfatidil gliserol (PG), fosfatidil gliserofosfatın metil esteri (PGP-Me) ve tanımlanmamış minör fosfolipidlerdir.

Tibet'te bulunan Bange tuzlu alkali gölünün sedimentlerinden izole edilen; hareketsiz, düzensiz, düz, üçgen, kare, disk veya poligonal şekilli ve 1-3 µm

çapında olan *Natronorubrum* cinsinin DNA'sının G+C mol yüzdesi 59.9-60.1 'dir (Tm) (Tindall ve ark. 1980; Boone ve ark. 2001).

Natronorubrum bangense

Düzensiz şekilli ve hareketsiz olan hücreler 1-3 µm çapındadır. Gelişebilmek için optimum 3.8 M NaCl'ye ve 9.5 pH'ya ihtiyaç duyarlar. Aerop olan bu türlerde nişasta, kazein ve Tween 40, 60, 80 sindirilmez, nitrat ise indirgenmez.

Tibet'in tuzlu alkali gölü olan Banj'dan izole edilen bu türün DNA'sının G+C mol yüzdesi 59.9 (Tm)'dur (Boone ve ark. 2001).

Natronorubrum tibetense

Hareketsiz, aerop olan bu türde optimum gelişme 3.4 M NaCl'de sağlanır. Optimum pH ise 9.0'dır. Triptofandan indol üretilir. Glukoz, maltoz, fruktoz, sukroz, laktoz ve asetat gelişmeyi uyarır. Tween 40 ve 60 sindirilir. Nitrat indirgenmez.

Tibet'in tuzlu alkali gölü olan Banj'dan izole edilen bu türün DNA'sının G+C mol yüzdesi 60.1 (Tm)'dir (Boone ve ark. 2001).

1.4.2. Halofilik Ve Halotolerant Bacteria

Halofiller bakteriyal domain içinde tüm filumlar içerisinde yayılmışlardır. Halofilik bakteriler fizyolojik özelliklerine göre çok farklılık gösterirler: Aerobik ve anaerobik kemoototroflar, fotoototrofik ve fotoheterotrofik türler olduğu kadar kemolitotrofik türler.

Hipersalin ortamlardan izole edilmiş bakterilerin çok azı %15'den fazla tuzlulukta gelişebilmektedir. Bunlar arasında anaerobik halofillerden *Halanaerobiales* ve *Halorhodospira* (anoksijenik fotosentez yapabilen halofilik alkalofil) üyeleri, *Actinopolyspora* (doymuş tuz konsantrasyonlarında gelişebilen aktinomiset) ve *Salinibacter* (aerobik, heterotrofik, pigmentli) bulunmaktadır.

Tablo 1.5.'de farklı hipersalin ortamlardan izole edilmiş Bacteria üyeleri ve bunların optimum tuz aralıkları verilmiştir.

Tablo 1.5. Hipersalin Çevrelerden İzole Edilmiş Olan Bacteria Üyeleri Taksonomisi ve Optimum Tuz Aralıkları (Oren, 2002)

Phylum <i>Proteobacteria</i>		
Ordo <i>Chromatiales</i>		
Fam. <i>Ectothiorhodospiraceae</i>		
Genus	Species	Optimum Tuz Aralığı (g/l)
<i>Arhodomonas</i>	<i>A. aquaeolei</i>	150
<i>Halorhodospira</i>	<i>H. halophila</i>	110-320
	<i>H. halocloris</i>	140-270
	<i>H. abdelmalekii</i>	120-180
Phylum <i>Firmicutes</i>		
Ordo <i>Halanaerobiales</i>		
Fam. <i>Halanaerobiaceae</i>		
<i>Halanaerobium</i>	<i>H. lacusrosei</i>	180-200
<i>Halocella</i>	<i>H. cellulolytica</i>	150
<i>Natrionela</i>	<i>N. acetigena</i>	120-150
Fam. <i>Halobacteroidaceae</i>		
<i>Halobacteroides</i>	<i>H. halobius</i>	90-150
	<i>H. elegans</i>	100-150
<i>Acetohalobium</i>	<i>A. arabaticum</i>	150-180
<i>Halanaerobacter</i>	<i>H. chitinivorans</i>	120-180
	<i>H. lacunarum</i>	150-180
	<i>H. salinarius</i>	140-150
Ordo <i>Bacillales</i>		
Fam. <i>Bacillaceae</i>		
<i>Bacillus</i>	<i>B. halophilus</i>	150

Phylum <i>Actinobacteria</i>		
Ordo <i>Actinomycetales</i>		
Fam. <i>Pseudonocardiaceae</i>		
<i>Actinopolyspora</i>	<i>A. halophila</i>	150-200
	<i>A. mortivallis</i>	100-150
	<i>A. iraqiensis</i>	100-150
Fam <i>Nocardiopsaceae</i>		
<i>Nocardiopsis</i>	<i>N. halophila</i>	150
Phylum <i>Bacteroidetes</i>		
Ordo <i>Sphingobacteriales</i>		
Fam. <i>Crenotrichaceae</i>		
<i>Salinibacter</i>	<i>S. ruber</i>	200-250

1.4.2.1. *Salinibacter ruber*

Hücreler hareketli, 2-6x0.4 µm, düzgün ya da hafifçe eğimli çubuklardır. Koloniler agar üzerinde kırmızı, 1mm çapında, yuvarlak ve konvektir. Metanol / aseton (1:1, V/V) içindeki pigment ekstraktları 475 nm’de maksimum absorpsiyon gösterir ve 506-510 nm’de bir omuz verir. Aşırı derecede halofiliktir, 150-300 g/l tuz konsantrasyonlarında optimum gelişir ve büyüme için en azından 150 g/l tuza ihtiyaç duyar.

Büyüme için optimum pH aralığı 6,5-8 arasındır ve pH 6’nın altında ve 8’in üzerinde büyüme gözlenmemiştir. Optimum sıcaklık 37-47 °C’dir. 52 °C’nin üstünde gelişme görülmez. Nitrat indirgenmez. Şekerlerden asit oluşturmaz. Nişasta ve jelatini hidrolize eder. Tween 80 hidrolize edilmez ve Tween 20 zayıfça hidrolize edilir ya da hiç edilmez. L-triptofandan indol oluşturmaz. Penisilin-G, ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, novobiosin, rifampisin ve siproflaksine duyarlıdır. Kanamisin, basitrasin, tetrasiklin, kolistin, anisomisin ve afidikoline dirençlidir.

DNA’nın G+C oranı %66,5’dir. Tip straini M31, İspanya’da Mallorca, Baleorik Adalarındaki tuzla kristalize havuzlarından izole edilmiştir (Anton ve diğ., 2002).

1.4.2.2. *Chromohalobacter marismortui*

Hücreler gram negatif, hafif kavisli, hareketli, 0.6-1.2x1.5-4.2 µm boyutlarında çubuk şeklindedirler. Tek, çift ya da kısa zincirler halinde bulunabilirler. Spor oluşturmazlar. Koloniler krem renkli, kahverengimsi-sarı pigmentlidirler. Ilımlı halofillerdir. Gelişme için tuza gereksinim duyarlar. Optimum büyüme %8-10 tuz konsantrasyonlarında gerçekleşir. %30'a kadar konsantrasyonlarda gelişebilirler. 5-45 °C sıcaklıklarda ve pH 5-10 aralığında gelişme gösterebilir. Kemoorganotrofturlar. Katalaz pozitifdir. Çoğu straini nitratı indirger fakat H₂S oluşturmaz. Üreaz ve fenilalanin deaminaz negatifdir. Kasein, DNA, eskulin, jelatin, nişasta ve Tween 80 hidrolize edilmez. Arabinoz, glukoz, gliserol, laktoz ve ksilozdan asit üretir. Ölü Deniz ve deniz tuzlarından izole edilmiştir. DNA baz kompozisyonu %62 ile %65 arasında değişir (Arahal ve diğ., 2001).

1.4.3. Halofilik Ve Halotolerant *Eucarya*

Yüksek tuzluluktaki ortamlarda eukaryotik mikroorganizmaların çeşitliliği sınırlıdır. Bununla beraber *Eucarya* hipersalin çevrelerde canlılığa önemli katkılarda bulunur. *Duneliella* generusu yeşil algler, tuza adapte olmuş siyanobakteriler için bile çok tuzlu olan çevrelerde, ana ya da tek birincil üreticilerdir.

Duneliella, hafif tuzlu ortamlardan doymuş sodyum klorid brine'larına kadar yaşayabilen türleri içeren geniş bir genustur. En yüksek tuzlulukta bulunan türleri *Duneliella salina*, *Duneliella bardawil* (her ikisi de çok miktarda beta-karoten içerir) ve daha az tuzluluk seviyelerinde *Duneliella viridis* ve *Duneliella parva*'dır.

Başka bir ilginç eukaryotik halofilik yeşil alg henüz yeni keşfedilmiş olan *Picocystis salinarum*'dur.

Diatomeler de 150 g/l'ye kadar tuzlulukta gelişebilen üyelere sahiptirler. En halotolerant olanlar *Amphora* türleri, *Nitzchia fusiformis* ve *Entomoneis* sp. dir.

Hipersalin göllerden protoozonlar da sıklıkla rapor edilmektedir.

Son olarak bazı funguslar hipersalin çevrelerde nişe sahip olarak bulunabilmektedirler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan fungusların varlığı uzun zamandır göz ardı edilmekteydi. Bununla beraber, belirli bazı fungus gruplarının tuzlalarda ve diğer yüksek tuzlu sulardaki biyotaya önemli katkılar yaptıkları daha açık olarak ortaya çıkmaktadır. Bu funguslardan bir tanesi *Trimmatostroma salinum* 'dur. *Hortea werneckii* gibi kara mayalar ve diğerleri de böyle çevrelerde bulunabilmektedirler (Oren 2002).

1.5. Mikrobiyal Kommünite Analizleri

1.5.1. 16S rRNA Geni ve Önemi

Mikroorganizmalar arasındaki doğal akrabalığı yansıtan prokaryotik sistematüğın geliştirilmesi her zaman taksonomistlerin ana hedefi olmuştur. Bununla beraber, bu akrabalıkların “süzgeçten geçirilmesi” bakteriyal identifikasyon ve sınıflandırmaya imkan sağlayan moleküler metodlar (makromoleküllerin analizi) geliştirilene kadar başarılamamıştır.

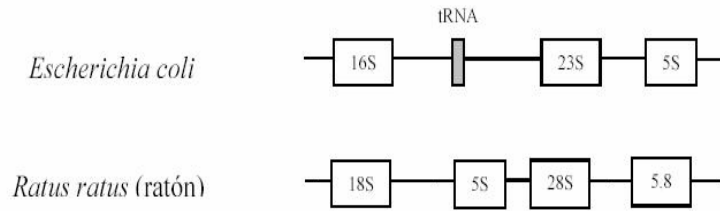
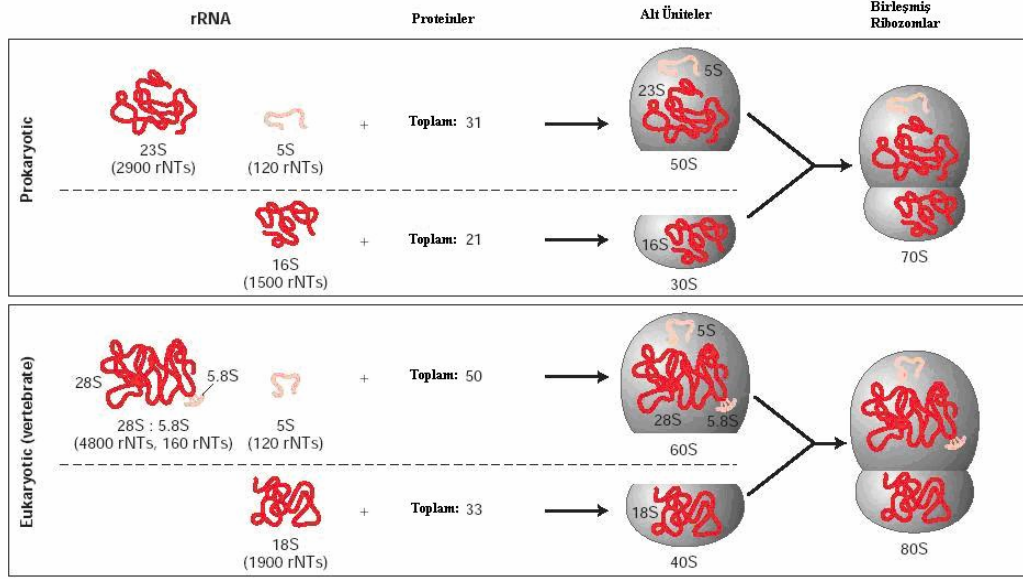
Genomik DNA'nın G+C (guanin+sitozin) oranının belirlenmesi ve hücre duvarı ve lipid kompozisyonlarının analizi gibi kemotaksonomik metodlar çoğu durumda, morfolojik ve fizyolojik özelliklere dayanan klasik metodlardan daha konumdadır. Bu yöntemler taksonların ayrımı için kullanılabilecek bilgi sağlarlar, fakat organizmaların filogenetik akrabalıkları ve etraflı genetik özelliklerini veremezler (Boone ve ark. 2001).

DNA-DNA birleştirme teknikleri, genomik benzerlik ve dolayısıyla indirekt filogeni hakkında bilgi verebilir ama birbirine yakın strainler için bu tekniğın ayırım gücü sınırlıdır.

Zuckerlandl ve Pauling (1965)'in fikri olan, moleküler dizi analizi tekniklerinin iyileştirilmesi, organizmaların filogenetik tarihçeleri için, makromoleküllerin primer yapılarını karşılaştırılabilir hale getirmiştir. Bu amaçla analiz edilen ilk moleküller sitokromlar ve ferrodoksinlerdir. Bunların hemen ardından, Carl Woese ve arkadaşları evrensel filogenetik bir marker olarak küçük

alt ünite rRNA'nın yararlılığını gösterdiler. Bu çalışmalar mikroorganizmalar arasındaki doğal akrabalığı ortaya koyabilecek yeni bir prokaryotik sistematğin önerilmesini sağlamıştır.

Temelde, bir filogenetik marker'da aranan tüm özellikler, küçük alt ünite rRNA'da diğer tüm filogenetik markerlardan çok daha fazlasıyla mevcuttur. Şekil 1.8. de prokaryot ve eukaryotlardaki rRNA yapıları görölmektedir (Ludwig ve Klenk 2001).



Prokaryot ve Eukaryotlarda rRNA'nın organizasyonu. (Beyaz kutular farklı rRNA tiplerini gri kutu ise tRNA'yı temsil etmektedir.)

Şekil 1.8. Eukaryot ve Prokaryotlardaki Ribozom Genel Yapısı (Lodish ve diğ., 2003)

Fonksiyonel sabitliği yanında, heryerdeki dağılımı ve büyük yapısı (bilgi içeriği açısından) ile küçük alt ünite rRNA'yı kodlayan genler hem evrimsel olarak korunmuş bölgeleri hem de son derece değişken yapı elementlerini içermektedir. Sonuncu karakteristiği, bağımsız yapı elementleri üzerine farklı fonksiyonel seçici baskıların oluşumu sebebiyledir. Dizi korunumunun bu değişebilen derecesi, tür düzeyinden domain düzeyine kadar geniş bir akrabalık için filogeninin kurulmasına olanak tanır. Çok yönlü küçük alt ünite rRNA dizi bilgileri setleri (şu anda 16.000'den fazla) herkese açık bilgi bankalarında

(database) tekst ya da işlenmiş (aligned) formatta ve hızla artan bir şekilde mevcut durumdadır (Ludwig ve Klenk 2001).

Doğru tanımlanmış prokaryotik türlerin önemli bir kısmı tür strainleri ya da yakından ilişkili strainlerden gelen 16S rRNA dizileriyle temsil edilmektedir. Taksonomi alanındaki yeni tekniklerden biri ile küçük alt ünite rRNA dizilimlerinin karşılaştırılması, mikroorganizmaların identifikasyonu ya da doğal akrabalıklarına göre prokaryotik taksonların oluşturulmasında ya da tanımlanmasında çok güçlü standart bir metodur.

Dizilemedeki hızlı ilerleme ve in vitro nükleik asid amplifikasyon teknolojisi, pahalı karmaşık ve yorucu teknikler yerine, hızlı ve rutin uygulaması kolay tekniklerin kullanılmasına yol açmıştır.

Sonuçta, küçük alt ünite rRNA'yı kodlayan genin analizi prokaryotik identifikasyon ve sistematikte en çok kullanılan sınıflandırma tekniğidir (Boone ve ark. 2001).

1.5.2. 16S rRNA Geni Üzerinden Mikrobiyal Kommünite Analizleri

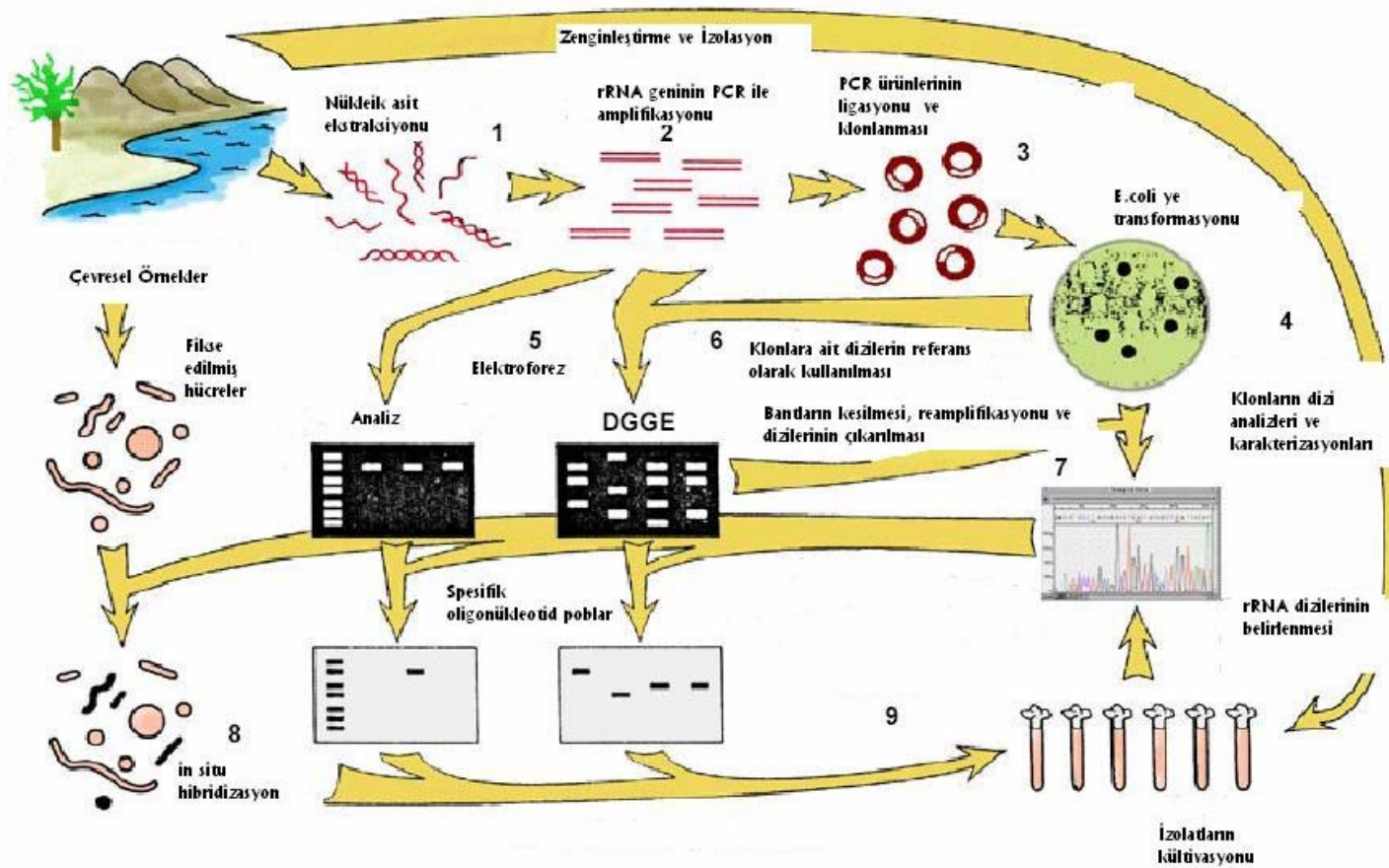
Uzun yıllar boyunca mikroorganizmalar üzerine çalışmalar ve analizler bunların saf kültürlerinin eldesine bağlıydı. Bu genel durum kültür edilemeyen çok farklı organizmaların da o habitatlarda bulunduğunu gösteren çeşitli çalışmalarla aşılmaya başlandı. Bu çalışmalar kültüre alma tekniklerinden bağımsız olarak çalışılan çevrede mevcut olan organizmaları açığa çıkarabilmekteydi (Staley ve Konopka 1985; Aman ve ark. 1995).

Olsen ve arkadaşlarının (1985) çalışması ile çevresel örneklerden elde edilen rRNA dizileri o çevrenin çeşitliliğinin ortaya konmasında bir araç olarak kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda Head ve arkadaşları (1998) bu yöndeki çalışmalara hız vermişlerdir ve rRNA giderek artan bir şekilde mikrobiyal kommünite analizlerinde kullanılır hale gelmiştir.

İlk çalışmalar çevresel örneklerden direkt olarak izole edilen ribozomal DNA'nın klonlanmasını içerir. Çevresel DNA örneklerinden gelen bu klonların daha sonra dizi analizine sokulması ile identifikasyon yapılmaktadır. Moleküler mikrobiyal ekoloji çalışmalarını bir adım daha öne götüren diğer teknik ise PCR

olmuştur. Çevresel örneklerin rRNA amplifikasyonlarını takiben dizi analizlemeleri komünite analizlerine hız kazandırmıştır (Mullis ve Floona 1987; Saiki ve ark. 1988). Grup spesifik primerlerin bulunmasıyla yöntem giderek daha başarılı hale gelmiştir. 16S rRNA'nın çevresel örnekten (terrestrial ya da aquatik ortamlardan) direkt amplifikasyonla eldesinden sonra bunların gen kütüphanesi oluşturulup otomatik dizi analizleme ile yeni tip mikroorganizmalar bulunabilmiştir (Torsvik ve ark. 1990; Liesack 1992; Grant 1999; DeLong 1993; Fuhrman 1993; Stackebrandt 1993; Benlloch ve ark. 1995; Benlloch ve ark. 2001).

Şekil 1.9. da prokaryotik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan temel molekül teknikleri özetlemektedir. Burada verilen teknikler genel olarak “rRNA yaklaşımı” olarak bilinmektedir. İlk olarak nükleik asitlerin ekstraksiyonu ile başlayan süreç daha sonra rRNA genlerinin PCR ile amplifikasyonu ile devam etmektedir. Elde edilen ürünler klonlanarak gen kütüphanesi oluşturulur. Klonlar dizi analizine tabi tutulur ve elde edilen sonuçlar bilgi bankasındaki diğer dizilerle karşılaştırılır. PCR ile elde edilen ürünler Denatüre Edici Gradient Jel elektroforezi (DGGE) adı verilen teknikle de analiz edilebilir. Bu teknik klon kütüphanesine de uygulanabilmektedir. Bunlara paralel olarak floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği de kültüre almaya gerek duymadan komünite analizini sağlayabilen bir diğer etkili yöntem olarak kullanılabilir. Tüm bunların yanında çevresel örnekten yapılan mikroorganizma izolasyonları da tamamlayıcı olarak bu yaklaşımda yer alır (Head ve ark. 1998).



"rRNA approach" (Head y col., 1998)

Şekil 1.9. "rRNA yaklaşımı" (Head ve ark. 1998)

1.5.2.1. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH)

rRNA hedefli problemlerle floresan in situ hibridizasyon (FISH), bir ön kùltüre alma işlemleri yapılmadan, epifluoresans ve konfokal lazer tarama mikroskobu kullanarak ya da flow sitometri yöntemleri ile karışık bakteri topluluğunun filogenetik identifikasyonuna izin veren bir boyama tekniğidir (Boone ve ark. 2001).

Polinùkleotid DNA problemleri ile FISH ve spesifik oligonùkleotidlerle FISH tanımlanmış durumdadır. Bakteriyal identifikasyon, bakteriyal komünite yapısı analizleri, ayrı mikrobiyal popülasyonların kendi habitatlarında zamansal ve mekansal dinamiklerinin araştırılması gibi amaçlar için kullanılabilirler.

Teoride, bakteri hücresindeki 5S, 16S ve 23S rRNA'nın birer kopyasını içeren her bir ribozom, hibridizasyon prosedürü boyunca bir prob ile boyanır, her hücrede çok sayıda bulunması nedeniyle de doğal sinyal amplifikasyonu sistemi oluşur. Metod temelde bakteriyal küçük alt ünite (16S rRNA) rRNA dizilerinin hızlıca artışına dayanmaktadır (Boone ve ark. 2001).

Daha az olarak büyük alt ünite olan 23S rRNA'yı hedefleyen problemler de oluşturulmuştur. Fakat bu, hali hazırda fazla olmayan 23S rDNA dizi bilgileri yüzünden zorluklar çıkarmaktadır.

Bakteriler için FISH, on yılı aşkın bir süre önce ilk olarak tanımlanmıştır ve mikrobiyal ekoloji çalışmaları için bir dönüm noktası olarak değerlendirilmektedir (Pernthaler ve Amann 2001)

1.5.2.2. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroföresi (DGGE)

Denatüre edici gradient jel elektroföresi ile aynı uzunlukta olan fakat farklı baz dizilimlerine sahip DNA fragmentlerinin ayrımı yapılabilir. DGGE'de ayrım, doğrusal olarak artan miktarda DNA denatürantı (formamid ve üre) içeren poliakrilamid jel içindeki çift iplikli kısmen denatüre olmuş DNA molekülünün elektroforetik hareketine dayanmaktadır. Fragmentlerin denatürasyonu "melting domains" denilen ayrımı gerçekleştirir ki bu identik denatürasyon sıcaklığında baz çiftlerinin açılmasıdır. En düşük denatürasyon sıcaklığına sahip "melting domain"

DGGE jelindeki belirli bir pozisyonda, kendi denatürasyon sıcaklığına (T_m) ulaştığında, helikal yapının kısmen denatüre moleküle dönüşümü gerçekleşir ve molekülün göç olayı pratik olarak sonlanır. Bunun gibi, domainlerdeki dizilim farklılıkları, denatürasyon sıcaklıklarının farklılık göstermesine neden olmaktadır. Belirli fragmentlerdeki dizilim farklılıkları bu nedenle denatüre edici gradient jellerde farklı pozisyonlarda göç olayının sonlanmasına sebep olmaktadır ki bu sayede bunların ayırımları DGGE ile çok etkili bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Muyzer ve ark. 1996, Muyzer ve ark. 2001)

Bu yaklaşım kullanılarak, dizilim varyanslarının %50'si 500 baz çiftine (bç)'ne kadar olan DNA fragmentlerinde belirlenebilmektedir. Bu oran, yüksek sıcaklık melting domaini olarak iş gören GC-zengin dizilerin DNA fragmentine eklenmesiyle %100'e kadar çıkarılabilmektedir. GC-clamp'ların eklenmesi klonlama ile ya da 40 bç'lik GC-zengin dizilerin PCR primerlerinin 5' ucuna eklenmesi ile oluşturulmuş DNA fragmentlerinin kullanılması ile (kısacası PCR ile) yapılabilmektedir (Muyzer ve ark. 2001).

Denatüre edici gradient jellerin iki farklı tipi vardır; perpendikular (dikey) jeller ve paralel jeller. Perpendikular jeller soldan sağa doğru giderek artan denatürant gradientine sahiptirler ve elektroforez yönüne dik konumdadır. Örnek jelin tüm genişliği boyunca uygulanır ve yaklaşık 3 saat elektroforez işlemi yapılır. Jel etidyum bromid ile boyandıktan sonra, UV aydınlatmada elektroforetik pattern sigmoid şekilli bir eğri gibi görünecektir. Denatürant konsantrasyonunun düşük olduğu jelin sol tarafındaki DNA molekülleri çift iplikli DNA olarak göç edecektir. Jelin diğer tarafında, yani denatürant konsantrasyonunun yüksek olduğu tarafta moleküller jele girer girmez dallanmış moleküller olarak ayrılacaklar ve bu nedenle direkt olarak göçleri duracaktır. Denaturantın orta konsantrasyonlarında farklı denatürasyon derecelerine sahip olan moleküller ardışık olarak farklı göçler yapacaklardır. Perpendikular jeller DNA fragmentlerinin denatürasyon davranışlarının tespiti için kullanılmaktadır. Buna ek olarak bu jellerden, paralel DGGE'de çoklu örnek analizleri için, denatürantın optimal gradienti belirlenebilir (Muyzer ve ark. 2001).

Paralel gradient jeller üst kısmından en alt kısmına doğru artan denatürant gradientine sahip jellerdir ve elektroforez yönüne de paraleldirler. Aynı jel

üzerinde çok sayıda örneğin analizi için kullanılırlar. Paralel jellerde örneklerin analizinden önce, iki ya da daha fazla DNA fragmenti arasındaki maksimum ayırım için elektroforez zamanının uzunluğu belirlenmelidir. Bu amaçla iki PCR fragmentinin karışımı paralel jellere sabit zaman aralıkları içinde yüklenir ki buna “zaman seyahati” deneyi de denir (Muyzer ve ark. 2001).

2 rDNA fragmentinin bir karışımı jele 3 saat boyunca her 10 dakikada bir olmak üzere uygulanır. 30 dakika için tüm fragmentler çift iplikli DNA olarak bir tek bant halinde göç ederler. 40 dakika sonra bir fragment denatüre olmaya başlar ve hareket hızı azalır. Diğer DNA fragmenti hala çift ipliklidir ve denatürant konsantrasyonunun daha yüksek olduğu yerde duruncaya kadar jelde ilerlemeye devam eder.

İzole edilmiş genlerde ya da PCR ile amplifiye edilmiş DNA fragmentlerinde mutasyon tespitinden başka, DGGE tekniği milyonlarca baz çifti içeren genomlara sahip organizmaların genomik DNA’larının analizi için de kullanılabilir. Bu amaç için, restriksiyon nükleazlar kullanılarak fragmentler halinde kesilen DNA’nın bir ya da iki doğrultuda ayırımının yapılması sağlanır. Bunun ardından kompleks ayırım patternleri elektroblotting işlemi ile naylon membranlara transfer edilir ve işaretli nükleotid problemleri ile hibridize edilir.

Farklı mikrobiyal komünitelerden PCR ile amplifiye edilmiş olan 16S rDNA fragmentlerinin DGGE analizi ayırım patterninde bulunan bu popülasyonlar içindeki predominant türlerden kaynaklanan, birkaç farkedilebilir (5 ila 10 arasında) bandın varlığını ortaya koymuştur.

Elektroforetik pattern naylon membranlara transfer edildikten sonra hibridizasyon analizi için kullanılan spesifik problemler ile tür kompozisyonu üzerine daha detaylı bilgiler elde edilir.

Sülfat redükleyen bakteriler için kullanılan bir spesifik prob, bakteriyal biyofilmdeki bu türlerin anaerobik koşullarda olduğu kadar aerobik şartlarda da varlığını ortaya koymuştur. Buna ek olarak, komünite üyeleri arasındaki filogenetik ilişkiler, tek bantların dizi analizlerinin yapıp bilinen 16S rRNA dizileriyle karşılaştırılmasından sonra belirlenebilmektedir (Muyzer ve ark. 2001; Boone ve ark. 2001).

Kısacası DGGE, farklı dizi varyantlarının ayrılmasını hızlı bir şekilde (yaklaşık 5 saat) ve ucuza yapabilmektedir. Kommünite yapısı üzerine direkt bir görünüş verir ve tek tek bantların dizi analizlerinden sonra ya da spesifik oligonükleotid problemlerle hibridizasyondan sonra tür kimliklerinin ortaya çıkarılmasını sağlayabilmektedir. Dahası aynı jel üzerinde çok fazla örneği analiz edebilme imkanı verir ki bu populasyon dinamiklerinin çalışılması açısından son derece faydalıdır.

Bununla beraber filogenetik ilişkinin eldesi için tek bantlardan gelen dizi bilgileri sınırlıdır. Çünkü 500 bp'ne kadar olan fragmentler ayrılabilir fakat bu da DGGE bantlarının identifikasyonu için yeterli olmaktadır. Yüksek miktarda çeşitlilik gösteren bakteriyal komünitelerden elde edilen amplifiye edilmiş birçok fragmentin ayrımı güç olabilmektedir. Kümeleşmiş bantların ayrımını güçlendirmek için daha dar gradientli denatürantlar ya da iki boyutlu elektroforez işlemi uygulamaları yapılabilir (Muyzer ve ark. 2001; Boone ve ark. 2001).

1.5.2.3. Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA)

Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon (ARDRA) olarak isimlendirilen teknik 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifiye edilmiş ürünlerinin restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimine dayanmaktadır. İşlem sonunda elde edilen fragmentler jelde elektroforeze tabi tutularak gözlenirler (Vaneechoutte ve diğ., 1992). Bu yöntem ile ortaya çıkarılmış olan patternlere göre, çok kısa zaman içerisinde çok fazla izolata ya da klonu ait, genotipi yansıtan, karakteristik bantlar belirlenerek bunların analiz edilmesi sağlanabilmektedir (Vaneechoutte ve ark. 1992; Weidner ve ark. 1996; Massol-Deya ve ark. 1997; Smit ve ark. 1997)

Özellikle çevresel örneklerden gen kütüphanesi kurularak yapılan çalışmalarda, gen çeşitliliğini kısa sürede gözler önüne süren bir tekniktir.

1.5.2.4. Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA (RAPD)

Mikrobiyal ekoloji çalışmalarında oldukça sık kullanılan bir diğer teknik de rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) dir. Bu teknik türler içi

dağılımın belirlenmesinde ve izolatların tiplendirilmesinde kullanılabilir. Bu yöntemde rastgele seçilmiş primerlerin amplifikasyonları bir populasyon içindeki farklı bireylerde farklı patternler oluşturmaktadır. Bu nedenle RAPD polimorfizmi yansıtabilen bir tekniktir ve genetik marker olarak kullanılabilir (Boone ve ark. 2001).

1.6. Halofilik ve Halotolerant Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Potansiyelleri ve Uygulama Alanları

Halofilik mikroorganizmalar biyoteknolojide çok sayıda ilgi çeken uygulamada yer bulmuşlardır. Biyoteknoloji araştırmalarında ekstremofillerden daha az “çekici” olabilirler, fakat uygulamaya geçmiş örnekler açısından da küçümsenmeyecek derecededirler ve bu örneklerin sayısı gün geçtikçe hızla artmaktadır.

Halofillerin biyoteknolojide kullanımı çeşitli kategorilere ayrılabilir. İlk olarak, yüksek tuz konsantrasyonu varlığı gibi su aktivitesinin az olduğu durumlarda enzimatik transformasyonlarda fonksiyon göstermesi istenen halotolerans özellikteki enzimleri iş görebilir.

İkinci olarak halofillerce üretilen bazı organik osmotik stabilize ediciler ilgi çeken uygulamalara sahiptirler. Üçüncü olarak bazı halofilik mikroorganizmalar değerli bileşikler üretirler. Bunlardan bazıları eşsizdir ve canlılar dünyası dışında başka yerde bulunmazlar.

Tablo 1.6. halofilik Archaea, Bacteria ve Eukarya'nın kullanıldığı en önemli biyoteknolojik uygulamaları göstermektedir (Oren 2002).

<u>Ürün</u>	<u>Üreten Organizma</u>	<u>Kullanımı ve Teknolojideki Durumu</u>
Archaea		
Bakteriyorodopsin	<i>H. salinarium</i>	Holografik depolama materyali, bilgisayar hafızaları ve işlemci birimleri, fotoelektrik dönüştürücüler, ve diğerleri (Tümü deneysel düzeyde)
Farklı karetonoid pigmentleri	Farklı <i>Halobacteriaceae</i> üyeleri	Işık absorpsiyonu, tuzla kristalizasyon havuzlarında evaporasyon artırımı
Poly B Hidroksialkonat	<i>H. mediterranei</i>	Organizma yüksek PHA üretim potansiyelindedir. Endüstriyel çapta üretimi henüz yoktur.
Ekstraselüler Polisakkaritler	<i>H. mediterranei</i>	Organizma değerli ekstraselüler polisakkarit üretimi açısından yüksek potansiyele sahiptir. Petrol kuyularından petrolün kazanımı için kullanılmaktadır. Henüz endüstriyel çapta değildir.
Tuz toleranslı enzimler	Farklı Halofilik Archaealar	Halofilik bakteriler üretimde yer alır. Saf kültürler kullanılmaz, mikrobiyolojik kontrolü kısıtlı olarak yapılır.
Soya sosu, balık sosu	Archaea kadar farklı bacteria üyeleri	Kozmetikte enzim stabilize edici nemlendirici olarak üretilir. Endüstriyel boyutta üretime henüz geçilmiştir.
Bacteria		
Ektoin ve hidroksiektoin	<i>Halomonas elongata</i> <i>Marinococcus</i> M52	Henüz endüstriyel çapta değildir.
Tuz toleranslı enzimler	Archaea kadar farklı bacteria üyeleri	Halofilik bakteriler üretimde yer alır. Saf kültürler kullanılmaz, mikrobiyolojik kontrolü sınırlı yapılır.
Soya sosu, balık sosu	Farklı Bacteria üyeleri	
Eucarya		
B-karoten	<i>Duneliella</i> türleri	Antioksidant ve besin renklendiricisi olarak
Kozmetik için Halofil hücre biyoması	<i>Duneliella</i> türleri	Kozmetik preparasyonlarında katkı maddesi olarak

Tablo 1.6. Halofilik Archaea, Bacteria ve Eukarya'nın kullanıldığı en önemli biyoteknolojik uygulamalar

1.6.1. Halofilik Archaea ile Uygulamalar

Halofilik Archaea üzerine 20. yüzyıl başında yapılan ilk araştırmalar “kırmızı” halofillerin tuzlanmış balık ve derilerde önemli derecede hasar yapması nedeniyledir. Uzun zamandır, deri üzerindeki kırmızı mikrobiyal gelişmenin, *Halobacterium* ve *Halococcus* gibi Archaea’lar yüzünden olduğu bilinmekteydi. Farklı ticari bakterisidlerle muamelenin hasarı önleyebildiği bildirilmiştir (Birbir ve Kalenberg 1996). Belirli geleneksel fermente uzak doğu yiyecekleri gibi halofilik Archaealarca yapılan degradatif süreçler de yararlı özellikler olarak görülmektedir (Oren 2002).

1.6.1.1. Fermente Yiyeceklerin Hazırlanmasında Halofilik Archaea

Uzak Doğuda bazı geleneksel fermente yiyeceklerin üretimi, farklı halofilik ve/veya yüksek oranda halotolerant mikroorganizmaların ve bazı durumlarda *Halobacteriaceae* familyasından Archaeaların aktivitelerini içerir.

Bu süreçlerin mikrobiyolojisi bugün bile tam anlaşılmış değildir. Böyle ürünlerden biri olan “nam pla” Tayland’da üretilen fermente edilmiş balık sosudur. Bu ürün geleneksel olarak iki parça balık ve bir parça deniz tuzu eklenerek yapılır. Karışım konsantre tuzlu su ile kaplanır ve yaklaşık bir yıl fermente olması için bırakılır. *Halobacterium* ve *Halococcus* olarak tanımlanmış olan kırmızı halofilik Archaealar yaklaşık 3 hafta sonra maksimum yoğunluklarına ulaşırlar ve fermentasyon periyodu boyunca bu durumlarını sürdürürler. Halobakteriyal proteazlar bu süreçte muhtemelen rol oynamaktadırlar. Archaea metabolizmasınınca oluşan ürünlerin bu sosun aromasına katkı yaptığı düşünülmektedir.

Halofilik Archaea üzerine son girişimlerden birisi de bunların isoprenoid dieter lipidlerinin emulsifiye edici ve/veya düşük kalorili yağ bileşikleri halinde besinlere katkı maddesi olarak kullanılabileceği yönündedir (Oren 2002).

1.6.1.2. Halofilik Archaea'nın Biyodegradatif Potansiyeli

Hidrokarbon degrade edici halofilik Archaealar tanımlanmış durumdadır. Güney Fransa'da tuzla havuzundan izole edilmiş ve EH4 olarak isimlendirilmiş bir strain, doymuş (tetradekan, hekzadekan, eikosan, heneikosan, pristan) ve aromatik hidrokarbonlar (asenaften, fenantren, antrasen, 9-metialantrasen) üzerinde gelişebilmektedir. %48 ile %88 arasında düz zincir hidrokarbonlar veya %19-24 arasında aromatik hidrokarbonların (0.5 g/l) degradasyonunu, 32 °C'de 30 günlük inkübasyon ile başarabilmektedir.

Hidrokarbon degrade eden kırmızı Archaea da Rusya'daki petrol bölgelerinden izole edilmiştir (Oren 2002).

1.6.1.3. Solar Tuz Üretiminde Halofilik Archaea'nın Rolü

Tuzla kristalize havuzlarında kırmızı halofilik Archaeanın yoğun kommünitelerinin varlığının pozitif etkisi uzun zamandır bilinmekteydi. Böyle havuzlarda kırmızı renklenmenin ana sebebi Archaeadır, fakat β -karotene zengin *Dunaliella* ve hatta kırmızı halofilik, Bacteria sınıfından *Salinibacter*, ışık enerjisinin absorpsiyonuna katkıda bulunurlar.

Solar radyasyonun bu organizmalarca tutulması tuzlu suyun sıcaklığını ve evaporasyon oranını ve dolayısıyla tuz üretimini artırır.

C50 bakterioruberin türevleri *Halobacteriaceae*'nin temel karetonoidleridir. Bununla birlikte, ilave karetonoidler ekonomik değere sahip olabilirler. Mısır, Alexandria yakınlarında deniz suyu buharlaşma havuzlarından izole edilen bir örnek önemli derecede ketokaretonoid kanthaksantan üretmektedir. Bu organizmanın ticari olarak kanthaksantan üretimi için kullanımı önerilmiş durumdadır (Oren 2002).

1.6.1.4. Bakteriyorodopsinin Biyoteknolojik Uygulamaları

Işık yönlendirmeli proton pompası bakteriyorodopsin çok sayıda olası uygulamada kullanılabilecek çok çekici özelliklere sahiptir. 1983 ve 1997 yılları

arasında bakteriorodopsin uygulamalarıyla ilgili olarak yaklaşık 100 patent alınmıştır.

Bu uygulamalar molekülün proton motivesi, fotoelektrik ve fotokimyasal özelliklerine dayanmaktadır. Bazı uygulamalarda ışık enerjisi kimyasal enerjiye dönüştürülür. Bazıları da fotodöngü özelliğini kullanırlar.

Bakteriorodopsin holografik imaj depolamada optoelektronik materyal olarak kullanılabilir.

Tablo 1.7. de bakteriorodopsinin potansiyel biyoteknolojik kullanım alanlarını göstermektedir (Oren 2002).

Tablo 1.7. Bakteriorodopsinin potansiyel biyoteknolojik kullanım alanları

Kategori	Uygulama
Protein transportu	ATP Üretimi Deniz suyunun tuzdan arındırılması Güneş ışığının elektriğe dönüştürülmesi
Fotoelektrizm	Çok hızlı ışık deteksiyonu Yapay retinalar Hareket deteksiyonu
Fotokromizm-Optik depolama	2D depolama 3D depolama Holografik depolama Yardımcı hafızalar
Fotokromizm-Optik süreçler	Optik bistabilite / ışık anahtarlığı Optik filtreleme Sinyal kondisyonlandırma Sinir ağları Boşluksal ışık modulatörleri Faz konjugasyon Pattern tanınması, İnterferometri
Diğer	İkinci harmonik oluşum, radyasyon deteksiyonu, Biosensör uygulamaları

Holografik bakteriorodopsin filmleri bilgisayar hafızalarının yapımı için uygundur. Gelişen teknoloji yeni generasyon bilgisayarların oluşumuna yol açabilecektir. Molekül, bilgisayar hafızalarının ve bilgi işlem ünitelerinin elementi

olarak kullanılacaktır. Optik dönüştürücü (anahtar) element olarak görev yapacak yarı iletkenlerin ileten/iletmeyen safhalarının analogu olacaktır. Yüksek yoğunluklu bilgi depolanması da bu molekülün kullanımı ile mümkündür ve tüm bilgiler eş zamanlı olarak işlenebilecektir.

Bakteriyorodopsin filmleri yüksek rezolusyon gösterirler ve mükemmel geri dönüşebilirliğe ($>10^6$ yazma/silme döngüsü) sahiptirler.

Farklı antijen bağlanma sitelerine sahip (birisi bakteriyorodopsinin spesifik yanına diğeri bir fosfolipid haptene) bispesifik antitadilerin iki çeşidi kullanılarak mor membranından yapılmış biyofilmler elde edilmiştir. Böyle filmler, ışık duyarlı fotoelektrik aletlerin yapımında kullanılmaktadır. Patentli yeni yaklaşımlar hareket sensörü vazifesinde bu molekülü bioelement olarak kullanma yönündedir.

Bakteriyorodopsinin diğeri potansiyel kullanımları güneş ışığının elektriğe çevrimini, ATP üretimini, deniz suyunun tuzdan arındırılmasını, kimyasal ve biyosensör olarak kullanımını ve çok hızlı ışık deteksiyonu gibi uygulamaları içerir.

Bakteriyorodopsin cam tabakalara kolaylıkla immobilize olabilmekte veya polimerlere gömülebilmektedir. 0-45 °C arasında ve 1'den 11'e kadar olan tüm pH aralıklarında iyi fonksiyon gösterir. Tuzlu veya tatlı suda aktiftir, suda 80 °C'ye kadar kuru ortamda ise 140 °C'ye kadar sıcaklığı tolere edebilir ve tekrarlanabilirliği yüksek fotoelektrik sinyalleri üretir.

Tüm bu uygulamalar bakteriyorodopsinin fotokimyasal stabilitesi ve mükemmel termodinamiği sayesinde mümkün olabilecektir. Bunun dışında başka bir önemli nokta ise tuz yokluğunda da stabilitesini koruyabildiği için ve aktif kalabildiği için bu protein aslında "halofilik bir protein" de değildir. Bu da uygulama alanlarını arttırmaktadır (Oren 2002).

1.6.1.5. Halofilik Archaea ile Biyopolimer Üretimi

H. mediterranei hücreleri önemli miktarda β -hidroksibutirat (PHB) ve β -hidroksibutirat'ın kopolimeri olan poly- β -hidroksialkonat (PHA) içerebilirler. Poly- β -hidroksialkonat içerikleri tuzluluğa bağlı olarak kuru ağırlıklarının %19-

38'i kadar olabilmektedir. En yüksek konsantrasyon 150 g/l tuzlulukta geliştirilen hücrelerde gözlenmiştir.

Poly- β -hidroksialkonat biyolojik parçalanabilir plastiklerin üretiminde kullanılır. Böyle termoplastikler (biyolojik polyesterler) polypropilenlere benzer olarak yüksek direnç ve düşük erime sıcaklığı gibi mükemmel özelliklere sahiptirler (Oren 2002).

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Medyum A

NaCl.....	250 g
KCl.....	5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	5 g
NH ₄ Cl.....	5 g
Yeast Extract.....	10 g
Distile Su.....	1 lt

pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Oren1999 b).

2.1.1.2. Medyum B

NaCl.....	200 g
KCl.....	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	20 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.02 g
Tri-Na-Citrate.....	3 g
Casamino acid.....	7.5 g
Yeast Extract.....	0.5 g
Distile Su.....	1 lt

pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Oren1999 b).

2.1.1.3. Medyum C

NaCl.....	175 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	20 g
K ₂ SO ₄	5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.1 g
Yeast Extract.....	5 g
Distile Su.....	1 lt

pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Oren1999 b).

2.1.1.4. Medyum D

NaCl.....	206 g
KCl.....	0.37 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	36 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.5 g
MnCl ₂	0.013 g
Yeast Extract.....	5 g
Distile Su.....	1 lt

pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Oren1999 b).

2.1.1.5. Medyum E

NaCl.....	125 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	160 g
K ₂ SO ₄	5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.1 g
Yeast Extract.....	1 g

Casamino acid.....	1 g
Starch.....	2 g
Distile Su.....	1 lt

pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Oren1999 b).

2.1.1.6. %12 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....	400 ml
Saf su.....	567 ml
Pepton.....	5 g
Yeast Ekstrakt.....	1 g

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH'ı 7.5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.7. %18 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....	600 ml
Saf su.....	367 ml
Pepton.....	5 g
Yeast Ekstrakt.....	1 g

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH'ı 7.5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.8. %23 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....	767 ml
Saf su.....	200 ml
Pepton.....	5 g
Yeast Ekstrakt.....	1 g

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH'ı 7.5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.9. %25 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....	833 ml
Saf su.....	134 ml
Pepton.....	5 g
Yeast Ekstrakt.....	1 g

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH'ı 7.5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.10. Luria Bertani (LB) Besiyeri

NaCl.....	10 g
Yeast Extract.....	5 g
Trypton.....	10 g

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7.2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Katı besiyerinin hazırlanması %2 agar ilavesi ile yapılmıştır (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.11. Fermentasyon Ortamı (g/l)

Pepton.....	10 g
Glukoz.....	10 g
%25 lik Tuzlu su çözeltisi.....	1000 ml

pH 7.2'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. (Dyall-Smith 2004).

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

2.1.2.1. %5 Deniz Suyu (SW)) (g/l)

NaBr.....	0.13
HNaCO ₃	0.033
KCl.....	1.0
CaCl ₂	0.145
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	9.898
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	6.913
NaCl.....	39

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985)

2.1.2.2. %10 Deniz Suyu (SW)) (g/l)

NaBr.....	0.26
HNaCO ₃	0.067
KCl.....	2.0
CaCl ₂	0.289
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	19.797
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	13.827
NaCl.....	78

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985)

2.1.2.3. %15 Deniz Suyu (SW)) (g/l)

NaBr.....	0.39
HNaCO ₃	0.1
KCl.....	3.0
CaCl ₂	0.434
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	29.695
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	20.74
NaCl.....	117

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985)

2.1.2.4. %20 Deniz Suyu (SW)) (g/l)

NaBr.....	0.52
HNaCO ₃	0.134
KCl.....	4.0
CaCl ₂	0.578
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	39.594
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	27.654
NaCl.....	156

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985)

2.1.2.5. %25 Deniz Suyu (SW)) (g/l)

NaBr.....	0.65
HNaCO ₃	0.167
KCl.....	5.0
CaCl ₂	0.723

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	49.492
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	34.567
NaCl.....	195

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985)

2.1.2.6. %30 Deniz Suyu (SW)) (g/l)

NaBr.....	0.78
HNaCO ₃	0.2
KCl.....	6.0
CaCl ₂	0.868
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	59.39
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	41.48
NaCl.....	234

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985)

2.1.2.7. %25 lik Tuzlu Su Çözeltisi

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

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodríguez-Valera 1985)

2.1.2.8. %30 luk Tuzlu Su Çözeltisi

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	35 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	30 g
NaBr.....	0.8 g
HNaCO ₃	0.2 g
KCl.....	7 g
CaCl ₂	0.5 g
NaCl.....	240 g

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH'ı 7.5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.2.9. TAE 50X (bir litre için)

Tris base.....	242 g
Asetik asit.....	57.1 ml
EDTA (0.5 M pH 8).....	100 ml

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.2.10. TBE 5X

Tris base.....	54 g
Borik asit.....	27.5 g
EDTA (0.5 M pH 8).....	20 ml

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.2.11. PBS 10X

NaCl.....	80 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O.....	11.5 g
KCl.....	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 7.2'e ayarlanır, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve oda sıcaklığında saklanır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.2.12. Elektroforez için Yükleme Tamponu (6X)

Ksilensiyanol 0.25%
Bromofenol blue 0.25%
Gliserol 30%

Oda sıcaklığında saklanır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.2.13. Lizozim Solüsyonu (10 mg/ml)

Lizozim.....	100 mg
EDTA (0.5 M).....	1 ml
Tris-HCl (1M).....	1 ml
Steril distile H ₂ O.....	8 ml

Filtre ile sterilize edilerek kullanılır. -20 °C'lik derin dondurucuda saklanır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.2.14. %80'lik DGGE Stok Solusyonu

Üre.....13.45 g
 Deiyonize Formamid.....12.8 ml
 Akrilamid/Bisakrilamid (%30).....8 ml
 TAE (20X).....2 ml

mQ su ile 30 ml'ye tamamlanır. Buzdolabında 4 °C'de saklanır (Muyzer 1999)

2.1.2.15. %0'lık DGGE Stok Solusyonu

Akrilamid/Bisakrilamid (%30).....8 ml
 TAE (20X).....2 ml

mQ su ile 30 ml'ye tamamlanır. Buzdolabında 4 °C'de saklanır (Muyzer 1999)

2.1.2.16. %10 Amonyum persülfat Solusyonu

Amonyum persülfat.....10 g
 Distile su.....100 ml

Hazırlandıktan sonra küçük hacimler halinde ependorflara paylaştırılarak -20 °C'de saklanır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.2.17. %10 SDS Solusyonu

Sodyumdodesilsülfat (SDS).....10 g
 Distile su.....100 ml

Hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.2.18. In situ hibridizasyon Tamponu

NaCl (5 M).....	360 µl
Tris-HCl (1 M).....	40 µl
Formamide.....	700 µl
mQ su.....	900 µl
SDS (%10).....	2 µl

Hazırlanıp buz üzerinde korunur (Anton 1999).

2.1.2.19. FISH için Yıkama Tamponu

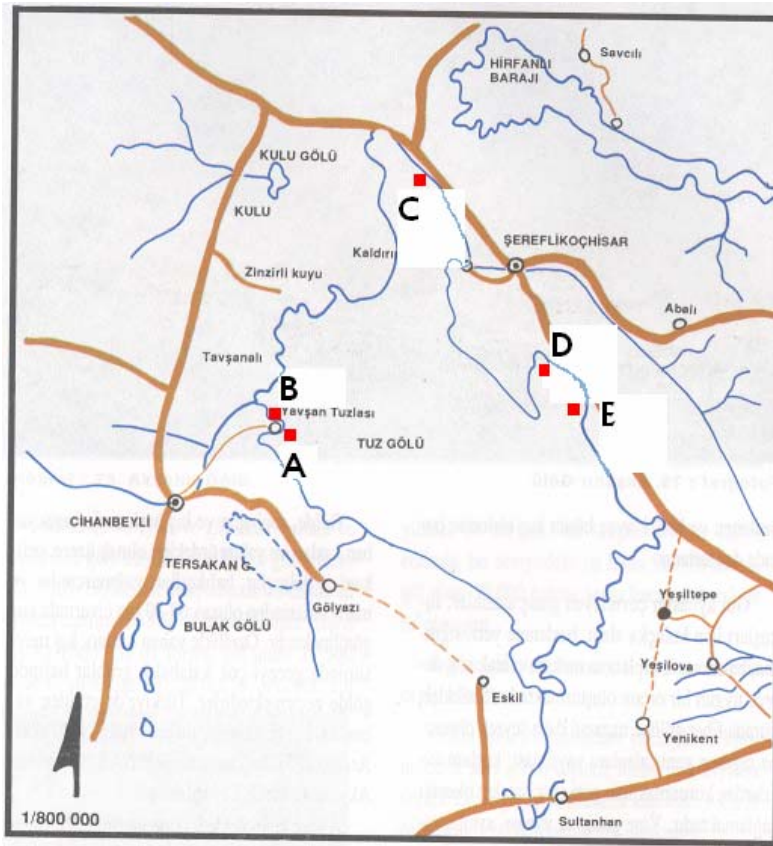
Tris-HCl (1 M pH 8).....	1 ml
NaCl (5 M).....	700 µl
EDTA (0.5 M).....	500 µl

mQ su ile 50 ml'ye tamamlanır (Anton 1999).

2.2. METOD

2.2.1. Çalışma Alanlarının Seçimi

Tuz Gölü'ndeki prokaryotik populasyonların belirlenebilmesi amacıyla göl etrafında 5 farklı örnekleme alanı seçilmiştir. Bu örnekleme alanları A, B, C, D ve E olarak isimlendirilmişlerdir. Şekil 2.1'de örnekleme alanları gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Örnekleme alanları

Örnekleme alanlarına ait enlem ve boylamları belirten koordinat değerleri Garmine GPS-12 model GPS cihazı ile belirlenmiştir.

2.2.2. Örneklerin Toplanması

Örnekleme alanlarından mevsimsel mikrobiyal populasyonların değişimlerini gözleyebilmek amacıyla farklı zamanlarda örnekler alınmıştır. Ağustos 2003, Ekim 2003, Aralık 2003, Şubat 2004, Nisan 2004, Haziran 2004, Ağustos 2004, Ekim 2004, Aralık 2004, Mayıs 2005, Temmuz 2005 ve Ekim 2005 olmak üzere toplam 12 defa örnekleme yapılmıştır. Yapılan her örneklemede en az 500 ml su örneği alınmış ve örnekler en kısa sürede laboratuvara getirilerek analizlerine başlanmıştır.



Şekil 2.2. Gölde örnek alımı

2.2.3. Örneklerdeki Toplam Tuz Değerlerinin ve İyonik Kompozisyonlarının Belirlenmesi

2.2.3.1. Örneklerin Toplam Tuzluluk Değerlerinin Belirlenmesi

Örneklerin toplam tuz değerlerinin belirlenmesi amacıyla el refraktometresi (Eclipse) kullanılmıştır ve ölçümler örnekleme anında yapılmıştır.

2.2.3.2. Örneklerin pH Değerlerinin Belirlenmesi

Örneklerin pH değerlerinin belirlenmesi için TOA WQC su analiz cihazı kullanılmıştır ve ölçümler örnekleme anında yapılmıştır.

2.2.4. Su Örneklerinden Archaea ve Bacteria İzolasyonu ve Kültüre Alınmaları

Örneklerdeki Halofilik Eubacteria ve Archaea izolasyonu için farklı besiyerleri kullanılmıştır. Su örneklerinden 1'er ml Medium A, Medium B, Medium C, Medium D, Medium E, %23 MGM ve %25 MGM sıvı ortamlarına ekilerek 37 °C'de inkübasyona alınmışlardır. Yine her bir su örneğinden 1'er ml Haloarcula Medium, %23 MGM agar , %25 MGM agar ve %0.5 yeast ekstrakt içeren %25 "sea water" agara ekilerek petriler 37 °C'de inkübe edilmişlerdir. 3-4 haftalık inkübasyon sonrasında oluşan koloniler alınarak ardışık çizgi ekimlerle saf kültürler haline getirilmiştir. (Oren 1999; Dyall-Smith 2000; Anton ve ark. 2000). Çalışma sırasında saf halde edilen kültürler %15'lik gliserol stokları içerisinde -85 °C'de muhafaza edilmektedirler.

Örneklerdeki canlı bakteri sayılarının belirlenmesi amacıyla da %25 lik tuzlu su içerisinde su örneklerinin farklı dilüsyonları hazırlanmış ve her bir dilüsyondan 1'er ml Haloarcula agar ve %25 SW agara yayma ekim şeklinde ekilmiştir. 37 °C'de 3 haftalık inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılarak mililitredeki canlı bakteri sayısı belirlenmiştir. Tüm örnekler için ekimler üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.5. İdentifikasyon

2.2.5.1 Morfolojik ve Biyokimyasal Testler

Gram Boyama

Aşırı derecede halofilik mikroorganizmaların gram boyaması Dussault (1965)'e göre gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmiş bu boyama yönteminde, lam üzerindeki örnek öncelikle %2'lik asetik asit ile 5 dakika muamele edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra %0.25'lik kristal viyole ile 3 dakika boyanmış, lugol ile 1 dakika, alkol ile 10 saniye ve son olarak safranin ile 1 dakika boyanmıştır. Ara yıkama aşamalarında %20'lik NaCl çözeltisi kullanılmıştır (www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook).

İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu NaCl Miktarının Belirlenmesi

İzolatlar %0, %5, %8, %10, %15, %20 ve %25lik NaCl içeren besiyerlerine ekilmiş ve 37 °C'de inkübasyon sonrası gelişme durumları incelenmiştir (Anton ve ark. 2002).

İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu Sıcaklığın Belirlenmesi

İzolatlar %25 SW agar ve Haloarcula agar besiyerlerine ekildikten sonra 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C ve 55 °C'lik etüvlerde inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrasında her bir izolatın farklı sıcaklıklardaki gelişme durumu belirlenmiştir (Anton ve ark. 2002).

İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu pH Değerinin Belirlenmesi

İzolatlar pH'sı 3, 5, 7, 9 ve 11'e ayarlanmış %25 SW besiyerlerine ekildikten sonra 37 °C, etüvde inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrasında her bir izolatın farklı pH'lardaki gelişme durumu belirlenmiştir (Tindall 1992; Anton ve ark. 2002).

İzolatların Farklı Karbon ve Şeker Kaynaklarını Kullanma Durumunun Belirlenmesi

İzolatların farklı karbon ve şeker kaynaklarını kullanabilme yeteneklerinin ortaya konması amacıyla SW besiyerine D-fruktoz, D-galaktoz, glukoz, laktoz, maltoz, mannitol, sukroz, trehaloz son konsantrasyonu 5 g/l olacak şekilde eklenerek besiyerine eklenen indikatör yardımıyla inkübasyon sonrası renk değişimleri kontrol edilmiştir (Tindall 1992; Anton ve ark. 2002).

2.2.5.2 Antibiyotiklere Duyarlılık Testi

İzolatların farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetlerinin ortaya konması amacıyla SW besiyerine kültürlerin yayma ekimleri yapıldıktan sonra agar yüzeyine Penicillin G (10 U), Ampicillin (10 mg), Bacitracin (10 µg), Vancomycin (30 µg), Tetracycline (30 µg), Novobiocin (30 mg), Cloramphenicol (30 µg) diskleri konarak petriler 37 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrası antibiyotik diskleri etrafındaki inhibisyon zonlarının varlığı

kontrol edilerek hassasiyet durumları ortaya konmuştur (Rodriguez Valera 1994, Oren 1999; Anton 2002).

2.2.5.3 Polar Lipid Analizleri

Polar lipid analizleri için ekstraksiyon Oren ve ark (1999)'a göre gerçekleştirilmiştir. 20 ml kültürün 15 dakika 12000 g'de santrifüjlenmesiyle elde edilen pelet 1ml distile su içerisinde süspanse edildikten sonra 3.75 ml metanol-kloroform 2:1 (hacim olarak) ile 4 saat ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt santrifüjle toplanmış ve pelet 4.75 ml metanol-kloroform-su (2:1:0.8) ile tekrar ekstrakte edilmiştir. Kloroform ve su (her birinden 2.5 ml) faz ayrımını sağlamak amacıyla birleştirilmiş supernatant kısmına eklenmiş ve santrifüjden sonra kloroform fazı ayrılarak çeker ocakta kurutulmuştur. Kurutulmuş lipid fraksiyonları daha sonra küçük hacimde kloroform eklenerek çözülmüş ve ince tabaka kromatogramlarının eldesi amacıyla silika jel tabakalarına (Sigma Z-12, 271-8) uygulanmışlardır. İnce tabaka kromatografisinde kloroform-metanol-asetik asit-su (85:22.5:10:4, V/V) çözücü sistemi ile ayrımları yapılmıştır. Lipid spotlarının ortaya çıkarılması için: (1) %50 metanol içinde %0.5 α -naftol ü takiben etanol içinde %5 H_2SO_4 uygulanmış ve 150 °C de tabaka ısıtılmıştır (özellikle glikolipidlerin deteksiyonuna izin verir); (2) 1 N H_2SO_4 içinde %0.2 $CeSO_4$ muamelesini takiben 150 °C de ısıtma; (3) Orcinol spray reagenti takiben 100 °C de ısıtma (hem genel lipid boyamadır hem de glikolipidlerin diğer lipidlerden renk olarak ayrımını sağlar); ve (4) amonyum molibdat reagenti fosfolipidlerin deteksiyonu için kullanılmıştır.

2.2.5.4 Toplam Hücre Proteinlerinin Eldesi ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorez (SDS-PAGE) ile Analizi

Toplam hücre proteinlerinin SDS-PAGE ile analizi için farklı renk ve koloni şekline sahip olan 22 adet izolat ve 11 referans halofilik mikroorganizma (Tablo 2.1.) uygun besiyerlerinde 37 °C'de 14-20 gün geliştirildikten sonra 10.000

rpm de 10 dakika santrifüjle pelet haline getirilmişler ve Stan-Lotter (1989)'a göre distile su içerisinde süspanse edilerek lize edilmişlerdir.

Strain	Kaynak
<i>Halococcus saccharolyticus</i> DSM 5350	Helga Stan-Lotter, Avusturya
<i>Halococcus dombrowski</i> DSM 14522	
<i>Halococcus morrhuae</i> DSM 1307	
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 ATCC-700922	Michael Dyall-Smith, Avustralya
<i>Halorubrum coriense</i>	
<i>Haloarcula hispanica</i> ATTC 33960	
<i>Haloferax volcanii</i> NCMB 2012	Josefa Anton, İspanya
<i>Halogeometricum boringuense</i>	
<i>Haloferax volcanii</i>	
<i>Haloferax mediterranei</i>	
<i>Salinibacter ruber</i> M31	

Tablo 2.1. SDS-PAGE analizi yapılan referans mikroorganizmalar ve bunların kaynakları

Halococcus saccharolyticus, *Halococcus dombrowskii* DSM 14522 ve *Halococcus morrhuae* DSM 1307 nin lizisi için sonikatör yardımıyla (400 W, 20kHz sonicator (Sonics&Materials, Vibro Cell)).ekstradan 3 s periodlarla 2 dakikalık sonikasyon işlemi uygulanmıştır.

Örneklerdeki protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla Bradford yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde ilk olarak Bovin serum albumin proteininin bir dilüsyon serisi Bradford boyası içinde hazırlanmış ve A₅₉₅'de spektrofotometrede yapılan ölçüm ile bir standart eğri oluşturulmuştur. Daha sonra kendi örneklerimizin A₅₉₅'deki absorbansı spektrofotometrede okunmuş, bulunan değer standart eğri yardımıyla o örnekteki protein miktarının µg/ml cinsinden hesaplanmasında kullanılmıştır (Bradford 1976).

Elektroforez için gerekli olan malzemeler hazırlandıktan sonra tümü uygun ortamlarda muhafaza edilmiştir. Elektroforez tankı uygun biçimde kurulduktan sonra jelin hazırlanması işlemine geçilmiştir.

%12'luk 10 ml ayırma jelinin hazırlanması gerekli olan H₂O, %30 akrilamid karışımı, 1.5 M Tris (pH 8.8), %10 SDS, %10 AMPS ve TEMED temiz bir cam tüp içinde hazırlanmış ve sonrada jel aygıtına karışım boşaltılmıştır. Düzgün bir yüzey elde etmek için dökülen jel üzerine su ile doyurulmuş bütanolden 4-5 damla ilave edilmiştir. Jel donduktan sonra bütanol distile su ile temizlenmiş ve kurutma kağıdı aracılığıyla da suyu alınmıştır.

3 ml yükleme jelinin hazırlanması için gerekli olan H₂O, %30 akrilamid karışımı, 1 M Tris (pH 6.8), %10 SDS, %10 AMPS ve TEMED donmuş olan yükleme jelinin üzerine dökülmüştür. Bu işlemi takiben 12 çukurlu tarak jele yerleştirilmiştir. Yükleme jeli kurulduktan sonra 1X yürütme tamponu ile elektroforez tankı doldurulmuş, tarak jeli bozmayacak şekilde dikkatlice çıkarılmış ve tarağın oluşturduğu çukurlara numara verilmiştir.

Jel dökme işlemi bittikten sonra yürütülecek protein örnekleri ve işaretleyici protein temiz ependorf tüpleri içinde hazırlanmıştır. Jel çukurlarına yüklenen protein miktarının 25µg/30µl-30µg/30µl arasında olmasına özen gösterilmiştir.

30µl protein örneğinin üzerine 10µl 2X jel yükleme tamponu ilave edilerek toplam hacim 40µl'ye tamamlanmıştır. Benzer şekilde 5µl geniş aralıklı işaretleyici protein (MBI Fermentas Protein Ladder 10-200 kDa SM0661 200-150-120-100-85-70-60-50-40-30-25-20-15-10) üzerine 10µl 2X jel yükleme tamponu ve 25 µl distile su ilave edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan protein örnekleri 2-3 dakika kaynayan su içinde bekletilmiş ve ependorflarda toplanan su buharını toplamak için 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Hazırlanan protein örnekleri Hamilton şırınga yardımı ile donmuş jelde oluşmuş çukura aktarılmış ve 80 V'luk elektrik akımı uygulanarak elektroforeze tabi tutulmuştur. Boya ayırma jelinin başlangıç çizgisine geldiğinde güç kaynağı 120 V'a ayarlanmıştır. Boya jelin sonuna ulaştığında elektroforeze son verilmiş ve jel elektroforez tankından çıkarılmıştır. Temiz bir kaba alınan jel, jel boyası (Coomasie Brilliant Blue) ile en az 2 saat boyanmıştır. Boyama işleminden sonra yıkama tamponunu içine konulan jel bir gece boyunca hafifçe çalkalanarak fazla

boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. daha sonra jel, koruma solüsyonu içine alınarak fotoğrafları çekilmiştir (Sambrook ve ark. 1982)

2.2.5.5. Nükleik asit analizine dayalı testler

16S rRNA Geni Amplifikasyonu için İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada Tuz Gölü'nden izole edilen mikroorganizmaların 16S rRNA geni amplifikasyonları için ya agar ortamı üzerinde geliştirilmiş olan kültürden tek koloni alınarak 200 µl steril distile su içinde ya da 200 µl sıvı kültür 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan pelet 200 µl steril distile su içinde resüspanse edildikten sonra tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilmişlerdir. 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüjün ardından süpernatant kısmı yeni bir steril tübe aktarılarak, PCR için buradan 3-5 µl template olarak kullanılmak üzere, -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir (Anton ve ark. 1999; Dyall-Smith 2004).

16S rRNA Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu (İzolatların Archaea –Bacteria Ayrımlarının Yapılması)

Koloni morfolojisi olarak farklılık gösteren izolatlar seçilmiş, Archaea ve Bacteria spesifik primerler kullanılarak, bunların 16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, 50 µl hacimde son konsantrasyonları 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 200 µM deoksinükleotidtrifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.2 µM primerler, 1 unite Taq DNA polimeraz enzimi ve 3-5 µl template DNA olacak şekilde reaksiyonlar kurulmuştur. 16S rRNA geni amplifikasyonlarında Bacteria için AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG ve GGT TAC CTT GTT ACG ACT T ve Archaea için TTC CGG TTG A TC CTG CCG GA ve GGT TAC CTT GTT ACG ACT T dizilimindeki primerler kullanılmıştır. Kullanılan primerler ile ilgili diğer bilgiler Tablo 2.2. de gösterilmiştir.

Reaksiyonlar için Bio-Rad PTC-100 Peltier Thermal Cycle, Eppendorf Master Cycler Gradient, Bio-Rad ve Techne Thermal Cycler kullanılmıştır.

Archaea ve Bacteria üyelerinin 16S rRNA genlerinin amplifikasyonları için uygulanan reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir;

94 °C	3 dakika	(Denatürasyon),	
94 °C	30 saniye	}	30 Döngü
50 °C	1 dakika		
72 °C	1 dakika		
72 °C	10 dakika		
4 °C	Süresiz		

Tüm çalışmalar boyunca hem pozitif hem de negatif kontrol reaksiyonları hazırlanmıştır. *Salinibacter ruber* DNA'sı Eubacteria için, *Haloferax mediterranei* DNA'sı Archaea için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontroller DNA içermeyen reaksiyon karışımları ile oluşturulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jellerde gözlenmişlerdir (Anton ve ark. 1999).

PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılması amacıyla özel saflaştırma kiti (GFX PCR DNA ve Jel Band Saflaştırma Kiti, Amersham Biosciences) kullanılmıştır. Buna göre %1 lik jelde yürütülen PCR ürünleri UV transilluminator üzerinde gözlenerek, steril bisturi ucu ile istenilen bandlar agaroz jelden kesilmiştir. DNA içeren agaroz parçaları tartılarak, bunların üzerine her 10 mg için 10 µl olmak üzere "capture buffer" eklenmiştir. Tüp hafifçe vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 60 °C de 5-15 dakika (agaroz tamamen eriyinceye kadar) su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda GFX kolonu "toplama tüpü" içine yerleştirilmiş ve su banyosundan çıkarılan örnek kolona konarak 30 saniye 13000 rpm de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde toplanan sıvı atılmış ve filtre yeniden tüpe yerleştirilerek üzerine 500 µl yıkama buffer eklenip tekrar 13000

rpm de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü atılmış ve kolona yeni bir toplama tüpü yerleştirilerek üzerine 50 µl elusyon buffer (otoklavlanmış distile su) eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyondan sonra 13000 rpm de 1 dakika santrifüjlenerek saflaştırılmış ürünler elde edilmiştir.

PCR Ürünlerinden Dizi Analizi

Kültür haline getirilmiş 25 izolatdan (2005 yılı Şubat, Mayıs, Temmuz ve Ekim ayı izolatlarından) DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA'nın 16S rRNA geni PCR ile amplifiye edilerek bu ürünlerin direkt olarak dizi analizlerinin eldesi yoluna gidilmiştir. Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı ile bu elde edilen PCR ürünlerinin baz dizilerinin belirlenmesi amacıyla Beckman dizi analiz kitinde önerilen şartlar ile sonuçlar alınmıştır.

Dizi analizleri sırasında her örnek için toplam reaksiyon hacmi 20 µl olarak ayarlanmıştır. 4-6 µl kalıp DNA (50 ng/µl) (analiz yapılacak DNA örneği), 1 µl (=5 pmol) primer (21F, 27F ve 1492R), 12 µl premix (Beckman sequence kiti) ve 1-3 µl steril su ile hazırlanan her bir reaksiyon için kullanılan şartlar aşağıda verilmiştir:

30 döngü

96 °C	20 saniye
50 °C	20 saniye
60 °C	4 dakika

Amplifikasyon sonrasında bağlanmamış primerlerin ve işaretli dNTP'lerin uzaklaştırılması için etanol presipitasyonu yöntemi kullanılmıştır. Bunun için her örneğe 4 µl stop solusyonu (1.5 M NaOAc+50 mM EDTA) ve 1 µl (20 mg/ml) glikojen eklenmiştir. 60 µl %95'lik etanol (-20 °C olmalı) eklenerek 14000 rpm de 4 °C'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Pelet 200 µl %70'lik etanol ile 2 kez yıkanmış ve 14000 rpm de tekrar 2 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırılarak peletler kurutma için çeker ocakta 1-2 saat bekletilmişlerdir. 40 µl formamid solusyonu örneklerin üzerine konmuş ve 5-15 dakika inkübasyon sonrası örnekler kapiller sisteme verilmiştir.

Kültürlerin bir kısmının 16S rRNA analizleri de Alicante Üniversitesi'ndeki ABI Prism 310 DNA dizi analiz cihazı ve bu cihazın kitleri ile gerçekleştirilmiştir (Bölüm 2.2.6.2. içerisinde detaylar verilmiştir)

2.2.6. Halofilik Mikrobiyal Kommünite Analizleri

2.2.6.1. Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için önce 100 ml su örneği 0.2 µm por çaplı membran filtreden (Millipore, Isopore GTTP04700) vakumlu filtrasyon sistem yardımı ile süzölmüş daha sonra ekstraksiyon işlemine kadar filtre -85 °C de muhafaza edilmiştir (Casamayor ve ark. 2002).

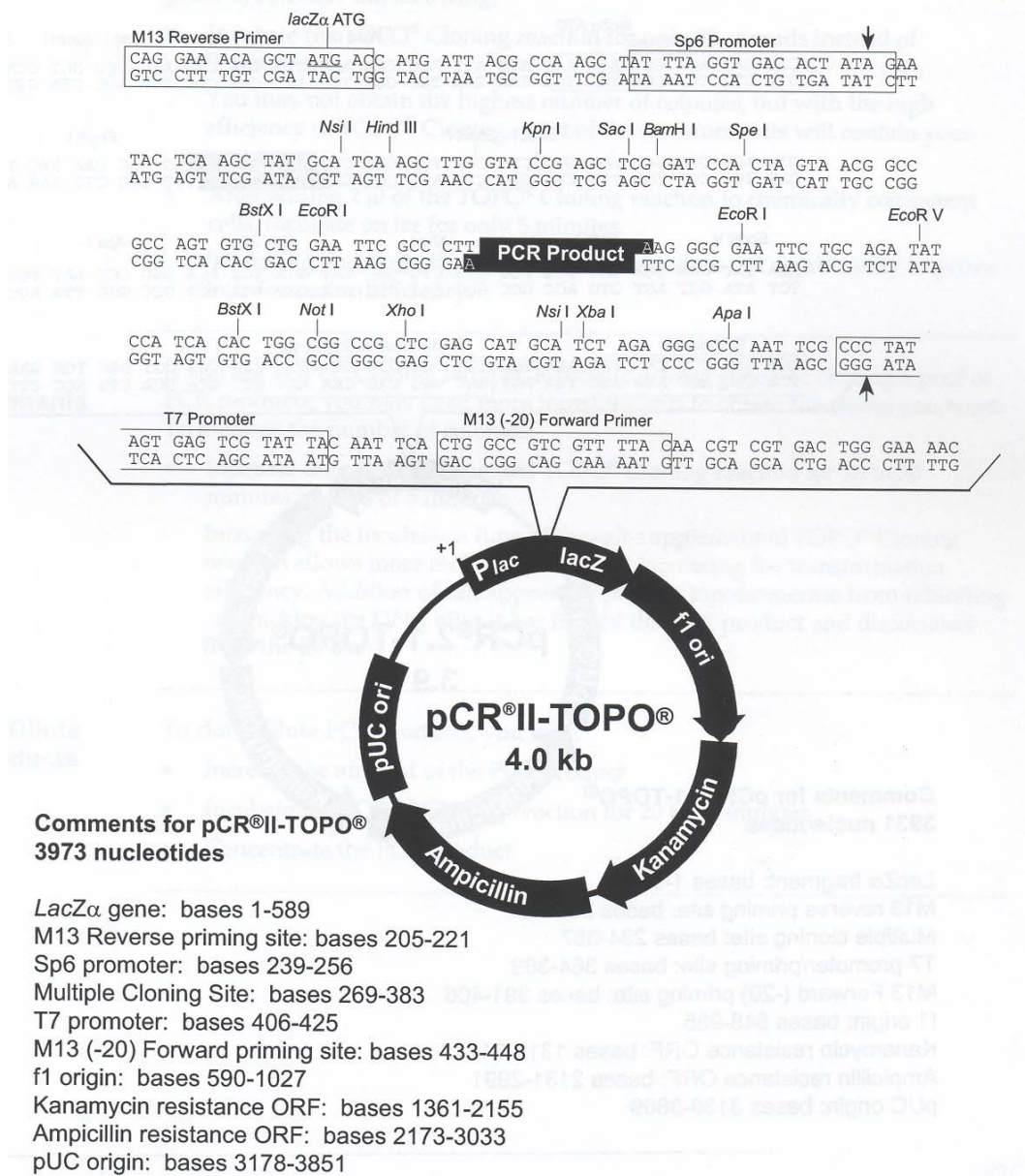
DNA ekstraksiyonu Cifuentes ve ark. (2000) ve Nogales ve ark. (1999) a göre küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir:

Filtreler makasla küçük parçalar halinde kesilerek RNase içermeyen özel ependorf tüplere konduktan sonra bunların üzerine 600 µl ekstraksiyon tamponu eklenmiştir. Kısa bir santrifüjle parçaların dibine toplanmaları sağlanıp, 6 µl (3 mg/ml) lizozim eklendikten sonra 15 dakika 37 °C'de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Üzerine 9 µl proteinaz K (150 µg/ml) ve 60 µl %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenip, 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.. 120 µl 5 M NaCl eklenerek tüp ters düz edilerek karıştırılmış ve 90 µl CTAB (%10 CTAB (Cetil Trimetil Ammonyum Bromid), 0.7 M NaCl) eklenip tekrar karıştırılmıştır. 10 dakika 65 °C su banyosunda inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası sıvı azot içinde 1-2 dakika bekletilerek dondurulmuş ve tekrar 65 °C'ye konulmuştur. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra,. 900 µl Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) eklenip karıştırılmış ve 5 dakika 4 °C'de 13.000 rpm de santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı faz alındıktan sonra üzerine 1 hacim Fenol:Kloroform:İsoamilalkol eklenmiştir. Bu işleme protein ara fazı indirgeninceye kadar devam edilmiştir. 80 µl sodyum asetat (3M, pH 4.8) ve 480 µl isopropanol, 8 µl MgCl₂ (1M) eklendikten sonra, 30 dakika 13.000 rpm' de 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine %70'lik alkol konmuş ve tekrar 15 dakika 13.000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Alkol pipetle uzaklaştırıldıktan sonra, pelet oda sıcaklığında kurutulmuş ve 50 µl

dietilpirokarbonat (DEPC)'li su ile resüspanse edilerek, -85 °C'de muhafaza edilmiştir (Sambrook ve ark. 1982; Casamayor ve ark. 2002).

2.2.6.2. 16S rRNA Gen Kütüphanesi Oluşturulması (16S rRNA Genlerinin Klonlanması, Klonların Seçimi ve Klonlardan Dizi Analizleri)

Çevresel örneklerden amplifiye edilmiş olan 16S rRNA ların klonlanması için TOPO TA Klonlama Kiti (Kat No: K4500-01) Invitrogen) kullanılmıştır. Bu kit klonlama vektörü olarak pCR2.1 i içermektedir. Vektör *lacZ* geninin yanında, ampisilin ve penisiline direnç genlerini de içermektedir. Şekil 2.3.'de vektör olarak kullanılan pCR2.1 in restriksiyon kesim bölgelerini, ve direnç genlerini de belirten harita görülmektedir. Vektörün transformasyonu için *Escherichia coli* TOP10 straini kullanılmıştır (Anton ve ark. 1999; Anton ve ark. 2000).



Şekil 2.3. pCR2.1 vektörü (TOPO klonlama kiti manualinden, Invitrogen)

Ligasyon Reaksiyonu

16S rRNA Gen kütüphanesi oluşturulması amacıyla Archaea spesifik primerlerle ve Bacteria spesifik primerlerle 3'er tüp reaksiyon kurulmuş ve PCR sonrasında Archaea spesifik ürünleri içeren 3 tüp ve Bacteria spesifik ürünleri içeren 3 tüp birleştirilerek oluşturulan karışımlar ligasyon işleminde kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonları için 0.5-4 µl PCR ürünü, 1 µl tuz

solusyonu, 1 µl TOPO vektör (10 ng/µl) ve toplam hacimi 6 µl'ye tamamlayacak kadar mQ su kullanılmıştır. Bu karışım pipetlenerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.

Transformasyon

2 µl ligasyon reaksiyonundan alınarak, 50 µl *Escherichia coli* TOP10 straini üzerine eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışım 20 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra hücreler 30 saniye 42 °C'lik su banyosunda bekletilmişlerdir. Bundan sonra tüpe 250 µl SOC medium eklenerek dikkatlice karıştırılmıştır. 1 saat 37 °C' 180 rpm de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında bu karışımlardan 100 µl ve 200 µl alınarak X-Gal (40 mg/ml) ve ampisilin (100 mg/ml) içeren Luria Bertani (LB) agar üzerine pipetlenmiş ve drigalski spatülü ile tüm petri yüzeyine yayılması sağlanmıştır. Petriler 37 °C'de bir gece inkübe edilerek inkübasyon sonrasında oluşan mavi (insert içermeyen) ve beyaz koloniler (insert içeren) arasından beyaz olanlar seçilerek X-Gal ve ampisilin içeren yeni bir LB petrisine ekimleri yapılmıştır.

İnsert'e Sahip Klonların Seçimi

37 °C'lik inkübasyondan sonra LB petrileri 2 saat 4 °C'de inkübasyona alınarak beyaz kolonilerden mavi renkli hale gelenlerin olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bundan sonra insert içeren bu beyaz kolonilerin içerdikleri insert'in uygun büyüklükte olup olmadığının belirlenmesi amacıyla her bir klondan polimeraz zincir reaksiyonları kurulmuştur.

Bu reaksiyonların her birinde primer olarak Primer A (5'-ACGTTGTAAAACGACGGCAG-3') ve Primer B (5'-CAGGAAACAGCTATGACCATG-3') olarak isimlendirilen insert primerlerinden kullanılmıştır. 50 µl hacimde son konsantrasyonları 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 200 µM deoksiniükleotidtrifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.2 µM primerler, 1 unite Taq DNA polimeraz

enzimi olacak şekilde reaksiyonlar kurulmuştur. Her tüpe, kalıp DNA (template) olarak LB petrilerindeki beyaz kolonilerden kürdanla alınan biyomas eklenmiştir.

Amplifikasyon reaksiyonu için aşağıdaki şartlar kullanılmıştır:

94 °C	3 dakika (Denatürasyon),		
94 °C	30 saniye	}	30 Döngü
55 °C	1 dakika		
72 °C	1 dakika		
72 °C	10 dakika		
4 °C	Süresiz		

Reaksiyon sonrasında amplifikasyon ürünleri %1'lik agaroz jellere yüklenerek uygun büyüklükte inserte sahip olanların seçimi gerçekleştirilmiştir (Anton ve ark. 2000).

Klonlara Ait 16S rRNA Geni Amplifikasyonu Ürünlerinin Enzimatik Kesimi (ARDRA)

16S rRNA geni için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri için *Hinf* I (New England Biolabs Cat no R01555) ve *Mbo* I (New England Biolabs Cat no R0147S) enzimleri kullanılmıştır.

Her bir reaksiyon için 5 U enzim, 10 µl PCR ürünü, restriksiyon enzimine uygun buffer ve steril distile su (20 µl toplam hacim olacak şekilde) kullanılmıştır. Karışım 37 °C'de bir gece inkübe edilmiş ve analiz amacıyla 0.5X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu içindeki %2 lik agaroz jele yüklenerek 5 V/cm elektrik akımı uygulanarak 4 saat yürütülmüşlerdir.

Her bir klonun oluşturduğu patternler ortaya çıkarıldıktan sonra farklı grupları temsil eden klonlar seçilerek bunlardan plazmid ekstraksiyonuna başlanmıştır (Martinez-Murcia ve ark. 1995).

Rekombinant Plazmidlerin Klonlardan Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Plazmid izolasyonu “Plazmid İzolasyon Kiti (Promega Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System)” kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Plazmidlerin klonlardan izolasyonu için, LB’de büyütülmüş olan klonlar 6 ml ampisilinli LB sıvı ortamına pasajlanmışlar ve 37 °C’de 1 gece inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası kültürün bir kısmı (850 µl) stokların oluşturulması amacıyla ayrılarak üzerlerine 150 µl steril gliserol eklenmiş ve -85 °C lik derin dondurucuda saklanmışlardır.

Kültürün kalan kısmı 2500 rpm’de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Pelet kitte bulunan 250 µl hücre resüspansiyon solüsyonu ile süspanse edilmiş ve üzerine 250 µl hücre lizis solüsyonu eklenerek 4 kez başaşağı çevrilerek karıştırılmış ardından 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bunun üzerine 10 µl alkalın proteaz solüsyonu eklenmiş, tekrar 4 kez başaşağı çevrilerek karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 350 µl nötralizasyon solüsyonu eklenerek 4 kez başaşağı çevrilerek karıştırılmış ve 10 dakika 13200 rpm’de santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı özel bir kolon içeren toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 13200 rpm’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üzerine 750 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve tekrar 13200 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. 250 µl yıkama solüsyonu eklenerek 2 dakika 13200 rpm’de santrifüjlenmiş, özel kolonu içeren tüp kısmı yeni bir ependorf tüpü içine alınarak kolon üzerine 100 µl nükleaz içermeyen su eklenmiş ve son kez 13200 rpm’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. DNA içeren sıvı kısım -20 °C’de saklanmıştır.

Plazmid izolasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü amacıyla bu ekstraktan %1’lik agaroz jele yükleme yapılmış ve uygun büyüklükte vektörün olup olmadığı marker yardımıyla belirlenmiştir.

16S rRNA Genlerinin Dizi Analizleri

16S rRNA genlerinin (klonlardan PCR amplifikasyonu ile elde edilen) dizi analizleri ABI Prism 310 dizi analiz cihazı kullanılarak Alicante Üniversitesi, İspanya’da gerçekleştirilmiştir. Dizi analizleri için 16S rRNA geninin amplifikasyonunda kullanılan Archaeal primerler (27F ve 1492R) yanında 958R primeri ve Bacteria spesifik primerler (21F ve 1492R) ile 5R primeri kullanılmıştır. Bu primerlerle ilgili bilgiler Tablo 2.2.’de gösterilmiştir. Dizi analizleri sırasında her örnek için toplam reaksiyon hacmi 10 µl olarak ayarlanmıştır. 3 µl kalıp DNA (50 ng/µl) (analiz yapılacak DNA örneği), 0.5 µl primer (5 pmol), 4 µl premix (ABI sequence kiti) ve 2.5 µl steril su ile hazırlanan her bir reaksiyon için kullanılan şartlar aşağıda verilmiştir:

30 döngü

96 °C	30 saniye
50 °C	1dakika
72 °C	1 dakika

Amplifikasyon sonrasında bağlanmamış primerlerin ve işaretli dNTP’lerin uzaklaştırılması için özel bir saflaştırma kiti (Centri-Sep Columns, Katalog No CS 900, Princeton Separations, Inc) kullanılmıştır. Bunu takiben örneklerin kurutulması için Eppendorf Collector konsantrotör sistem kullanılmıştır. Bu sistemde 30 dakika muameleden sonra 30 µl formamid solusyonu örneklerin üzerine konmuş ve 30 dakika inkübasyon sonrası örnekler kapiller sisteme verilmiştir.

Tablo 2.2. Çalışmamızda kullanılan primerler

Primerler	Baz Dizilimi (5'-3')	Spesifisitesi	Referans
27f	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	<i>Bacteria</i>	(Lane, D.I., 1991)
1492r	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Universal	(Lane, D.J., 1991)
21F	TTC CGG TTG A TC CTG CCG GA	<i>Archaea</i>	(DeLong, E.F., 1992)
1492r	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Universal	(Lane, D.J., 1991)
Euk1A	CTG GTT GAT CCT GCC AG	<i>Eukarya</i>	(Sogin and Gunderson, 1987)
Euk516r	ACC AGA CTT GCC CTC C	<i>Eukarya</i>	(Amman ve ark., 1990)
338f	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	<i>Bacteria</i>	(Amman ve ark., 1995)
785f	GGA TTA GAT ACC CTG GTA G	<i>Bacteria</i>	(Amman ve ark., 1995)
16S5r	TTA CGC GGC TGC TGG CAC G	<i>Bacteria</i>	(Amman ve ark., 1995)
958R	ACC GGC GTT GAC TCC AAT T	<i>Archaea</i>	(Amman ve ark., 1995)
341F-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G CCT ACG GGA GGC AGC AG	<i>Bacteria</i>	(Muyzer ve ark., 1993)
341f	CCT ACG GGA GGC AGC AG	<i>Bacteria</i>	(Muyzer ve ark., 1993)
518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Universal	(Muyzer ve ark., 1993)
907R-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	<i>Bacteria</i>	(Muyzer ve ark., 1993)
907R	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	<i>Bacteria</i>	(Muyzer ve ark., 1993)
344F-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G ACG GGG CGC AGC AGG CGC GA	<i>Archaea</i>	(Schafer veMuyzer, 2001)
344F	ACG GGG CGC AGC AGG CGC GA)	<i>Archaea</i>	(Schafer veMuyzer, 2001)
516R-GC	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G ACC AGA CTT GCC CTC C		Amman ve ark,1990

16S rRNA Gen Dizilerinin Analizi

İzolatların, klonların ya da DGGE bantlarının 16S rRNA geni amplifikasyonlarından elde edilen ürünlerin dizi analizinden sonra elde edilen dizi bilgileri NCBI (“National Center for Biotechnology Information”, (www.ncbi.nlm.nih.gov) genbankasındaki verilerle BLAST (Altschul et al, 1997) programı üzerinden karşılaştırılarak bunların filogenetik benzerlik durumları ortaya konmuştur. Elde edilen diziler ayrıca Clustal X (Versiyon 5) programı kullanılarak da analiz edilmişlerdir. Cluster programı ile filogenetik ilişkilerini ortaya koyan ağaçlar çizilmiştir.

Agaroz Jel Elektroforezleri

Nükleik asitlerin filtrelerden ya da klonlardan ekstraksiyonunu takiben ya da 16S rRNA genlerinin PCR ile amplifikasyonundan sonra bunların elektroforez işlemleri için 1X lik TAE buffer içindeki 5V/cm akım uygulanan %1’lik agaroz jeller kullanılmıştır. İncelenecek nükleik asitin tipine göre jellerde 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) ya da Hind III ile kesilmiş Lambda DNA fragmentleri marker olarak kullanılmıştır. Çukurlara 5 µl örnek ve 1 µl jel yükleme boyası olacak şekilde yükleme yapılmıştır.

ARDRA yöntemi ile oluşacak patternlerin gözlenmesi amacıyla %2’lik agaroz jeller kullanılmıştır. 0.5 X TBE buffer içindeki jellere 5 V/cm akım uygulanmıştır ve örnekler 4 saat yürütülmüştür. 10 µl örnek ve 2 µl örnek yükleme boyası çukurlara yüklenmiştir. ARDRA jellerinde marker olarak 1 Kb Plus DNA ladder ile birlikte 50 bp DNA Ladder (Invitrogen) kullanılmıştır.

Tüm jellerde DNA’nın gözlenebilmesi amacıyla jeller, 0.5 µg/µl konsantrasyonlu etidyum bromid solusyonları içinde 15 dakika bekletildikten sonra 10 dakika kadar da distile su içerisinde tutulmuşlar ve 312 nm dalga boyunda UV veren transilluminatörler yardımıyla gözlenmişlerdir. Jel fotoğrafları Uvitec Jel Dökümantasyon sistemi ile ya da dijital Kodak kamera ile (Digi Doc) elde edilmiştir.

2.2.6.3. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE)

16S rRNA Geninin DGGE Analizi için Amplifikasyonu

DGGE analizi için 16S rRNA geninin amplifikasyonu için “GC clamp” adı verilen yaklaşık 40 nükleotidlik bir diziyi 5’ uçlarında içeren özel primerler kullanılmıştır. Tablo 2.2.’de bu primerler ile ilgili detaylar verilmiştir (Muyzer ve ark 1993). Archaeal 16S rRNA geni amplifikasyonları için 344F-GC ve 907R olarak adlandırılmış olan primerler, Bacteria örnekleri için de 516R-GC ve 907R primerleri kullanılmıştır. Her bir reaksiyonda kalıp DNA olarak filtrelerden yapılan DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen nükleik asitler kullanılmıştır.

Amplifikasyon reaksiyonlarında Bacteria 16S rRNA’sı için aşağıdaki şartlar sağlanmıştır;

İlk Döngü

94 °C	5 dakika
65 °C	1 dakika
72 °C	3 dakika

9 Döngü (her döngüde primer bağlanma sıcaklığı 1 °C azaltılarak)

94 °C	1 dakika	
64 °C (63, 62, 61,...55 °C’e kadar)		1 dakika
72 °C	3 dakika	

20 Döngü

94 °C	1 dakika
55 °C	1 dakika
72 °C	3 dakika

Son Döngü

94 °C	1 dakika
55 °C	1 dakika

72 °C	10 dakika
4 °C	Süresiz

Amplifikasyon reaksiyonlarında Archaea 16S rRNA'sı için aşağıdaki şartlar sağlanmıştır;

94 °C	5 dakika
-------	----------

29 döngü

94 °C	30 saniye
56 °C	45 saniye
72 °C	2 dakika

1 döngü

94 °C	30 saniye
56 °C	45 saniye
72 °C	7 dakika
4 °C	Süresiz

Tüm reaksiyonlar 50 µl hacimde son konsantrasyonları 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 200 µM deoksinükleotidtrifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.2 µM primerler, 2 unite Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde kurulmuştur. Her reaksiyon seti ile birlikte hem pozitif hem de negatif kontrol reaksiyonları hazırlanmıştır. *Salinibacter ruber* DNA'sı Eubacteria için, *Haloferax mediterraneae* DNA'sı Archaea için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontroller DNA içermeyen reaksiyon karışımları ile oluşturulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jellerde gözlenmişlerdir (Muyzer ve ark. 2001).

18S rRNA Geninin DGGE Analizi için Amplifikasyonu

Eukaryotlardaki 18S rRNA geninin amplifikasyonu için de “GC clamp” adı verilen yaklaşık 40 nükleotidlik bir diziyi 5’ uçlarında içeren özel primerler kullanılmıştır. Tablo 2.2. de bu primerler ile ilgili detaylar verilmiştir (Muyzer ve ark 1993).

Eukarya grubu 18S rRNA geni amplifikasyonu için 516R-GC ve 1F primerleri kullanılmıştır. Eukarya üyelerinin 18S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu için 50 µl hacimde son konsantrasyonları 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 200 µM deoksinükleotidtrifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.2 µM primerler, 2 unite Taq DNA polimeraz enzimi ve 3-5 µl template DNA olacak şekilde reaksiyonlar kurulmuştur. 18S rRNA geni amplifikasyonları için kullanılan primerlerin baz dizilimleri Tablo 2.2. de gösterilmiştir.

Reaksiyonlar için Bio-Rad PTC-100 Peltier Thermal Cycler, Eppendorf Master Cycler Gradient cihazları kullanılmıştır.

Eukarya üyelerinin 18S rRNA genlerinin amplifikasyonları için uygulanan reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir;

95 °C	5 dakika	(Denatürasyon),	
95 °C	1 dakika	}	30 Döngü
60 °C	1 dakika		
72 °C	1 dakika		
72 °C	10 dakika		
4 °C	Süresiz		

Tüm çalışmalar boyunca hem pozitif hem de negatif kontrol reaksiyonları hazırlanmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* DNA’sı Eukarya için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontroller DNA içermeyen reaksiyon karışımları ile oluşturulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %1’lik agaroz jellerde gözlenmişlerdir (Sogin 1998; Muyzer ve ark 1996).

Archaea ve Bacteria Grubu 16S rRNA Ürünleri için DGGE

Archaea ve Bacteria spesifik primerlerle filtrelerden elde edilmiş total çevresel DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon reaksiyonlarıyla elde edilen ürünlerin analizi için denatüre edici gradient jel elektroforezi uygulanmıştır. Denatüre edici gradient jel elektroforezi için D-Code Universal Mutasyon Deteksiyon Sistemi (Bio-Rad) kullanılmıştır.

Elektroforez sistemi 1 mm'lik poliakrilamid jellerin oluşumuna izin veren "spacer" lar kullanılarak uygun şekilde hazırlanmış ve sızdırmaz hale getirilmiştir. Sonrasında %0'lık ve %80'lik DGGE stok solusyonları hazırlanmış ve gradient oluşturucu düzenek (Gradient Former 485, Bio-Rad) yardımıyla solusyonların gradient jeli oluşturacak şekilde karıştırılması sağlanmıştır. Jelin artan konsantrasyonda üre ve formamid gradientine sahip olması sağlanmıştır. Archaea ve Bacteria örneklerinin denatüre edici gradient jellerinde denatürant konsantrasyonu %40'dan %70'e kadar artacak şekilde ayarlanmıştır. Polimerize edici ajanlar da eklendikten sonra sistemde alt kısımda yer alan gradient jel ve bunun üzerine denatürant içermeyen yükleme jeli dökülmüş ve çukur oluşumunu sağlayan tarak bu jel içine yerleştirilerek polimerizasyon için en az 4 saat bekletilmiştir.

Polimerizasyon sonrasında elektroforez tankı 1X TAE tamponu ile doldurulmuştur. 20 µl örnek, 5 µl jel yükleme boyası ile karıştırılarak çukurlara yüklenmiş ve tampon sıcaklığı 60 °C'ye ulaştığında sisteme 5 V/cm akım 1 gece boyunca uygulanmıştır. Elektroforez sonrasında jeller etidyum bromür solusyonu (1 µg/ml) ile 10 dakika boyandıktan sonra yaklaşık 15 dakika distile su içine yıkanmış ve transilluminatörde UV ışığı ile gözlenmiştir. Jeller Typhoon 9410 (Amersham Biosciences) jel analiz ve görüntüleme sistemi ile kaydedilmişlerdir.

Jellerde farklı konumlardaki bantlar UV ışığı altında steril bisturi yardımıyla jelden kesilerek steril ependorf tüpleri içine alınmışlardır. Bunların üzerine 20 µl mQ su eklenerek 1 gece 4 °C'de inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrası elüt edilmiş olan DNA, DGGE primerleri ile tekrar amplifiye edilmesi için kalıp olarak kullanılmıştır. Buradan elde edilen ürünler de tekrar saflaştırılarak dizi analizleri yapılmıştır (Muyzer ve ark. 1996).

Eukarya Grubu 18S rRNA Ürünleri için DGGE

Eukarya spesifik primerlerle filtrelerden elde edilmiş total çevresel DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon reaksiyonlarıyla elde edilen ürünlerin analizi için de denatüre edici gradient jel elektroforezi uygulanmıştır. Denatüre edici gradient jel elektroforezi için D-Code Universal Mutasyon Deteksiyon Sistemi (Bio-Rad) kullanılmıştır.

Elektroforez sistemi 1 mm'lik poliakrilamid jellerin oluşumuna izin veren “spacer” lar kullanılarak uygun şekilde hazırlanmış ve sızdırmaz hale getirilmiştir. Sonrasında %0'lık ve %80'lik DGGE stok solusyonları hazırlanmış ve gradient oluşturucu düzenek (Gradient Former 485, Bio-Rad) yardımıyla solusyonların gradient jeli oluşturacak şekilde karıştırılması sağlanmıştır. Jelin artan konsantrasyonda üre ve formamid gradientine sahip olması sağlanmıştır. Eukarya örneklerinin denatüre edici gradient jellerinde denatürant konsantrasyonu %20'dan %50'e kadar artacak şekilde ayarlanmıştır. Polimerize edici ajanlar da eklendikten sonra sistemde alt kısımda yer alan gradient jel ve bunun üzerine denatürant içermeyen yükleme jeli dökülmüş ve çukur oluşumunu sağlayan tarak bu jel içine yerleştirilerek polimerizasyon için en az 4 saat bekletilmiştir.

Polimerizasyon sonrasında elektroforez tankı 1X TAE tamponu ile doldurulmuştur. 20 µl örnek, 5 µl jel yükleme boyası ile karıştırılarak çukurlara yüklenmiş ve tampon sıcaklığı 60 °C'ye ulaştığında sisteme 5 V/cm akım 1 gece boyunca uygulanmıştır. Elektroforez sonrasında jeller etidyum bromür solusyonu (1 µg/ml) ile 10 dakika boyandıktan sonra yaklaşık 15 dakika distile su içine yıkanmış ve transilluminatörde UV ışığı ile gözlenmiştir. Jeller Typhoon 9410 (Amersham Biosciences) jel analiz ve görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmışlardır.

Jellerde farklı konumlardaki bantlar UV ışığı altında steril bisturi yardımıyla jelden kesilerek steril ependorf tüpleri içine alınmışlardır. Bunların üzerine 20 µl mQ su eklenerek 1 gece 4 °C'de inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrası elüt edilmiş olan DNA, DGGE primerleri ile tekrar amplifiye edilmesi için kalıp olarak kullanılmıştır. Buradan elde edilen ürünler de tekrar saflaştırılarak dizi analizleri yapılmıştır (Muyzer ve ark. 1996).

DGGE Jellerinden Benzerlik Dendogramlarının Oluşturulması

DGGE sonrası her örnek bir pattern oluşturmaktadır. Bu patternlerin kendi aralarında karşılaştırılması için jeldeki her banta bir numara verilerek her bantın hangi örneklerde bulunup bulunmadığını gösteren “var-yok” değerlendirmesinde her “var” için “1” ve her yok için “0” değeri kullanılarak bir matriks oluşturulmuştur. Oluşturulan bu matriks kullanılarak SPSS 10 istatistik programında jeldeki her örneğin birbirine göre benzerliğini yansıtan dendogramlar oluşturulmuştur. Bu dendogramlar Archaea, Bacteria ve Eukarya jellerinin her biri için ayrı ayrı oluşturulmuştur.

2.2.6.4. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH)

Bazı Tuz Gölü örneklerinin (Mayıs 2005, Temmuz 2005 ve Ekim 2005) mikrobiyal kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla, Anton ve ark. a göre (1999), FISH tekniği uygulanmıştır. Örnekler için kullanılan probaların özellikleri Tablo 2.3.’de gösterilmiştir.

Fiksasyon

Fiksasyon amacıyla, 1 ml su örneğine 200 µl %37’lik Formaldehit (Fluka) eklenerek, 4 °C’de 1 gece inkübe edilmiştir. Sonrasında 10 ml 1X steril PBS eklenerek karışım 0.2 µm por çaplı GTTP Isopore (Millipore) filtreden geçirilmiştir. Filtrenin yıkanması amacıyla tekrar 1X 10 ml PBS filtreden geçirildikten sonra filtreler hibridizasyon işlemine kadar muhafaza edilmek üzere -20 °C’ye konmuşlardır (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999).

Hibridizasyon

Her bir hibridizasyon reaksiyonu için bir parça filtre üzerine 18 µl hibridizasyon karışımı ve 2 µl kullanılacak probdan (Tablo 2.3.) eklenmiştir. Her bir prob 50 ng/µl konsantrasyonda kullanılmıştır. Hibridizasyon işlemi,

hibridizasyon buffer ile ıslatılmış kağıt içeren 50 ml'lik plastik tüplerde yapılmıştır. Bu tüpler yatay şekilde hibridizasyon fırınına (Combi-H, FINEPCR, Precision, Ind. Co) yerleştirilerek 2 saat boyunca 46 °C'de inkübe edilmişlerdir.

Filtrelerin yıkanması için, 48 °C'lik su banyosunda beklemekte olan yıkama solusyonu içerisine filtreler konarak 15 dakika bekletilmişlerdir. Sonrasında havada tamamiyle kurumaları sağlanmıştır. Bu işlemten sonra filtreler DAPI boyaması için hazır hale getirilmişlerdir (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999).

Tablo 2.3. Çalışmada Kullanılan FISH Proplarının Özellikleri

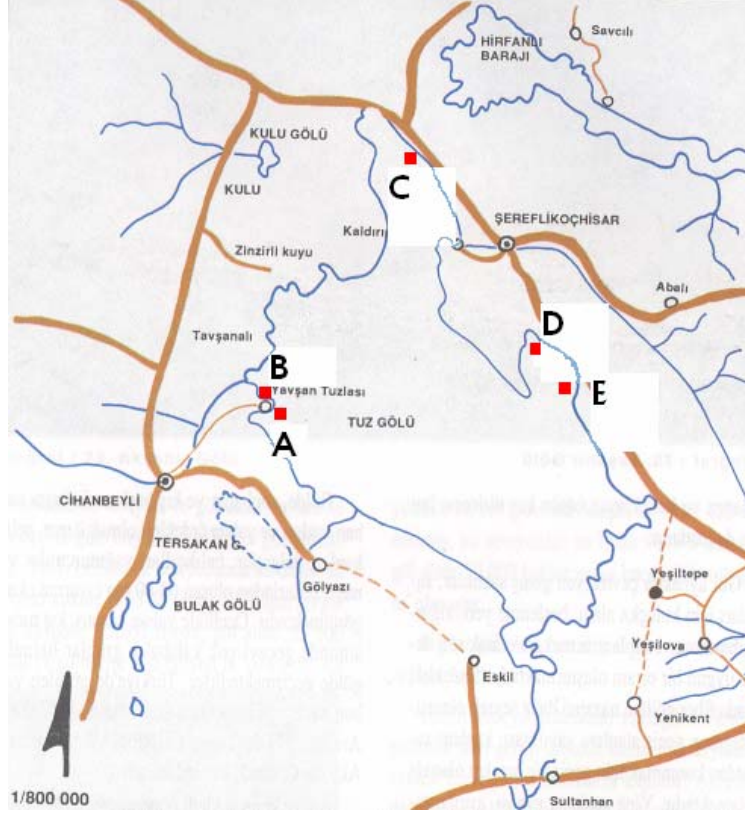
Adı	Dizisi (5' > 3')	Formamid %'si	Probun Spesifitesi	Referans
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35	Bacteria	(Amann ve ark., 1990)
Arc 915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	20	Archaea	(Amann ve ark., 1995)
Non 338	ACTCCTACGGGAGGCAGC	35	negatif kontrol	(Amann ve ark., 1990)
EHB 412	TACGCCCCATAGGGGTGT	35	EHB1 ve EHB2	(Anton ve ark., 2000)
EHB 586	ACATCCGACTTGCTGCCC	35	EHB1	(Anton ve ark., 2000)
EHB 1451	GCCCCTCTCCCTCCGGCT	35	EHB2	(Anton ve ark., 2000)

DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) ile Boyama

Örneklerdeki toplam mikroorganizma sayısının belirlenmesi amacıyla DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) boyaması yapılmıştır. Bunun için, su örneğinin filtrelendiği filtreden küçük bir parça kesilerek üzerine 10 µl DAPI (1 µg/ml konsantrasyonda) damlatılmış ve oda sıcaklığında birkaç dakika bekletilmiştir. %70 lik alkol ile birkaç saniye muamele edildikten sonra steril distile su içerisine daldırılarak yine birkaç saniye bekletilmiş ve havada kurutulmuştur. Bundan sonra mikroskopta gözlem amacıyla, boyanmış olan filtre lam üzerine alınarak üzerine bir damla Citifluor (Citifluor Ltd.) damlatılarak lamel ile kapatılmıştır. 100X luk objektifte epifluoresan mikroskopta inceleme yapılmıştır (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999; Aman ve ark. 2000).

3. BULGULAR

3.1. Çalışma Alanı



Şekil 3.1. Örnekleme alanları

Örnekleme yapılan A, B, C, D ve E bölgelerinin GPS kayıtları ile tespit edilen koordinatları aşağıda verilmiştir:

Örnekleme Noktası	N (Kuzey)	E (Doğu)
A	N 38° 46'25	E 33° 12'57
B	N 38° 45'33	E 33° 08'10
C	N 39° 05'29	E 33° 24'25
D	N 38° 47'26	E 33° 33'56
E	N 38° 44'14	E 33° 36'01

3.2. Örneklerdeki Toplam Tuz Değerlerinin ve İyonik Kompozisyonlarının Belirlenmesi

3.2.1. Örneklerin Toplam Tuzluluk Değerlerinin Belirlenmesi

Su örneklerinin arazide el refraktometresi ile yapılan toplam tuzluluk ölçüm sonuçları Tablo 3.1. de verilmiştir.

3.2.2. Örneklerin pH Değerlerinin Belirlenmesi

Su örneklerinin arazide yapılan pH ölçüm sonuçları Tablo 3.1. de verilmiştir.

		Toplam Tuzluluk	pH
Ağustos 2003	A bölgesi	35	7.6
	B bölgesi	35	7.7
	C bölgesi	35	7.5
	D bölgesi	35	7.5
	E bölgesi	35	7.5
Ekim 2003	A bölgesi	31	7.3
	B bölgesi	31	7.4
	C bölgesi	31	7.3
	D bölgesi	31	7.4
	E bölgesi	31	7.3
Aralık 2003	A bölgesi	23	7.3
	B bölgesi	22	7.2
	C bölgesi	22	7.2
	D bölgesi	22	7.2
	E bölgesi	22	7.3
Şubat 2004	A bölgesi	20	7.2
	B bölgesi	21	7.2
	C bölgesi	21	7.3
	D bölgesi	21	7.3
	E bölgesi	21	7.2
Nisan 2004	A bölgesi	27	7.5
	B bölgesi	28	7.4
	C bölgesi	28	7.4
	D bölgesi	28	7.4
	E bölgesi	28	7.4
Haziran 2004	A bölgesi	32	7.4
	B bölgesi	32	7.4
	C bölgesi	31	7.4
	D bölgesi	32	7.4
	E bölgesi	32	7.4

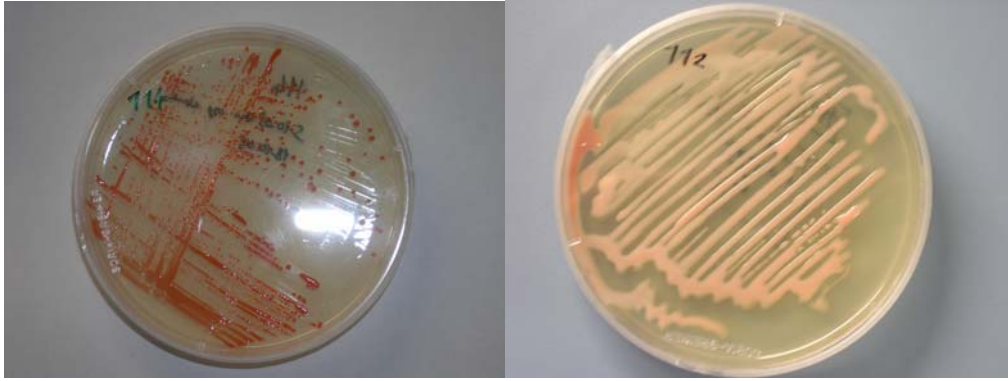
Ağustos 2004	A bölgesi	36	7.6
	B bölgesi	36	7.6
	C bölgesi	36	7.6
	D bölgesi	35	7.6
	E bölgesi	35	7.7
Ekim 2004	A bölgesi	30	7.5
	B bölgesi	29	7.3
	C bölgesi	29	7.4
	D bölgesi	30	7.3
	E bölgesi	30	7.4
Aralık 2004	A bölgesi	20	7.2
	B bölgesi	20	7.1
	C bölgesi	20	7.2
	D bölgesi	20	7.3
	E bölgesi	20	7.2
Mayıs 2005	A bölgesi	24	7.5
	B bölgesi	24	7.4
	C bölgesi	24	7.5
	D bölgesi	24	7.4
	E bölgesi	24	7.5
Temmuz 2005	A bölgesi	36	7.5
	B bölgesi	36	8.0
	C bölgesi	35	7.8
	D bölgesi	35	7.5
	E bölgesi	35	7.5
Ekim 2005	A bölgesi	30	7.4

Tablo 3.1. Örneklerin Arazide Ölçülen Toplam Tuzluluk ve pH Değerleri

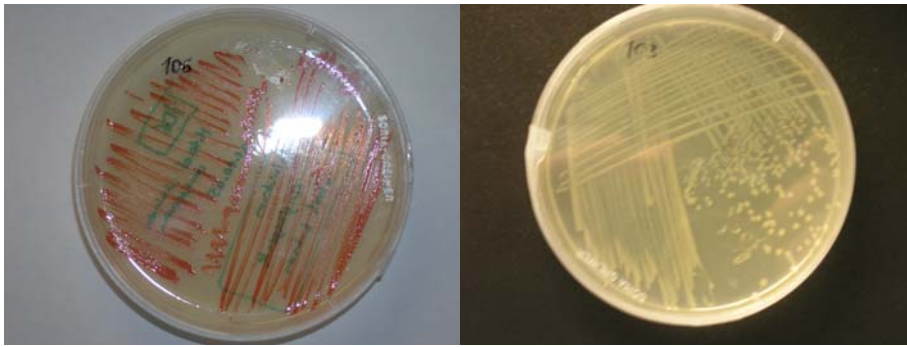
3.3. Su Örneklerinden Archaea ve Bacteria İzolasyonu ve Kültüre Alınmaları

Ön denemelerde %25 SW besiyeri ve Haloarcula besiyerlerinin izolasyon için oldukça uygun oldukları belirlenmiş ve bu nedenle çalışma boyunca bu besiyerleri ile izolasyon yapılmıştır. Yine farklı sıvı besi ortamları (Medyum A, B, C, D, E ve farklı tuz konsantrasyonlarında MG mediumlar) da kültürlerin elde edilmesinde kullanılmışlardır.

Çalışma boyunca renk ve koloni morfoloji açısından farklı olduğu düşünülen 122 adet izolat seçilerek bunlar daha detaylıca çalışılmak üzere stoklanmışlardır. Aşağıdaki şekillerde farklı renk ve biçimli kolonilere sahip bazı izolatların %25 SW besiyerindeki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.2. Farklı pigmentasyona sahip izolatların agar üzerindeki görüntüleri (2005 Mayıs A (114 nolu izolat) ve 2005 Temmuz A (112 nolu izolat))



Şekil 3.3. Farklı pigmentasyona sahip izolatların agar üzerindeki görüntüleri (2005 Temmuz A (106 nolu izolat) ve 2005 Mayıs A (103 nolu izolat))

Bununla birlikte alınan örneklerdeki toplam canlı bakteri sayısı (cfu/ml) tüm istasyonların ortalaması olarak verilmiştir (Tablo 3.2.).

Ağustos 2003	1.8×10^4
Ekim 2003	4×10^4
Aralık 2003	2×10^3
Şubat 2004	$1,15 \times 10^3$
Nisan 2004	4×10^5
Haziran 2004	$3,8 \times 10^5$
Ağustos 2004	2×10^5
Ekim 2004	$3,7 \times 10^4$
Aralık 2004	5×10^3
Mayıs 2005	2×10^3
Temmuz 2005	3×10^4
Ekim 2005	2×10^5

Tablo 3.2. Örneklerdeki canlı bakteri sayısı (cfu/ml)

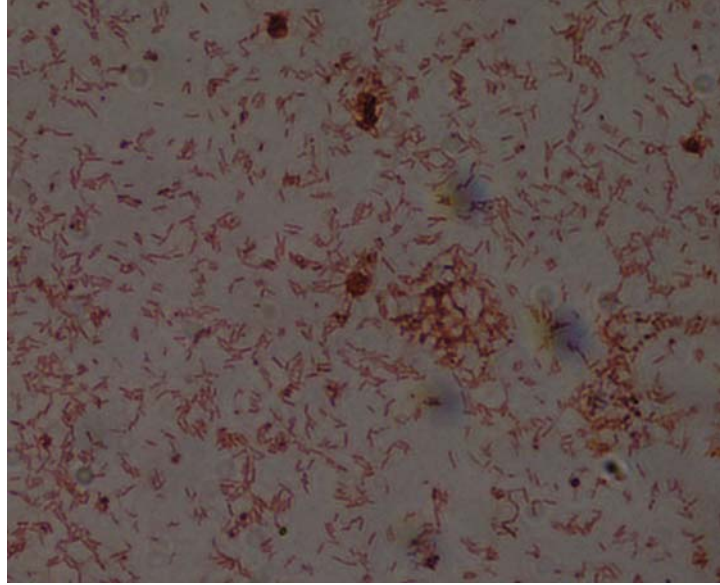
Tablodan da görüldüğü gibi canlı bakteri sayısının mevsime bağlı olarak 10^3 ila 10^5 hücre/ml arasında değiştiği tespit edilmiştir.

3.4. İdentifikasyon

3.4.1 Morfolojik ve Biyokimyasal Testler

Gram Boyama

Gram boyama sonuçlarına göre izolatların hepsi pembe renkli gram negatif (Gr -) Boyanmış ve morfolojileri boyamalar sonrasında yapılan mikroskopik gözlemlerde kısa veya uzun çubuklar, düzensiz üçgenler, disk şeklinde hücreler gözlenmiştir. Şekil 3.4. de modifiye edilmiş Gram boyama sonrası çubuk şekilli ve negatif özellikte boyanmış hücreler görülmektedir.



Şekil 3.4. Modifiye Gram boyama işlemi sonrası Gram negatif olarak boyanmış çubuk şekilli hücreler (102 nolu izolat)

İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu NaCl Miktarının Belirlenmesi

İzolatlar %0, %5, %8, %10, %15, %20 ve %25lik NaCl içeren besiyerlerine ekilmiş ve 37 °C’de inkübasyon sonrası gelişme durumları incelenmiştir. İnkübasyon sonrasında gelişme durumları Tablo 3.3. de verilmiştir. Tablodan da görülebileceği gibi 5, 14, 25, 42, 62, 72, 90, 102 ve 103 nolu izolatlar %5 ile %25 arasındaki NaCl konsantrasyonlarında gelişme göstermişlerdir. Diğer tüm izolatlar ise %10 ile %25 arasındaki besiyerlerinde gelişmişler, bir başka deyişle gelişmek için en az %10 NaCl’ye ihtiyaç duymuşlardır.

İzolat No	%0	%5	%8	%10	%15	%20	%25
1	-	-	-	+	+	+	+
2	-	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	+	+	+	+
7	-	-	-	+	+	+	+

8	-	-	-	+	+	+	+
9	-	-	-	+	+	+	+
10	-	-	-	+	+	+	+
11	-	-	-	+	+	+	+
12	-	-	-	+	+	+	+
13	-	-	-	+	+	+	+
14	-	+	+	+	+	+	+
15	-	-	-	+	+	+	+
16	-	-	-	+	+	+	+
17	-	-	-	+	+	+	+
18	-	-	-	+	+	+	+
19	-	-	-	+	+	+	+
20	-	-	-	+	+	+	+
21	-	-	-	+	+	+	+
22	-	-	-	+	+	+	+
23	-	-	-	+	+	+	+
24	-	-	-	+	+	+	+
25	-	+	+	+	+	+	+
26	-	-	-	+	+	+	+
27	-	-	-	+	+	+	+
28	-	-	-	+	+	+	+
29	-	-	-	+	+	+	+
30	-	-	-	+	+	+	+
31	-	-	-	+	+	+	+
32	-	-	-	+	+	+	+
33	-	-	-	+	+	+	+
34	-	-	-	+	+	+	+
35	-	-	-	+	+	+	+
36	-	-	-	+	+	+	+
37	-	-	-	+	+	+	+
38	-	-	-	+	+	+	+
39	-	-	-	+	+	+	+
40	-	-	-	+	+	+	+
41	-	-	-	+	+	+	+
42	-	+	+	+	+	+	+
43	-	-	-	+	+	+	+
44	-	-	-	+	+	+	+
45	-	-	-	+	+	+	+
46	-	-	-	+	+	+	+
47	-	-	-	+	+	+	+
48	-	-	-	+	+	+	+
49	-	-	-	+	+	+	+
50	-	-	-	+	+	+	+
51	-	-	-	+	+	+	+
52	-	-	-	+	+	+	+
53	-	-	-	+	+	+	+
54	-	-	-	+	+	+	+
55	-	-	-	+	+	+	+
56	-	-	-	+	+	+	+
57	-	-	-	+	+	+	+

58	-	-	-	+	+	+	+
59	-	-	-	+	+	+	+
60	-	-	-	+	+	+	+
61	-	-	-	+	+	+	+
62	-	+	+	+	+	+	+
63	-	-	-	+	+	+	+
64	-	-	-	+	+	+	+
65	-	-	-	+	+	+	+
66	-	-	-	+	+	+	+
67	-	-	-	+	+	+	+
68	-	-	-	+	+	+	+
69	-	-	-	+	+	+	+
70	-	-	-	+	+	+	+
71	-	-	-	+	+	+	+
72	-	+	+	+	+	+	+
73	-	-	-	+	+	+	+
74	-	-	-	+	+	+	+
75	-	-	-	+	+	+	+
76	-	-	-	+	+	+	+
77	-	-	-	+	+	+	+
78	-	-	-	+	+	+	+
79	-	-	-	+	+	+	+
80	-	-	-	+	+	+	+
81	-	-	-	+	+	+	+
82	-	-	-	+	+	+	+
83	-	-	-	+	+	+	+
84	-	-	-	+	+	+	+
85	-	-	-	+	+	+	+
86	-	-	-	+	+	+	+
87	-	-	-	+	+	+	+
88	-	-	-	+	+	+	+
89	-	-	-	+	+	+	+
90	-	-	+	+	+	+	+
91	-	-	-	+	+	+	+
92	-	-	-	+	+	+	+
93	-	-	-	+	+	+	+
94	-	-	-	+	+	+	+
95	-	-	-	+	+	+	+
96	-	-	-	+	+	+	+
97	-	-	-	+	+	+	+
98	-	-	-	+	+	+	+
99	-	-	-	+	+	+	+
100	-	-	-	+	+	+	+
101	-	-	-	+	+	+	+
102	-	+	+	+	+	+	+
103	-	+	+	+	+	+	+
104	-	-	-	+	+	+	+
105	-	-	-	+	+	+	+
106	-	-	-	+	+	+	+
107	-	-	-	+	+	+	+

108	-	-	-	+	+	+	+
109	-	-	-	+	+	+	+
110	-	-	-	+	+	+	+
111	-	-	-	+	+	+	+
112	-	-	-	+	+	+	+
113	-	-	-	+	+	+	+
114	-	-	-	+	+	+	+
115	-	-	-	+	+	+	+
116	-	-	-	+	+	+	+
117	-	-	-	+	+	+	+
118	-	-	-	+	+	+	+
119	-	-	-	+	+	+	+
120	-	-	-	+	+	+	+
121	-	-	-	+	+	+	+
122	-	-	-	+	+	+	+

Tablo 3.3. İzolatların farklı NaCl konsantrasyonlarındaki gelişme durumları

İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu Sıcaklığın Belirlenmesi

İzolatlar %25 SW agar ve Haloarcula agar besiyerlerine ekildikten sonra 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C ve 55 °C’lik etüvlerde inkübasyona bırakılmışlardır. Sonuçlar değerlendirilirken 3 haftalık inkübasyon sonrasında agar üzerindeki gelişme durumları karşılaştırılmış ve izolatların e optimum gelişme gösterdikleri gözlenmiştir. 25 °C, 30 °C ve 45 °C üreme olmuş ancak 37 °C’deki kadar hızlı olmamıştır. 55 °C de ise petrilerin çoğunda üreme görülmemiştir.

İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu pH Değerinin Belirlenmesi

İzolatlar pH’sı 3, 5, 7, 9 ve 11’e ayarlanmış %25 SW besiyerlerine ekildikten sonra 37 °C, etüvde inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrasında gelişme için optimum pH nın tüm izolatlar için 7-8 arasında olduğu belirlenmiştir.

İzolatların Farklı Karbon ve Şeker Kaynaklarını Kullanma Durumunun Belirlenmesi

İzolatların farklı karbon ve şeker kaynaklarını kullanabilme yetenekleri ile ilgili test sonuçlarına göre. Tüm izolatlar Glukoz, Fruktoz, Galaktoz, Sukroz, Trehaloz, Mannitol ve Gliserolü kullanabilme yeteneğindedir.

3.4.2. Antibiyotiklere Duyarlılık Testi

SW besiyerine kültürlerin yayma ekimleri yapıldıktan sonra agar yüzeyine Penicillin G (10 U), Ampicillin (10 mg), Bacitracin (10 µg), Vancomycin (30 µg), Tetracycline (30 µg), Novobiocin (30 mg), Cloramphenicol (30 µg) diskleri konarak petriler 37 °C’de inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrası antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zonlarının varlığı kontrol edilmiştir. 122 izolattan 9 tanesi (5, 14, 25, 42, 62, 72, 90, 102 ve 103) hariç diğer tümü Penisilin G’ye, Vankomisin ve Kloramfenikol’e karşı dirençli olarak bulunmuştur. Penisilin G’ye direnç Archaea’ya ait bir özelliktir. Yine 122 izolattan 9 tanesi (5, 14, 25, 42, 62, 72, 90, 102 ve 103) hariç diğer tümünün Basitrasin ve Novobiosine duyarlı oldukları belirlenmiştir ki bu da Archaeaların genel karakteristik özelliklerindendir.

İzolatların farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetleri ile ilgili test sonuçları Tablo 3.4.’de verilmiştir.

Izolat No	Penicillin G (10 U)	Ampicillin (10 mg)	Bacitracin (10 µg)	Vancomycin (30 µg)	Tetracycline (30 µg)	Novobicin (30 mg),	Cloramphenicol (30 µg)
1	R	R	S	R	R	S	R
2	R	R	S	R	R	S	R
3	R	R	S	R	S	S	R
4	R	R	S	R	R	S	R
5	S	S	R	R	R	S	S
6	R	R	S	R	R	S	R
7	R	R	S	R	R	S	R
8	R	R	S	R	R	S	R
9	R	R	S	R	S	S	R
10	R	R	S	R	R	S	R
11	R	R	S	R	R	S	R
12	R	R	S	R	S	S	R
13	R	R	S	R	R	S	R
14	S	S	R	R	R	S	S
15	R	R	S	R	R	S	R
16	R	R	S	R	S	S	R
17	R	R	S	R	R	S	R
18	R	R	S	R	R	S	R
19	R	R	S	R	S	S	R
20	R	R	S	R	R	S	R
21	R	R	S	R	R	S	R
22	R	R	S	R	S	S	R
23	R	R	S	R	R	S	R
24	R	R	S	R	R	S	R
25	S	S	R	R	R	S	S
26	R	R	S	R	R	S	R
27	R	R	S	R	S	S	R
28	R	R	S	R	R	S	R
29	R	R	S	R	R	S	R
30	R	R	S	R	S	S	R
31	R	R	S	R	R	S	R
32	R	R	S	R	R	S	R
33	R	R	S	R	S	S	R
34	R	R	S	R	R	S	R
35	R	R	S	R	R	S	R
36	R	R	S	R	S	S	R

37	R	R	S	R	R	S	R
38	R	R	S	R	R	S	R
39	R	R	S	R	S	S	R
40	R	R	S	R	R	S	R
41	R	R	S	R	S	S	R
42	S	S	R	R	R	S	S
43	R	R	S	R	R	S	R
44	R	R	S	R	R	S	R
45	R	R	S	R	S	S	R
46	R	R	S	R	R	S	R
47	R	R	S	R	R	S	R
48	R	R	S	R	S	S	R
49	R	R	S	R	R	S	R
50	R	R	S	R	R	S	R
51	R	R	S	R	S	S	R
52	R	R	S	R	R	S	R
53	R	R	S	R	R	S	R
54	R	R	S	R	S	S	R
55	R	R	S	R	R	S	R
56	R	R	S	R	R	S	R
57	R	R	S	R	S	S	R
58	R	R	S	R	R	S	R
59	R	R	S	R	R	S	R
60	R	R	S	R	S	S	R
61	R	R	S	R	R	S	R
62	S	S	R	R	R	S	S
63	R	R	S	R	R	S	R
64	R	R	S	R	S	S	R
65	R	R	S	R	R	S	R
66	R	R	S	R	R	S	R
67	R	R	S	R	S	S	R
68	R	R	S	R	R	S	R
69	R	R	S	R	R	S	R
70	R	R	S	R	S	S	R
71	R	R	S	R	R	S	R
72	S	S	R	R	R	S	S
73	R	R	S	R	R	S	R

74	R	R	S	R	S	S	R
75	R	R	S	R	R	S	R
76	R	R	S	R	R	S	R
77	R	R	S	R	S	S	R
78	R	R	S	R	R	S	R
79	R	R	S	R	R	S	R
80	R	R	S	R	S	S	R
81	R	R	S	R	R	S	R
82	R	R	S	R	S	S	R
83	R	R	S	R	R	S	R
84	R	R	S	R	R	S	R
85	R	R	S	R	S	S	R
86	R	R	S	R	R	S	R
87	R	R	S	R	R	S	R
88	R	R	S	R	S	S	R
89	R	R	S	R	R	S	R
90	S	S	R	R	R	S	S
91	R	R	S	R	R	S	R
92	R	R	S	R	S	S	R
93	R	R	S	R	R	S	R
94	R	R	S	R	R	S	R
95	R	R	S	R	S	S	R
96	R	R	S	R	R	S	R
97	R	R	S	R	R	S	R
98	R	R	S	R	S	S	R
99	R	R	S	R	R	S	R
100	R	R	S	R	R	S	R
101	R	R	S	R	R	S	R
102	S	S	R	R	R	S	S
103	S	S	R	R	R	S	S
104	R	R	S	R	R	S	R
105	R	R	S	R	S	S	R
106	R	R	S	R	R	S	R
107	R	R	S	R	R	S	R
108	R	R	S	R	S	S	R
109	R	R	S	R	R	S	R
110	R	R	S	R	R	S	R

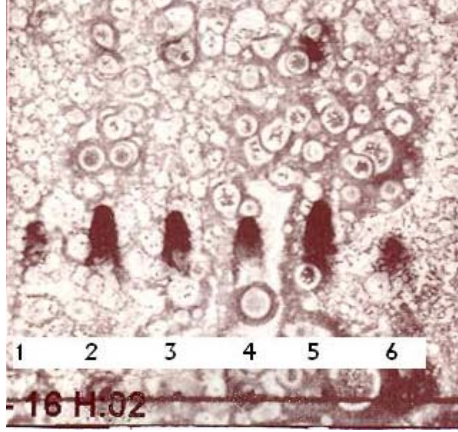
111	R	R	S	R	S	S	R
112	R	R	S	R	R	S	R
113	R	R	S	R	R	S	R
114	R	R	S	R	S	S	R
115	R	R	S	R	R	S	R
116	R	R	S	R	R	S	R
117	R	R	S	R	S	S	R
118	R	R	S	R	R	S	R
119	R	R	S	R	R	S	R
120	R	R	S	R	S	S	R
121	R	R	S	R	R	S	R
122	R	R	S	R	R	S	R

Tablo 3.4. İzolatların farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetleri

3.4.3. Polar Lipid Analizleri

Lipid analizleri için ekstraksiyon Oren ve ark 1999'a göre gerçekleştirilmiştir. Ancak makalede belirtilen yöntem uygulandığı halde izolatları ayırd edici bir şekilde lipid spotları elde edilememiştir. Sadece fosfotidilgliserol (PG) ve fosfotidilgliserolmetilsülfata (PGP-Me) ait spotlar elde edilmiştir. Şekil 3.5. de sırasıyla *H. volcani*, *H. hispanica*, *H. borinquense*, *Halobacterium* spp., 44 ve 54 nolu izolatlara ait polar lipid ekstraktları İnce Tabaka Plağı üzerine uygulanmıştır. Plak üzerine Orsinol Ferrik Klorid reagent spreylene, 150 °C'de ısıtılması sonrasında oluşan glikolipid spotları görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi referans halofillerlerle birlikte 44 ve 54 nolu izolatlarda aynı spotları vermiştir. Orsinol ferrik klorid spreyi tüm fosfolipid ve glikolipidlerin tayininde kullanılmaktadır. Moybdenum Blue spreylene denilen reagent ise yalnız fosfolipidlerin tayininde kullanılmaktadır. Şekil 3.6. da da sırasıyla *H. volcani*, *H. hispanica*, *H. borinquense*, *Halobacterium* spp., 44 ve 54 nolu izolatlara ait polar lipid ekstraktları İnce Tabaka Plağı üzerine uygulanmıştır. Plak üzerine Moybdenum Blue reagent spreylendikten sonra oluşan mavi renkli

spotlar fosfolipidler olarak değerlendirilmiştir. İzolatların referanslar ile benzer spotları verdiği gözlenmiştir.



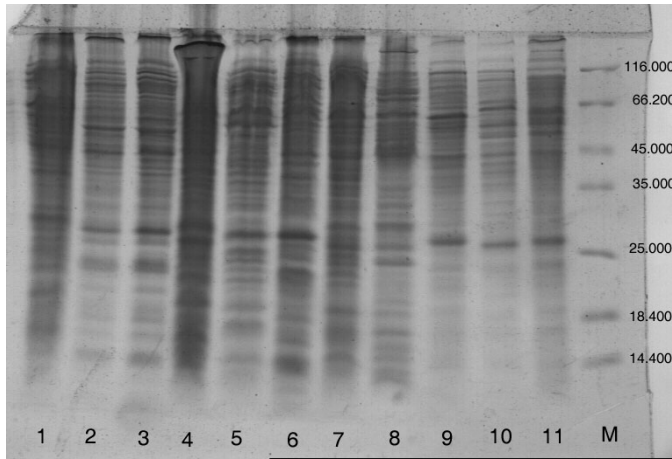
Şekil 3.5. Orsinol Ferrik Klorid reagent spreyleneip, 150 °C’de ısıtılması sonrasında oluşan glikolipid spotları (*H. volcani*, *H. hispanica*, *H. borinquense*, *Halobacterium* spp., 44 ve 54)



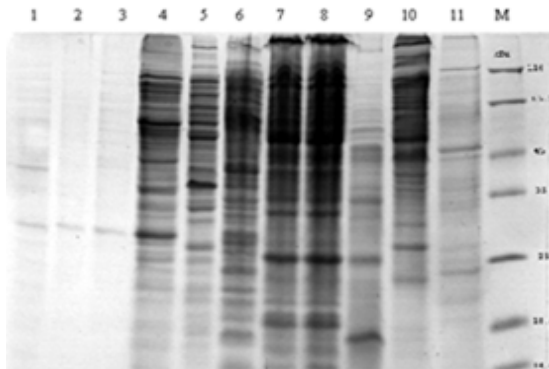
Şekil 3.6. Plak üzerine Moybdenum Blue reagent spreylendikten sonra oluşan mavi renkli spotlar fosfolipidler (*H. volcani*, *H. hispanica*, *H. borinquense*, *Halobacterium* spp., 44 ve 54)

3.4.4. Toplam Hücre Proteinlerinin Eldesi ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) ile Analizi

22 adet izolata ve 11 adet referans halofilik mikroorganizmaya ait toplam hücre proteinlerinin profilleri SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Aşağıda (Şekil 3.7.) izolatlara ait tipik bir jel görüntüsü verilmektedir. Şekil 3.8. de ise referans halofillere ait toplam hücre proteinlerinin jel elektrofözezi fotoğrafı verilmiştir.

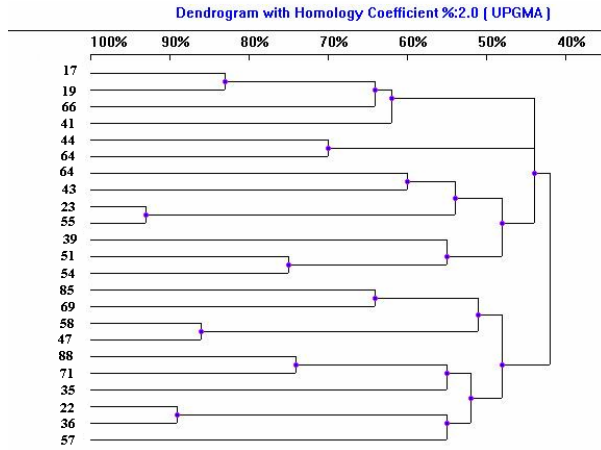


Şekil 3.7. Sırası ile izolatlar: 17, 22, 36, 41, 44, 57, 64, 69, 71, 85, 88, M:Marker (116-14.4 kDa)



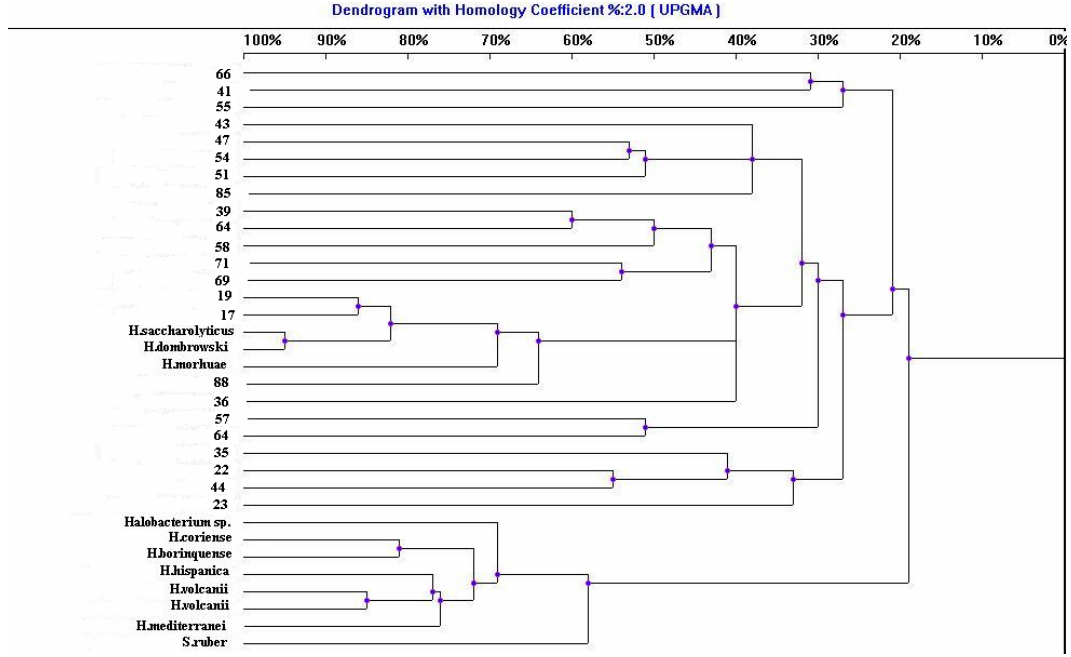
Şekil 3.8. Referans halofilik bakterilerin SDS-PAGE ile ortaya konmuş toplam hücre proteinleri sırasıyla: *Halococcus saccharolyticus* DSM 5350, *Halococcus dombrowski* DSM 14522, *Halococcus morrhuae* DSM 1307, *Halorubrum coriense*, *Halogeometricum boringuense*, *Haloarcula hispanica* ATTC 33960, *Haloferax volcanii* NCMB 2012, *Haloferax volcanii*, *Haloferax mediterranei*, *Halobacterium* sp. NRC-1 ATCC-700922, *Salinibacter ruber* M31 ve Marker (116-14.4 kDa).

Bu jellerde yer alan izolatların birbirlerine göre benzerlikleri Uvitec Jel Dokumantasyon Sistemi ile analiz edilmiş ve 22 izolatın benzerlik dendogramı elde edilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Tuz Gölü izolatlarının SDS-PAGE analizi sonrası elde edilen benzerlik dendogramı

Şekildeki dendogramda da görüldüğü gibi tüm örneklerin birbirlerine benzerlikleri %50 civarındadır. Bazı örneklerde %90'ın üzerinde benzerlik gözlemlenmektedir. 23 ve 55 numaralı izolatlar %90'ın üzerinde benzerlik göstermektedir. 17, 19, 58, 47, 22 ve 36 numaralı izolatlar ise genel olarak %80'in üzerinde benzerliğe sahiptirler. İzolatlara ait toplam proteinlerin yürütüldüğü her iki jelde de 113 kDa ile 25 kDa arasında oldukça yoğun bantlaşma görülmüş, ancak 25 kDa altında daha az bantlaşmanın olduğu belirlenmiştir. İzolatların çoğu referans halofillere benzer olarak 25 kDa'nın hemen üstünde oldukça belirgin bir banta sahiptirler.



Şekil 3.10. Tuz Gölü izolatları ve referans halofillerin SDS-PAGE analizi sonrası elde edilen benzerlik dendogramı

Şekil 3.10. de referans halofilik organizmalar ve Tuz Gölü izolatlarının benzerlik yönünden birlikte değerlendirildikleri dendogram yer almaktadır. Bu dendogram incelendiği zaman *Halococcus saccharolyticus* ve *Halococcus dombrowski*'nin %90'ın üzerinde benzerlik göstermesine rağmen *Halococcus morrhuae* bu iki organizmaya %70 benzerlik göstermiştir. İzolat 17 ve 19 ise *Halococcus* genusu örneklerine %80'in üzerinde benzerlik göstermiştir.

Bunun dışında diğer referans halofillerin kendi aralarında %70 benzerliği paylaştığı açıkça görülmektedir. İzolatların genel benzerlik oranı ise bu analiz sonrası %30'lara kadar düşmüştür.

3.4.5. Nükleik asit analizine dayalı testler

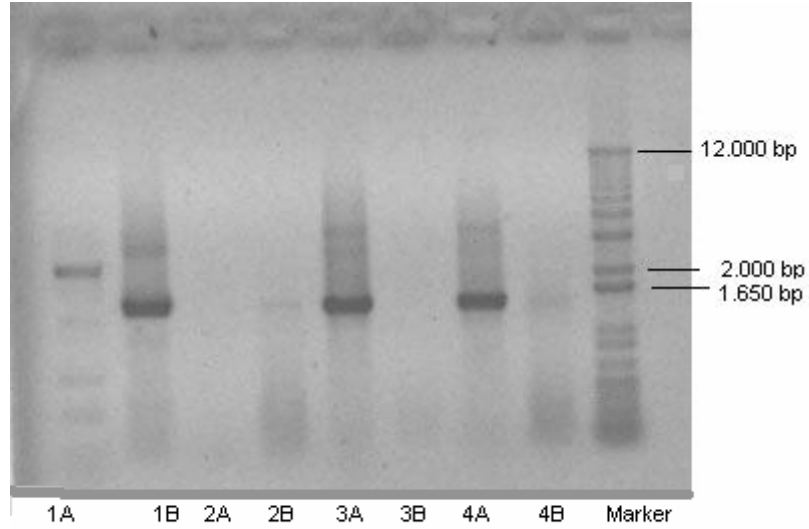
16S rRNA Geni Amplifikasyonu için İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada Tuz Gölü'nden izole edilen mikroorganizmaların 16S rRNA geni amplifikasyonları için kullanılan distile su içinde homojenizasyon sonrası kaynatma esasına dayanan yöntemin DNA ekstraksiyonu için yeterli olduğu görülmüştür.

16S rRNA Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu (İzolatların Archaea –Bacteria Ayrımlarının Yapılması)

İzolatların 16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu ve bu sayede Archaea üyesi mi yoksa Bacteria üyesi mi olduklarının tespiti için yapılan PCR lar sonrası elde edilen ürünler %1'lik agaroz jellerde yürütülmüşlerdir. Şekil 3.11. de 16S rRNA geni ürünleri jelde görülmektedir. Örnek teşkil etmesi amacıyla seçilen bu jel fotoğrafında da görüldüğü gibi her örnek için hem Archaea hem de Bacteria primer setleri ile PCR kurulmuş ve sadece Archaea ürünü veya sadece Bacteria ürünü elde edilerek öncelikle örneğin Archaea veya Bacteria olup olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 3.11. deki jel fotoğrafında da görüldüğü gibi aynı örneğin Archaea ve Bacteria primer setleri ile yapılan PCR sonrası ürünler jelde yan yana yüklenmiştir. 1A ve 1B (A=Archaea, B=Bacteria) reaksiyonlarının ikisi de ürün vermiştir. Ancak 16S rRNA yaklaşık 1500 bp'lik ürün vermesi gerektiği için bu durumda 1B örneğinin bu koşula uyduğu görülür. Ancak 1A'da görülen ürün her ne kadar 1500 bp'lik değilse de bu bir kontaminasyonun işareti olabilir düşüncesiyle bu durumdaki örneklerin işlemleri de tekrarlanmıştır.

İkinci örneğimiz ise ne 2A ne de 2B reaksiyonlarında ürün vermemiştir. Çalışma sırasında bu durumdaki örneklerden tekrar DNA izolasyonu yapılarak bunların PCR ları da tekrarlanmıştır.



Şekil 3.11. 16S rRNA geni amplifikasyon ürünleri (A= Archaeal primerler ile reaksiyon ve B=Bacteria primerleri ile reaksiyon)

Üçüncü ve dördüncü örnekler ise sadece Archaeal primerlerle ürün vermişlerdir ve çok net bir şekilde Archaeal 16S'e sahip oldukları belirlenmiştir.

Genel olarak bu anlayış çerçevesinde izolatların 16S rRNA geni amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir.

Buna göre detaylı olarak dizi analizleri gerçekleştirilmek üzere petri üzerinde farklı koloni özelliklerine göre seçilen 25 izolata ait olan ve hangi domaine ait olduklarını gösteren tablo aşağıda verilmiştir (Tablo 3.5.) .

İzolat No	Archaea	Bacteria
97	+	-
98	+	-
99	+	-
101	+	-
102	-	+
103	-	+
104	+	-
105	+	-

106	+	-
107	+	-
108	+	-
109	+	-
110	+	-
111	+	-
112	+	-
113	+	-
114	+	-
115	+	-
116	+	-
117	+	-
118	+	-
119	+	-
120	+	-
121	+	-
122	+	-

Tablo 3.5. 16S rRNA ürünlerine göre izolatların ait oldukları domain (Archaea ya da Bacteria).

PCR Ürünlerinden Dizi Analizi

Kültür haline getirilmiş 25 adet izolatdan DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA'nın 16S rRNA geni PCR ile amplifiye edilerek bu ürünlerin direkt olarak dizi analizlerinin eldesi yoluna gidilmiştir. Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı ile bu elde edilen PCR ürünlerinin baz dizilerinin belirlenmesi amacıyla Beckman dizi analiz kitinde önerilen şartlar ile sonuçlar alınmıştır.

Kültürlerin bir kısmının 16S rRNA analizleri de ABI Prism 310 DNA dizi analiz cihazı ve bu cihazın kitleri ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6.'da dizi analizleri yapılmış izolatlar ve bunların Blast programı ile benzerlik gösterdiği türler verilmiştir.

Blast Sonucu	Benzerlik Oranı	İzolat Sayısı
<i>Haloarcula hispanica</i>	(98%)	7
<i>Haloarcula argentinensis</i>	(98%)	2
<i>Haloarcula marismortui</i>	(98%)	1
<i>Haloferax mediterranei</i>	(99%)	2
<i>Haloferax alexandrinus</i>	(99%)	2
<i>Halorubrum xinjiangense</i>	(98%)	3
<i>Halomicrobium mukohatei</i>	(%98)	3
<i>Chromohalobacter marismortui</i>	(98%)	2

Tablo 3.6. Genel olarak analizi yapılan izolatların gen bankasındaki en yakın temsilcileri, benzerlik oranları ve izolat sayısı

Bunların dizi analizler 21F, 1492R ve 907R primerleri (Tablo 2.2.) ile gerçekleştirilmiştir. Bu tabloda yer alan izolatların izolat numaraları ve izole edildikleri zamanlar aşağıdaki gibidir;

2005 Mayıs İzolatları: 101 (*H. hispanica*), 103 (*C. marismortui*), 105 (*H. hispanica*), 107 (*H. xinjiangense*), 110 (*H. argentinensis*), 111 (*H. hispanica*), 114 (*H. marismortui*), 115 (*H. mukohatei*), 118 (*H. mediterranei*), 120 (*H. alexandrinus*)

2005 Temmuz İzolatları: 102 (*C. marismortui*), 104 (*H. hispanica*), 106 (*H. xinjiangense*), 108 (*H. hispanica*), 109 (*H. hispanica*), 112 (*H. mediterranei*), 113 (*H. argentinensis*), 116 (*H. xinjiangense*), 117 (*H. alexandrinus*), 119 (*H. mukohatei*)

2005 Ekim İzolatları: 121 (*H. mukohatei*), 122 (*H. hispanica*) olarak bulunmuşlardır.

Aralık 2004 İzolatları: Kısmi dizi analizleri gerçekleştirilen izolatlar 97 (*H. mediterranei*), 98 (*H. marismortui*) ve 99 (*H. marismortui*).

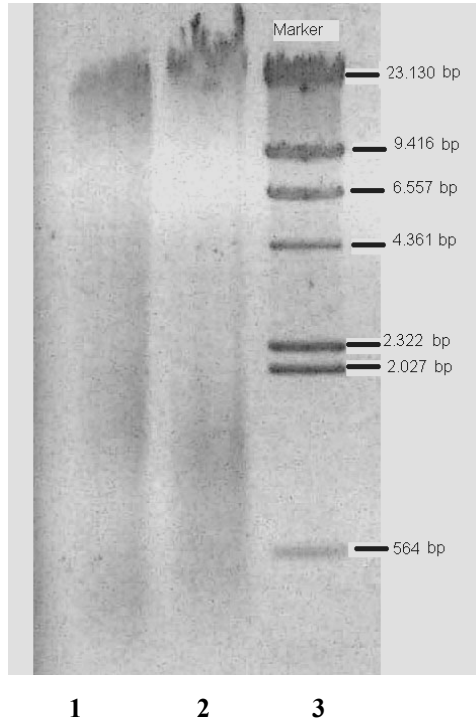
Bu izolatların dizi analizleri sadece 21F primeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısmi “partial” dizi analizlemelerinde 21F primeri ile

yaklaşık olarak 540 baz okuması yapılmıştır ve benzerlik oranları %96-97 olarak bulunmuştur.

3.5. Halofilik Mikrobiyal Kommünite Analizleri

3.5.1. Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

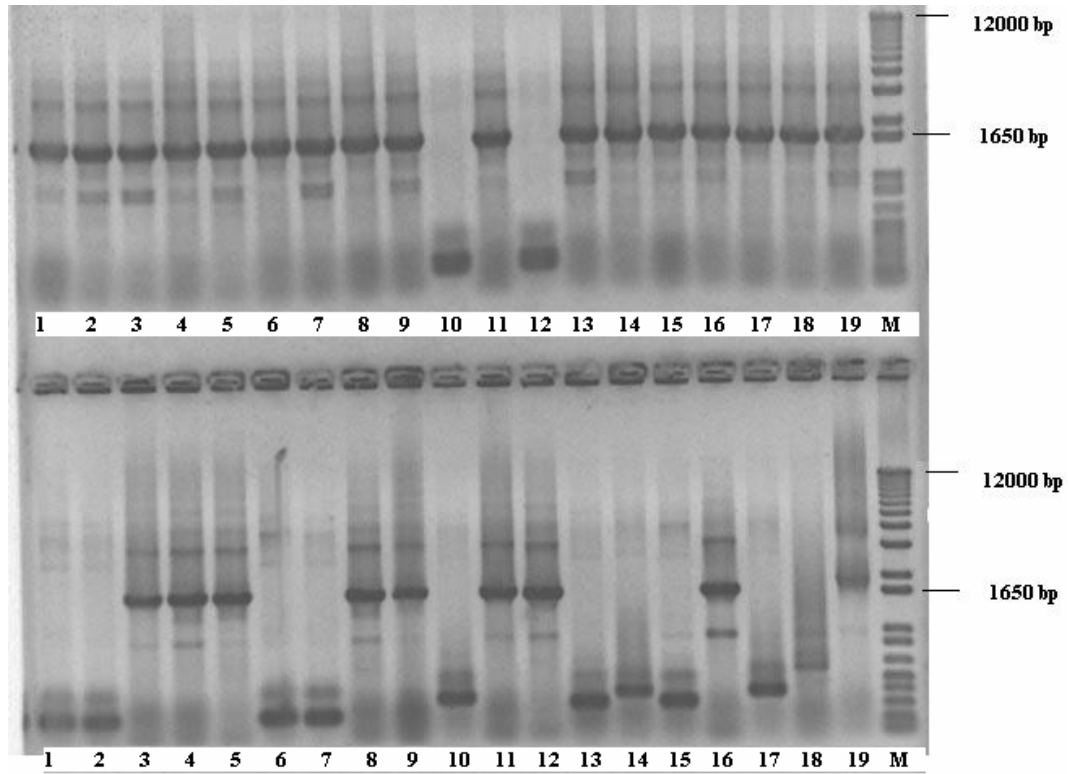
2005 yılı Mayıs, Temmuz ve Ekim Aylarına ait su örneklerinden DNA ekstraksiyonu Cifuentes ve ark. (2000) ve Nogales ve ark. (1999) a göre küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.12. de DNA ekstraksiyonu sonrası örneklerin agaroz jeldeki durumları görülmektedir.



Şekil 3.12. Su örneklerinden DNA ekstraksiyonu sonrası Mayıs (1.çukur) ve Temmuz (2.çukur) 2005 örneklerine ait DNA'lar ve marker (3.çukur) (Hind III ile kesilmiş Lambda DNA)

3.5.2. 16S rRNA Gen Kütüphanesi Oluşturulması (16S rRNA Genlerinin Klonlanması, Klonların Seçimi ve Klonlardan Dizi Analizleri)

LB petrilerinde 16S rRNA geni için yapılmış olan PCR'dan gelen ürünleri taşıyan beyaz kolonilerden (her bir petride yaklaşık 300 civarında beyaz koloni elde edilmiştir) Archaea için 300 adet ve Bacteria için 300 adet olmak üzere toplam 600 koloni, X-Gal ve ampisilin içeren yeni LB ortamlarına transfer edilmişlerdir. 37 °C'de 1 gece inkübasyondan sonra bu klonların her birinden PCR kurularak bunların istenilen büyüklükte inserte sahip olup olmadıkları kontrol edilmiştir. Şekil 3.13. de insert büyüklüklerinin tesbiti için yapılan PCR'lar sonrası elde edilen jel fotoğraflarından biri görülmektedir.



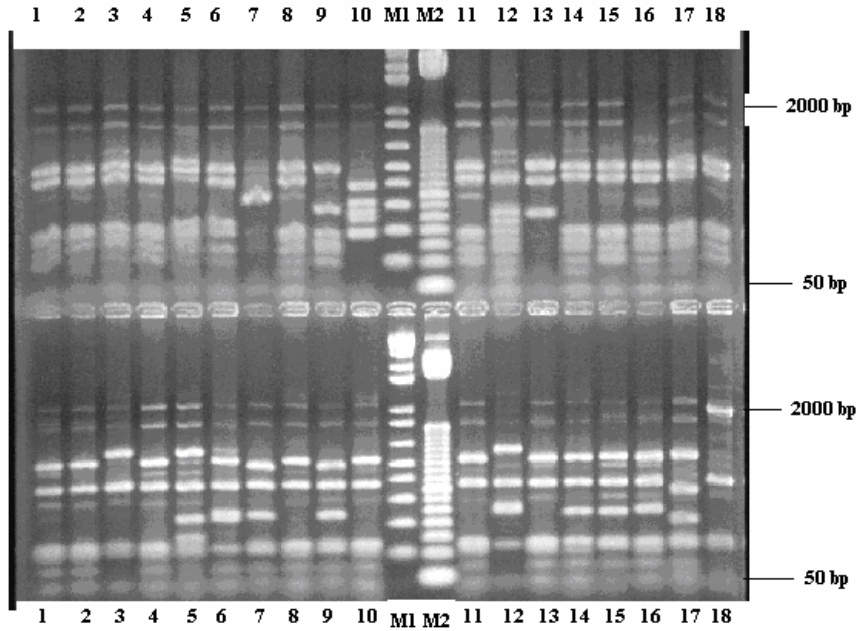
Şekil 3.13. Klonların seçimi için insert büyüklüklerinin kontrolü amacıyla yapılan PCR sonrası elde edilen jel (Üst sırada sırasıyla Archaeal klonlar 3-86, 3-93, 3-87, 2-9, 2-8, 2-12, 3-82, 2-3, 2-1, 3-95, 2-33, 3-92, 2-60, 2-11, 2-47, 1-1, 1-33, 2-95, 3-96 ve 1 kb Marker ve alt sırada Bacterial klonlar: 1-36, 2-4, 1-8, 2-16, 1-95, 1-47, 2-8, 3-35, 3-90, 2-36, 1-1, 1-92, 2-1, 3-80, 2-3, 1-28, 3-4, 3-26, 3-93 ve 1 kb Marker)

Şekildeki jel fotoğrafında da görüldüğü gibi beyaz renkli kolonilerden yapılan PCR ile insert büyüklükleri kontrol edildiğinde, klonların hepsinin istenen büyüklükte inserti içermediği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle istenen büyüklükte insert içeren klonların bulunması amacıyla kolonilerden PCR işlemi devam ettirilmiştir. Sonuçta Archaea için 108 adet ve Bacteria için 100 adet uygun inserte sahip olduğu bilinen klonlar elde edilmiştir. 108 Archaea klonunun eldesi için 155 koloniden ve 100 Bacteria klonunun eldesi için 180 koloniden PCR yapılmıştır.

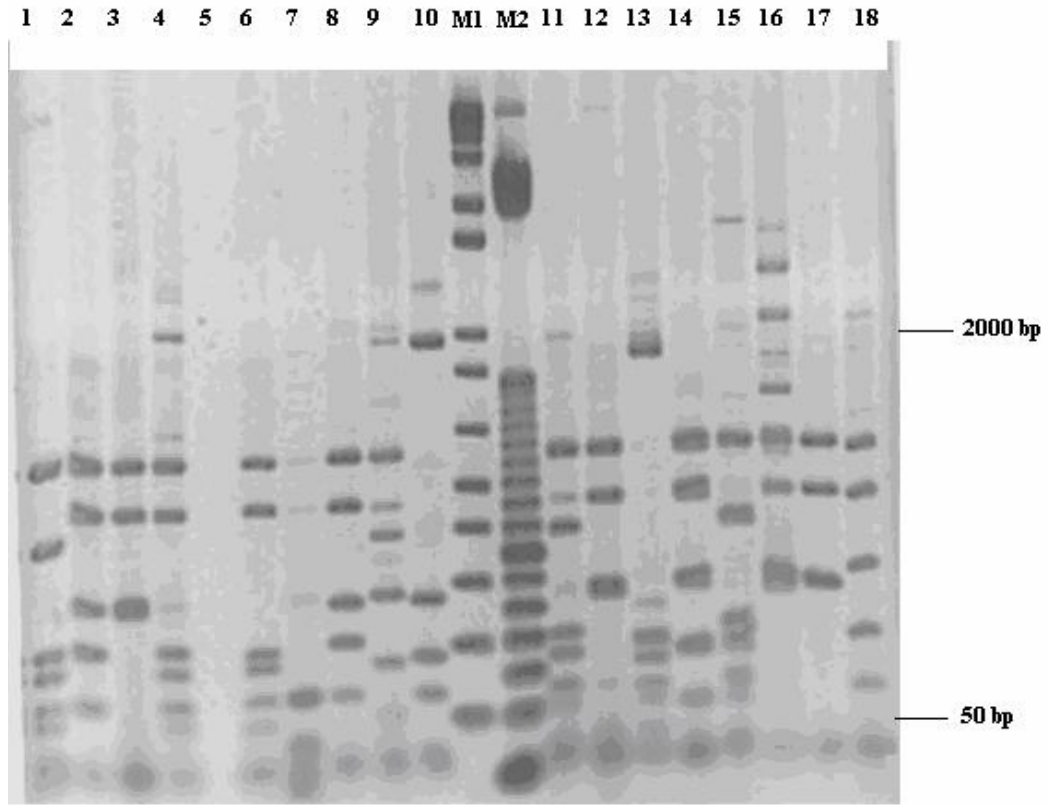
Klonlara Ait 16S rRNA Geni Amplifikasyonu Ürünlerinin Enzimatik Kesimi (ARDRA)

Klonlardaki 16S rRNA geni için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri için *Hinf*I ve *Mbo*I enzimleri (New England Biolabs) kullanılmıştır.

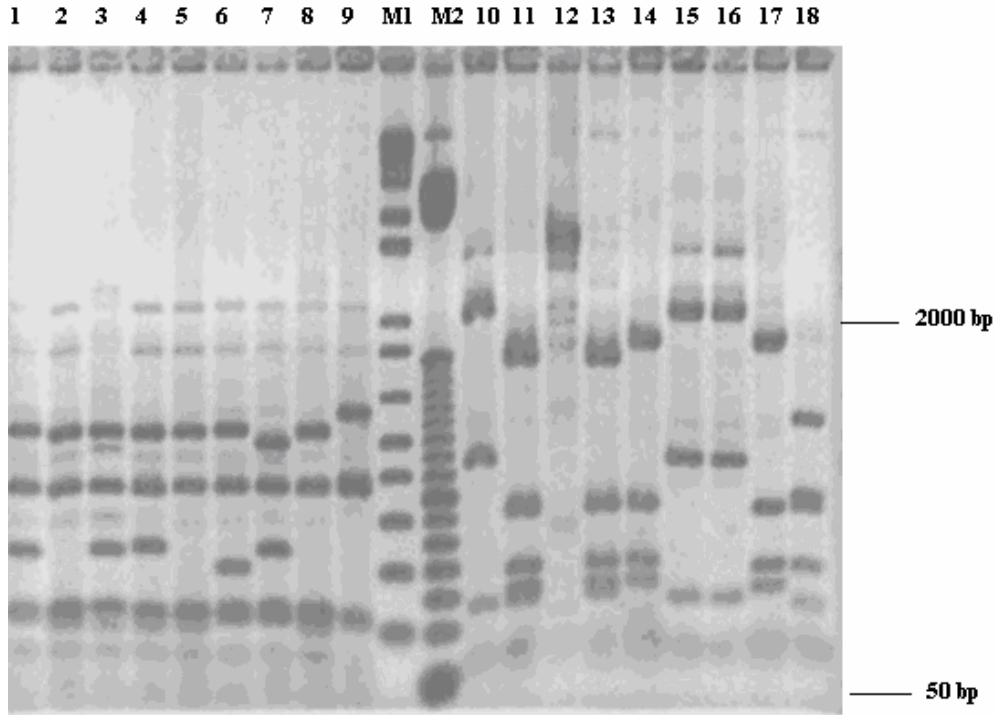
Restriksiyon kesimleri sonrası %2 lik agaroz jele yüklenerek yürütülmüş olan jellerden bazıları aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.14. *Hinf*I enzimi ile kesim sonrası %2'lik agaroz jelde yürütülmüş olan örnekler (M1: 1kb marker ve M2: 50 bp marker) (Üst sıra Bacteria klonları sırasıyla: 2-32, 1-95, 2-80, 3-35, 3-93, 3-5, 2-2, 1-74, 1-8, 1-92, 2-19, 2-96, 1-42, 2-27, 2-16, 1-28, 1-1, 3-90 ve alt sıra Archaea klonları: 2-60, 1-1, 2-11, 1-27, 1-17, 2-9, 1-33, 1-4, 3-93, 3-86, 1-3, 2-8, 2-1, 2-36, 3-82, 3-96, 1-48, 2-47)



Şekil 3.15. Mbo I enzimi ile kesim sonrası %2'lik agaroz jelde yürütülmüş olan örnekler (M1: 50 bp marker ve M2: 1 kb marker) (Sırasıyla: 2-32, 1-95, 2-80, 3-35, 3-93, 3-5, 2-2, 1-74, 1-8, 1-92, 2-19, 2-96, 1-42, 2-27, 2-16, 1-28, 1-1, 3-90)



Şekil 3.16. %2'lik agaroz jelde *Hinf*I ve *Mbo*I ile kesim yapılmış aynı set örnekler (Sırasıyla *Hinf*I kesimleri: 2-33, 2-3, 3-87, 1-2, 1-37, 2-12, 2-95, 1-5, 1-6, M1: 1 kb Marker, M2: 50 bp Marker ve *Mbo*I kesimleri: 2-33, 2-3, 3-87, 1-2, 1-37, 2-12, 2-95, 1-5, 1-6)

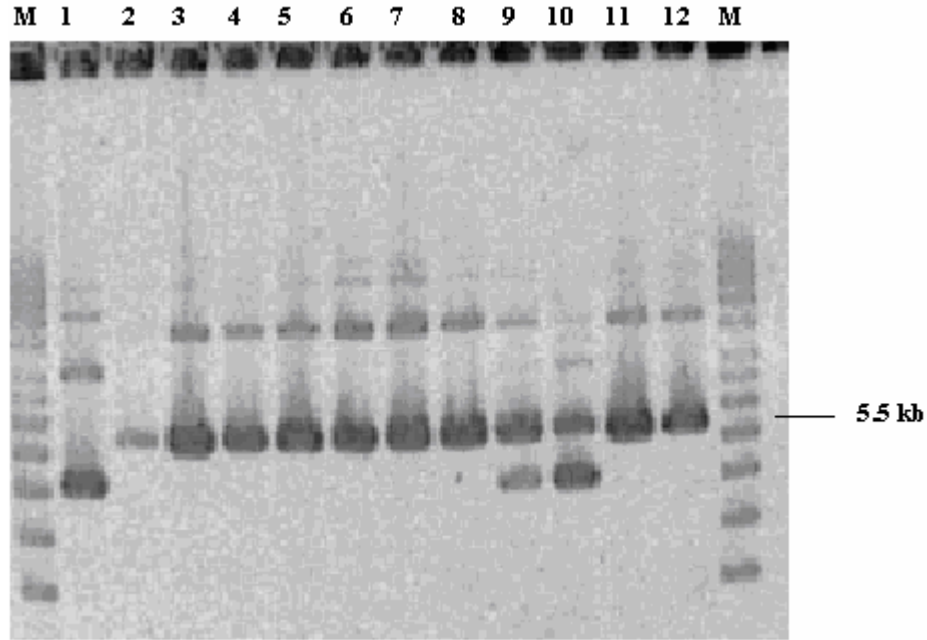
Öncelikle tüm klonların 16S rRNA ürünleri *Hinf*I enzimi ile kesilerek oluşan patternlere bakılmıştır. Daha sonra *Hinf*I kesim sonuçlarına göre benzer olanlar belirlenmiş ve yine tüm klonlar için *Mbo*I kesimleri gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra her bir klonun verdiği patternler tekrar benzerliklerine göre gruplandırılmıştır. Bu gruplandırmalardan sonra hangi klonlardan plazmid ekstraksiyonu ve bunu takiben dizi analizi yapılacağına karar verilmiştir.

ARDRA sonuçlarına göre Bacteria için hazırlanan gen kütüphanesinde 10 ve Archaea için hazırlanan kütüphanede 8 farklı patterne sahip klonlar olduğu belirlenmiştir. (Bu klonların gen bankasındaki karşılıkları ve benzerlik oranları Tablo 3.7. de gösterilmektedir.)

Rekombinant Plazmidlerin Klonlardan Ekstraksiyonu ve Purifikasyonu

ARDRA sonuçlarına göre gruplara ayrılmış olan klonların her biri için bir temsilci seçilmiş ve bunlardan plazmid izolasyonu ve bunu takiben dizi analizi yapılmasına karar verilmiştir.

Plazmid izolasyonu “Plazmid İzolasyon Kiti (Promega Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System)” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü amacıyla ekstraktlardan %1’lik agaroz jellere yükleme yapılmış ve uygun büyüklükte vektörün olup olmadığı marker yardımıyla belirlenmiştir.



Şekil 3.17. Plazmid izolasyonu işlemi sonrası (Bacteria klonlarının) %1’lik agaroz jeldeki görüntüleri (Sırasıyla: Marker (Supercoiled DNA Ladder), 1-17, 1-62, 3-12, 3-17, 3-45, 3-55, 3-75, 4-1, 4-35, 4-48, 4-62, 4-77, Marker (Supercoiled DNA Ladder))

Şekilde görüldüğü gibi normalde 4 kb büyüklükte olan vektör, uygun inserte sahip olduğu durumlarda 5.5 kb lik bantlar vermiştir. Bu jel fotoğrafına göre sadece ilk sıradaki örnek uygun büyüklükte plazmide sahip değildir ve diğerleri analiz için uygundur.

16S rRNA Genlerinin Dizi Analizleri

Uygun büyüklükte vektöre sahip olan klonlardan dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu dizi analiz sonuçları Blast programı ile değerlendirilerek her bir klonun gen bankasında benzerlik gösterdiği türler belirlenmiştir. Tablo 3.7. de Archaea ve Bacteria için yapılan dizi analizleri sonuçlarına göre bu klonların benzerlik gösterdiği türler gösterilmektedir.

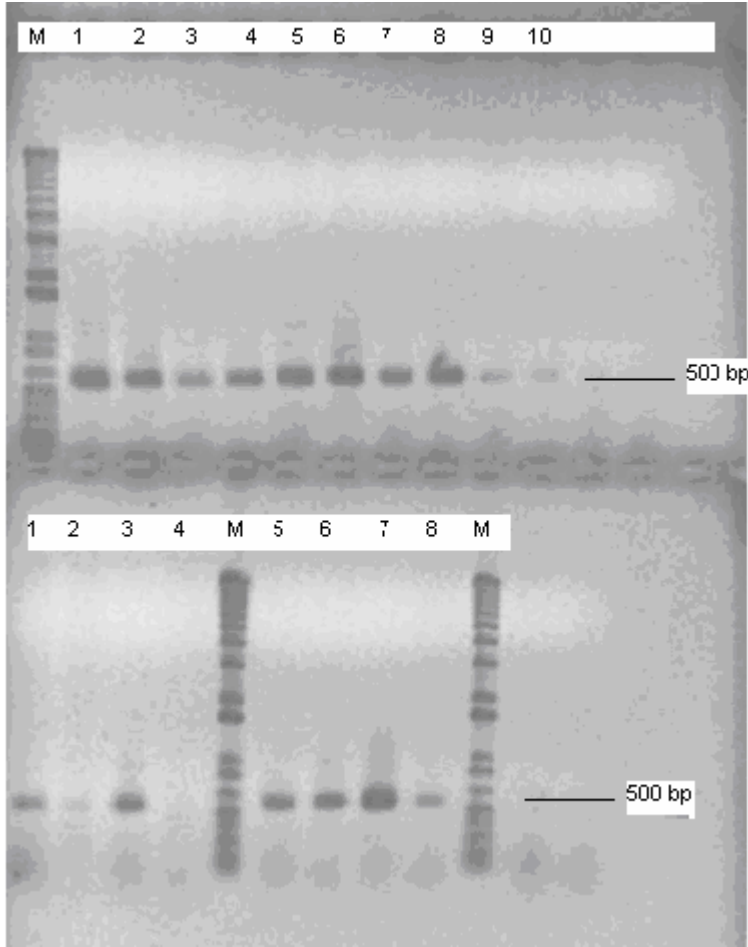
Dizi Analizi İçin Seçilen Klon	Dizi Analizi için seçilen primer	Dizinin Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	Gen Bankasındaki en yakın karşılığı
Bakteriyal klonlar				
4-62 B	907 R	587	547/562	97% U32593 <i>Halanaerobacter lacunarum</i>
3-45 B	907 R	582	485/521	93% AF323503 <i>Salinibacter ruber</i> strain POLA 13
4-48 B	907 R	567	541/567	95% AF323502 <i>Salinibacter ruber</i> strain POLA 18
4-1 B	907 R	565	288/324	88% AJ431253 <i>Cytophaga</i> sp. Dex80-37
3-75 B	907 R	579	558/579	96% U32593 <i>Halanaerobacter lacunarum</i>
3-55 B	907 R	568	535/568	94% AJ242996 Halophilic eubacterium EHB-4
4-35 B	907 R	592	573/582	98% AJ242998 Halophilic eubacterium EHB-2
3-12 B	907 R	590	569/574	99% AY847284 <i>Acinetobacter baumannii</i> strain Ab8
4-17 B	907 R	575	543/571	95% AF323502 <i>Salinibacter ruber</i> strain POLA 18
3-17 B	907 R	584	575/583	98% AJ242998 Halophilic eubacterium EHB-2
Archaeal klonlar				
1-13A	Primer A	448	304/312	97% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
1-13A	Primer B	403	282/287	98% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
1-13A	958R	462	417/425	98% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
1-39A	Primer A	350	220/242	90% AJ586107 <i>Halosimplex carlsbadanense</i>
1-39A	Primer B	442	311/338	92% AJ548827 <i>Halobacterium</i> sp.
1-39A	958 R	651	544/580	93% AJ586107 <i>Halosimplex carlsbadanense</i>
3-3A	Primer A	666	582/583	99% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
3-3A	Primer B	722	572/582	98% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
3-3A	958 R	562	558/565	98% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
3-7A	Primer A	486	287/312	91% AY055733 <i>Haloterrigena thermotolerans</i>
3-7A	Primer B	597	459/514	89% AF071880 <i>Halobacter utahensis</i>
3-9A	Primer A	401	227/231	96% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
3-9A	Primer B	489	407/412	98% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
3-9A	958 R	481	474/480	98% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
3-29A	Primer B	657	503/545	92% AJ586107 <i>Halosimplex carlsbadanense</i>
3-29A	958 R	668	577/633	91% AF071880 <i>Halobacter utahensis</i>
3-46A	Primer A	401	227/231	98% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
3-46A	Primer B	441	375/377	99% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
3-46A	958 R	510	465/476	97% AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
3-48A	Primer A	419	307/327	93% AB090169 <i>Halorubrum terrestre</i>
3-48A	Primer B	253	179/183	97% X82169 <i>H.sodomense</i>
3-48A	958 R	526	446/459	97% AM048786 <i>Halorubrum</i> sp.

Tablo 3.7. Archaea ve Bacteria klonlarının dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın gen bankası temsilcileri.

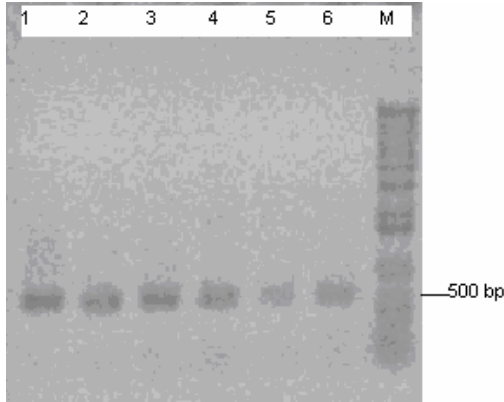
3.5.3. Denatüre Edici Gradient Jel Elektrofözezi (DGGE)

16S rRNA ve 18S rRNA Genlerinin DGGE Analizi için Amplifikasyonu

DGGE analizi için 16S ve 18S rRNA genlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen ürünler %1'lik jellerde gözlenmişlerdir. Şekil 3.18. de Archaea ve Eucarya için gerçekleştirilen PCR'ları takiben elde edilen jel görüntüleri verilmiştir.



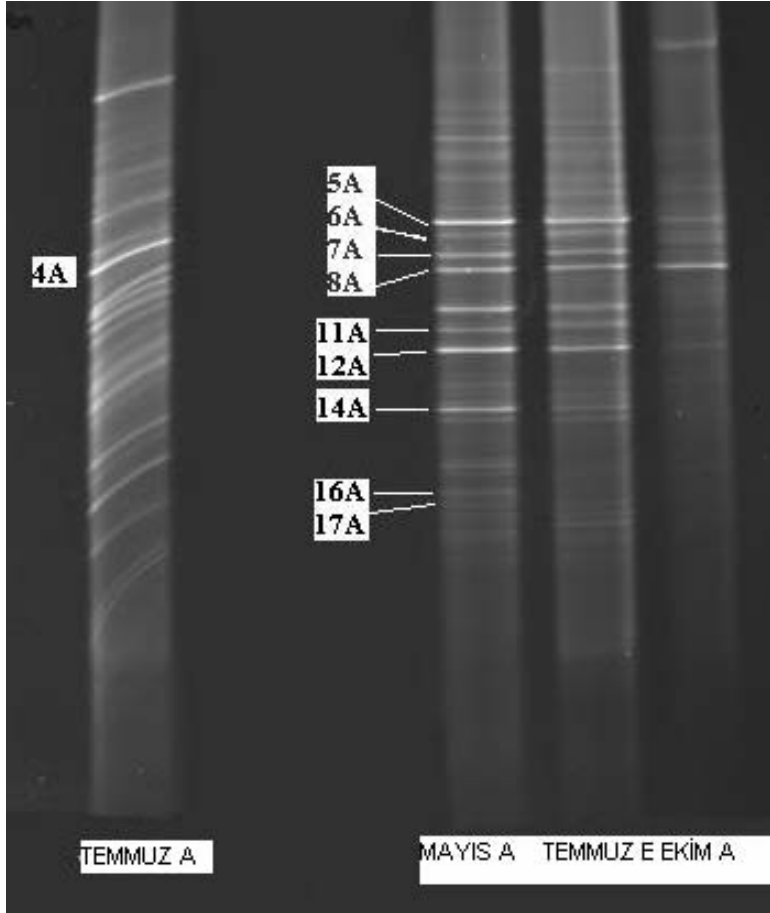
Şekil 3.18. Archaea ve Eucarya DGGE analizleri için yapılan PCR ları takiben elde edilen jel görüntüsü (Yaklaşık 500 bp lik ürünler) (Üst sırada: 1kb marker (M), Temmuz A Archaea (1, 2, 3, 4, 5), Temmuz A Eucarya (6, 7, 8, 9, 10) ve altta Mayıs A Archaea (1, 2), Mayıs A Eucarya (3, 4), Temmuz E Archaea (5, 6) ve Temmuz E Eucarya (7, 8) örnekleri bulunmaktadır)



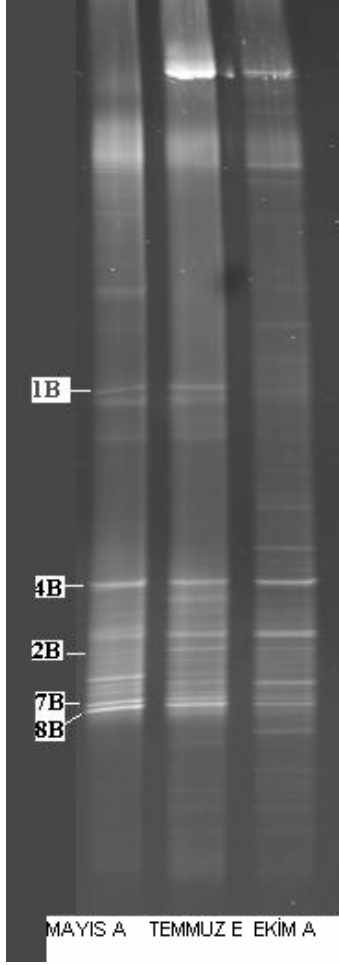
Şekil 3.19. Bacteria DGGE analizleri için yapılan PCR ları takiben elde edilen jel görüntüsü (Yaklaşık 500 bp lik ürünler) (Sırasıyla Mayıs A, Mayıs A, Temmuz A, Temmuz A, Temmuz E, Temmuz E örnekleri ve 1 kb Marker (M))

Archaea ve Bacteria Grubu 16S rRNA Ürünleri için Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi

Archaea ve Bacteria için yapılan Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi sonrası elde edilen jel fotoğrafları Şekil 3.20. ve 3.21. de verilmiştir.



Şekil 3.20. Tuz Gölü Mayıs, Temmuz (A ve E) ve Ekim 2005 aylarına ait örneklerinden Archaea için yapılan DGGE analizi ve reamplifikasyon için seçilen bantlar (4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 11A, 12A, 14A, 16A, 17A)



Şekil 3.21. Tuz Gölü Mayıs, Temmuz (A ve E) ve Ekim 2005 aylarına ait örneklerinden Bacteria için yapılan DGGE analizi ve reamplifikasyon için seçilen bantlar (1B, 2B, 4B, 7B ve 8B).

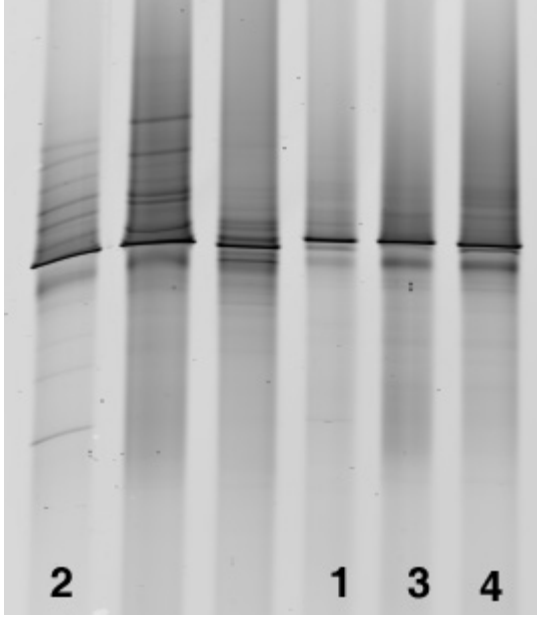
Bu jellerde farklı grupları temsil ettiği düşünülen ve Şekil 3.20. ve 3.21. de belirtilmiş olan bandlar jelden kesilmiş ve bunlar için tekrar PCR kurulmuştur. Buradan elde edilen amplifikasyon ürünlerinin dizi analizleri sonrasında her band için gen bankasından benzerlik gösterdiği türler tespit edilmiştir. Bu her bandın gen bankasındaki karşılıkları ve benzerlik oranları Tablo 3.8. de verilmiştir.

DGGE bandları	Dizi Analizi için kullanılan primer	Eşleşen baz sayısı	% Benzerlik	Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı
<u>Archaea</u>				
3A	907 R	124/142	87%	AF322392 <i>Archaeoglobus profundus</i>
4A	907 R	494/499	98%	AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
5A	907 R	139/162	85%	X82170 <i>Halorubrum lacusprofundi</i>
6A	907 R	124/142	87%	AF322392 <i>Archaeoglobus profundus</i>
7A	907 R	392/401	97%	AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
8A	907 R	487/487	100%	AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
11A	907 R	383/434	88%	DQ355793 <i>Halorubrum</i> sp. AJ201
12A	907 R	399/442	90%	U17364 <i>Halobacterium saccharovororum</i>
14A	907 R	407/441	92%	AY676200 <i>Haloquadra walsbyi</i>
16A	907 R	466/472	98%	AM234786 <i>Halorubrum orientalis</i>
17A	907 R	461/466	98%	AM234786 <i>Halorubrum orientalis</i>
<u>Bacteria</u>				
1B	907 R	285/324	87%	AJ431253 <i>Cytophaga</i> sp.
2B	907 R	398/407	97%	AF323503 <i>Salinibacter ruber</i>
4B	907 R	449/477	94%	AF323502 <i>Salinibacter ruber</i>
7B	907 R	407/413	98%	AJ242998 <i>Halophilic eubacterium</i> EHB-2
8B	907 R	317/328	96%	AJ242998. <i>Halophilic eubacterium</i> EHB-2

Tablo 3.8.. Elde edilen DGGE bandları ve bunların gen bankasındaki en yakın karşılıkları

Eukarya Grubu 18S rRNA Ürünleri için Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi

Eukarya için yapılan Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi sonrası elde edilen jel fotoğrafı Şekil 3.22. de verilmiştir.

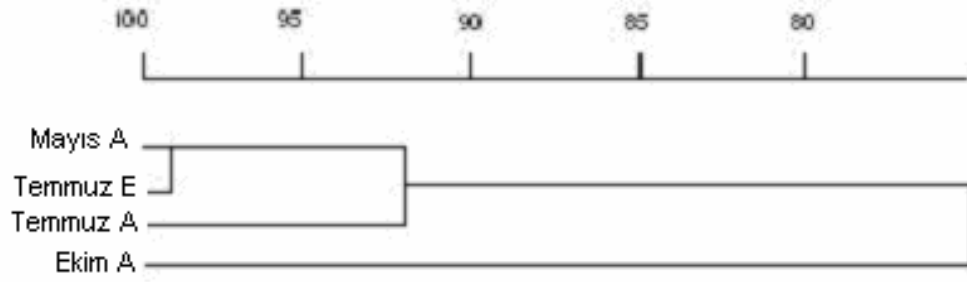


Şekil 3.22. Tuz Gölü Mayıs (1), Temmuz (A (2) ve E (3)) ve Ekim (4) 2005 aylarına ait örneklerinden Eukarya için yapılan DGGE analizi

DGGE Jellerinden Benzerlik Dendogramlarının Oluşturulması

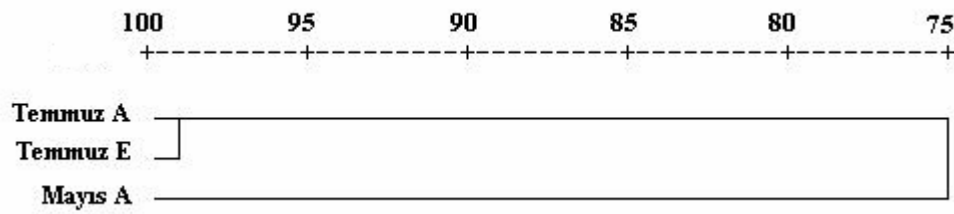
DGGE sonrası her örnek bir pattern oluşturmaktadır. Bu patternlerin kendi aralarında karşılaştırılması için bir matriks oluşturulmuştur. Oluşturulan bu matriks kullanılarak SPSS 10 istatistik programında jeldeki her örneğin birbirine göre benzerliğini yansıtan dendogramlar oluşturulmuştur. Bu dendogramlar Archaea, Bacteria ve Eukarya jellerinin her biri için ayrı ayrı oluşturulmuştur.

Şekil 3.23. de Archaea jelinden, 3.24. de Bacteria jelinden ve 3.25. de Eukarya jelinden türetilen benzerlik dendogramları verilmiştir.



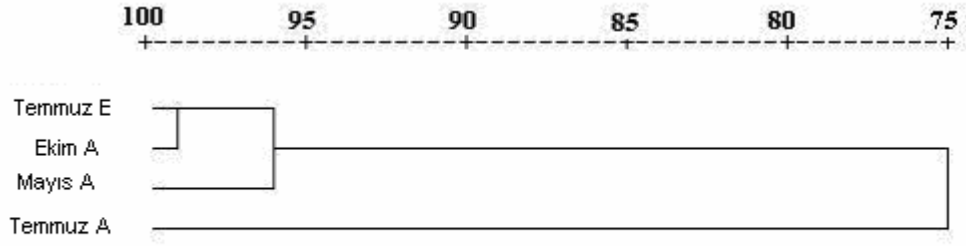
Şekil 3.23. Archaea jelinden üretilmiş olan benzerlik dendogramı

Yukarıdaki dendogramdan da anlaşıldığı gibi DGGE Archaea jelinde gözlenen profiller Mayıs, Temmuz ve Ekim ayları arasında oldukça benzerdir.



Şekil 3.24. Bacteria jelinden üretilmiş olan benzerlik dendogramı

Bacteria jelinde elde edilen profiller de genel olarak oldukça benzerdir. Sadece Mayıs A örneği diğerlerine %75 oranında benzerlik göstermesine rağmen göreceli olarak daha farklı olduğu söylenebilir. Temmuz A ve Temmuz E örnekleri ise %95'in üzerinde benzerliğe sahiptir.



Şekil 3.25. Eukarya jelinden üretilmiş olan benzerlik dendogramı

Bacteria jelinden elde edilen sonuca paralel olarak Eukarya jelinden elde edilen dendogram da da Temmuz A örneğinin diğerlerine %75 oranında benzediği görülmektedir. Temmuz E, Ekim A ve Mayıs A örnekleri ise %95'in üzerinde benzerliği paylaşmaktadırlar.

3.5.4. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH)

Tuz Gölünden Mayıs, Temmuz ve Ekim 2005 aylarında alınmış örnekler ile yapılan DAPI boyama ile toplam hücre sayımları, Eub 338 probu ile hibridizasyondan sonra Bacteria, Arc915 probu ile hibridizasyondan sonra Archaea ve EHB probu ile hibridizasyon sonrası *Salinibacter* sayıları tesbit edilmiştir. Tablo 3.9. da örneklerdeki toplam hücre, Bacteria, Archaea ve *Salinibacter* sayıları (hücre/ml) verilmiştir.

Örnek	Tuzluluk (%)	Toplam DAPI sayımı/ml $\pm$ SS ^a	Eub338 (%)	Arc915 (%)	EHBS586 EHB1451 (%)	Tespit edilenlerin sayım %si
1 (Mayıs A)	24	1.19x10 ⁷ $\pm$ 0.18	31.9%	52.9%	3.9%	84.8%
2 (Temmuz A)	36	1.38x10 ⁷ $\pm$ 0.08	21.7%	57.9%	2.31%	79.6%
3 (Temmuz E)	36	1.48x10 ⁷ $\pm$ 0.08	21%	59.2%	2.45%	80.2%
4 (Ekim A)	30	2.6x10 ⁷ $\pm$ 0.25	ND ^b	61.5%	ND	61.5%

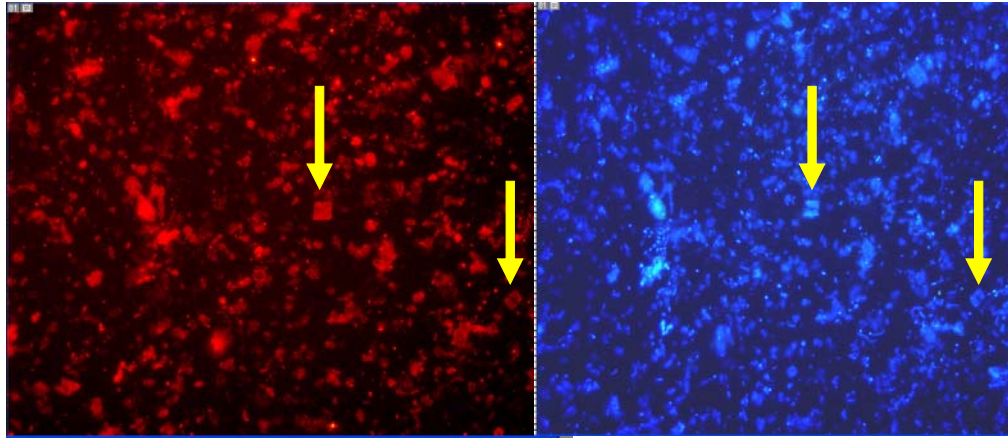
a: Standart sapma

b: Belirlenemedi

c: Archaea+Bacteria

Tablo 3.9. FISH yöntemi ile Tuz Gölü örneklerindeki Bacteria, Archaea, *Salinibacter* ve toplam hücre sayıları.

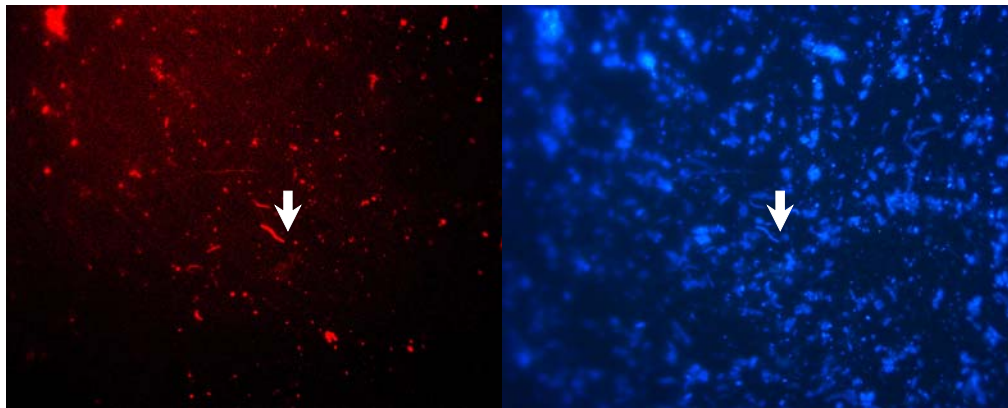
Hibridizasyon sonrası floresan mikroskop ile yapılan gözlemlerde Mayıs, Temmuz ve Ekim aylarına ait örneklerde Archaea'ların oldukça baskın olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ekim ayı örneğinde Eub338 probu ile hibridizasyon negatif sonuç vermiştir. Yani bu örnekte Bacteria sinyali alınamamıştır. Mayıs ve Temmuz aylarına ait örneklerde de *Salinibacter* problemleri ile sinyal alınmış ve bunlar fotoğraflanmıştır. Aşağıda Eub 338 (Bacteria) (Şekil 3.27. ve 3.28.), Arc915 (Archaea) (Şekil 3.26) ve EHB (Salinibacter) (Şekil 3.29. ve 3.30) problemleri ile hibridizasyon sonrası tespit edilen hücrelerin fotoğrafları verilmiştir.



Arc915 (Mayıs A)

DAPI (Mayıs A)

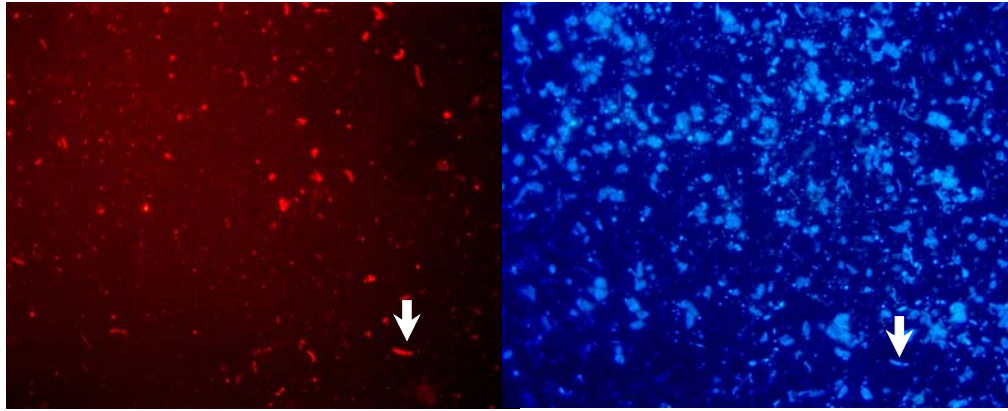
Şekil 3.26. Arc915 probu ile hibridizasyon sonrası ışıma veren Archaea hücreleri (Ok ile işaretlenmiş olan da kare şekilli Archaea (Haloquadra)) ve sağda da aynı görüntü alanının DAPI boyaması (Mayıs Ayı örneğinde)



Eub338 (Mayıs A)

DAPI (Mayıs A)

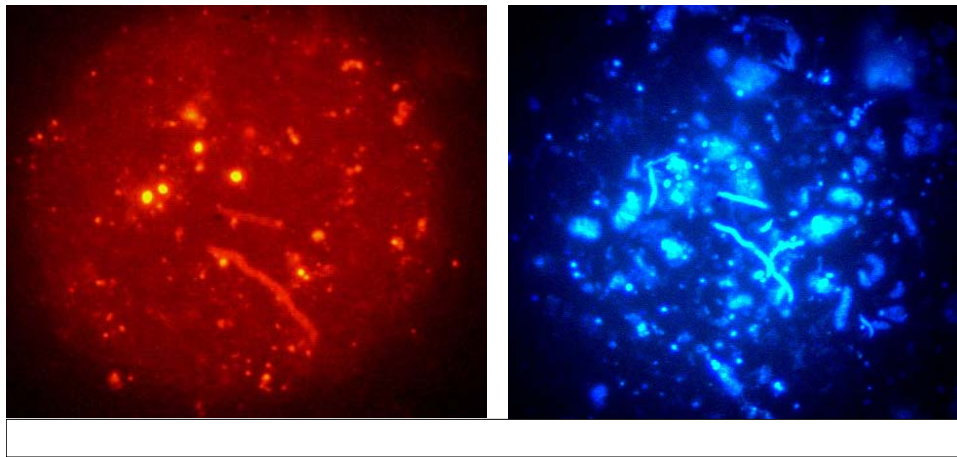
Şekil 3.27. Eub 338 probu ile hibridizasyon sonrası ışıma veren Bacteria hücreleri (Ok ile işaretlenmiş olan çubuk şekilli Bacteria) ve sağda da aynı görüntü alanının DAPI boyaması (Mayıs Ayı örneğinde)



Eub338 (Temmuz A)

DAPI (Temmuz A)

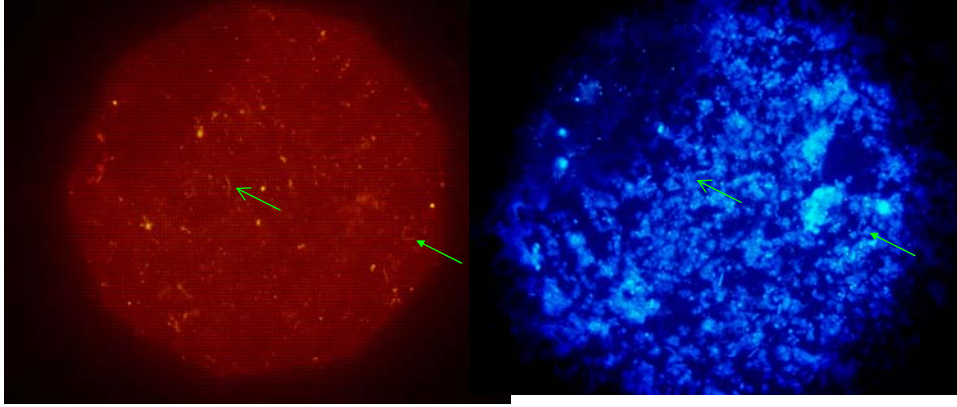
Şekil 3.28. Eub 338 probu ile hibridizasyon sonrası ışıma veren *Bacteria* hücreleri (Ok ile işaretlenmiş olan çubuk şekilli *Bacteria*) ve sağda da aynı görüntü alanının DAPI boyaması (Temmuz Ayı örneğinde)



EHB 1451 (Mayıs A)

DAPI (Mayıs A)

Şekil 3.29. EHB 1451 probu ile hibridizasyon sonrası ışıma veren *Salinibacter* hücreleri (Çubuk şekilli *Salinibacter*) ve sağda da aynı görüntü alanının DAPI boyaması (Mayıs Ayı örneğinde)



EHB 1451 (Temmuz A)

DAPI (Temmuz A)

Şekil 3.30. EHB 1451 probu ile hibridizasyon sonrası ışıma veren *Salinibacter* hücreleri (Ok ile işaretlenmiş olan çubuk şekilli *Salinibacter*) ve sağda da aynı görüntü alanının DAPI boyaması (Temmuz Ayı örneğinde)

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Aşırı derecede halofilik bakteriler, ekstrem koşullara uyum göstermiş özel yapıları nedeniyle biyoteknoloji alanında çalışan bir çok araştırmacının ilgisini çeken organizmalardır. Aşırı tuzluluğa dayanıklı enzimleri, tuzluluğa karşı koyabilmek için kullandıkları stratejiler, zor şartlarda enerji üretimine olanak sağlayan özel proteinlerinin varlığı ve bunlar gibi kendilerine has olan özellikleri, onların biyoteknoloji alanında son derece değerli araçlar olarak görülmelerine yol açmaktadır. Bu nedenle aşırı derecede halofilik bakterilerin tanımlanması ve hücre yapılarının detaylı bir şekilde ortaya konması gerekmektedir. Dünyada çok az benzeri olup, hipersalin (aşırı derecede tuzlu) çevreler sınıfına giren ve ülkemizin en büyük ikinci gölü olan Tuz Gölü'nün mikrobiyolojik olarak incelenerek sahip olduğu halofilik mikroorganizmaların tanımlanarak ortaya konması hem bu nedenle, hem de ülkemiz halofilik prokaryot florasının belirlenmesi açısından çok önemlidir.

Tuz Gölü'nde bulunan mikroorganizmalar ve bunların farklı yöntemler ile karakterizasyonları üzerine daha önceden yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Yalçın 2000; Kallı 2000; Birbir ve Sesal 2003; Özcan 2004). Yalçın (2000) çalışmasında Tuz Gölü'nden izole ettiği 12 adet aerobik halotolerant ve halofilik izolat ile çalışmış ve izolatlarından bazılarını *Bacillus circulans* ve *Bacillus licheniformis* olarak rapor etmiştir.

Kallı (2000) yaptığı çalışmada Tuz Gölünden izole ettiği 18 adet aşırı halofilik bakterinin çeşitli biyokimyasal ve antibiyotiklere duyarlılık testlerini gerçekleştirmiş ve sonuç olarak bu izolatların *Halobacterium* cinsine ait Archaea olabileceklerini bildirmiştir.

Birbir ve Sesal (2003) yaptıkları çalışmada Tuz Gölü'nden izole ettikleri 82 izolattan 32 adetini detaylı olarak incelemeye almışlar ve bunların optimum gelişim gösterdikleri tuz, pH ve sıcaklık derecelerini rapor etmişlerdir. Ayrıca bu izolatların çeşitli biyokimyasal testlerini yapmışlar ve sonuç olarak Tuz Gölü'nün aşırı derecede halofilik bakteriler açısından uygun bir ortam olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda izole edilen strainler için gerçekleştirilen gelişme için gerekli optimum tuz konsantrasyonu, pH ve sıcaklık testlerinin

sonuçları Birbir ve Sesal (2003)'in çalışmasında elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

NaCl'nin doyma noktasında olduğu çevreler sıklıkla yoğun mikrobiyal komünitelerle ev sahipliği yapar. Predasyon olmayışı ve genellikle yüksek besin düzeyleri sonucunda hücre yoğunluklarının mililitrede 10^7 - 10^8 hücre ve daha fazla olması alışılmadık bir durum değildir (Oren 2002). Bizim çalışmamızda da su örneklerinde yapılan DAPI boyamaları ile Tuz Gölü su örneklerinde mililitrede 10^7 hücre bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak çalışmamız sonuçlarına göre canlı bakteri sayısının mevsime göre 10^3 ila 10^5 hücre/ml arasında değişmektedir ki bu sonuç da Birbir ve Sesal (2003)'e paralellik göstermektedir.

Antibiyotiklere duyarlılık testleri de halofilik bakterilerin ayırımında kullanılmış olan yöntemlerdendir (Oren 2002). Aşırı derecede halofilik Archaea üyelerinin hepsi Penisilin G'ye direnç göstermektedir ve bu da Archaea/Bacteria ayırımında kullanılabilecek basit ve ucuz bir yöntem olarak görünmektedir. Bizim çalışmamızda da PCR ile 23 adet Archaea ve 2 adet Bacteria olarak ayırımı yaptığımız izolatlardan Archaea olarak bulunan izolatların aynı zamanda penisiline dirençli olduğu görülmüştür. Bu nedenle doğrulama testi olarak kullanılabilir. Birbir (2003) ise çalışmasında Tuz Gölü izolatlarının hepsinin penisiline dirençli olduğunu bildirmiştir.

Halobacteriaceae familyası üyelerinin ayırımında en önemli karakterlerden biri membranlarındaki polar lipidlerin doğası ve özellikle mevcut glikolipidlerin tipleridir. Polar lipid analizleri bu nedenle halofilik organizmaların karakterizasyonunda özellikle de tuzlalarındaki komünite analizlerinde kullanılmış olan bir yöntemdir. İzolatların farklı polar lipidlerine sahip olup olamamaları genus düzeyinde ayırımı sağlayabilmektedir (Oren 1994; Litcfield ve ark. 2000; Oren 2001). Ancak bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar genus düzeyinde ayırımı sağlamak için yeterli olmamıştır. Çünkü polar lipid analizlerimizde ince tabaka kromatografisi sonrası elde ettiğimiz spotlar tüm halofilik Archaea genuslarında bulunan fosfotidilgliserol (PG) ve fosdotidilgliserolmetilsülfat (PGP-Me)'e aittir.

Bakteriyal lipid kompozisyonu ve taksonomik sınıflandırma arasındaki korelasyon bakteriyal identifikasyon amacıyla geniş bir ölçüde kullanılmaktadır. Yağ asidi profillerine dayanan bakteriyal sınıflandırmalar nükleik asid homolojisine dayalı sınıflandırmalarla iyi karşılaştırılmış durumdadır. Lipid analizleri metodolojisindeki gelişmeler birçok bakteri için bu korelasyonu sağlamıştır. Lipid ekstraktlarının gaz kromatografisi, hücresel yağ asitlerinin belirlenmesi için yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu metod bakteriyal lipidlerin hidrolizasyonu ve ekstraksiyonuna dayanır. Karboksilik grupların metilasyonu yağ asitlerinin metil esterlerini (FAME) üretir ve bunlar gaz kromatografi (GC) ile analiz edilirler. Tüm örnek hazırlama zamanı yaklaşık 60-70 dakikadır ve FAME ekstraktlarının kromatografik analizi bir örnek için yaklaşık 20 dakika sürmektedir (Basile ve ark. 1995). FAME analizleri halofilik bakteriler için de uygulanmıştır. Vreeland ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, çok eski bir tuz kristalinden izole edilen bir “Permian” bakteri ile bu izolatin modern akrabaları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yağ asit profillerine göre bu organizmaları karşılaştırdıklarında bu yaklaşımın tür düzeyinde ayırım yapmadığı ancak test edilen Bacteria üyeleri arasında farklılıkları ortaya koyabildiği sonucuna varmışlardır (Vreeland ve ark. 2006).

Proteinler prokaryot, eukaryot ve viruslerde yapı ve fonksiyon bakımından oldukça farklılıklar gösterirler. Proteinlerin çeşitliliği ve sayısı bazı bakterilerde 2000’e kadar çıkmaktadır ki bu durum tiplendirme ve identifikasyon çalışmalarında kullanılabilecek bir bilgi sağlamaktadır. Bu yaklaşım organizmaların protein ya da polipeptid profillerine dayanarak tür seviyesinde hatta alttür düzeyinde identifikasyonlarında kullanılabilmektedir (Towner ve Cockayne 1993). Poliakrilamid jel elektroforezleri moleküler düzeyde proteinlerin analizi için oldukça güçlü bir yöntemdir. SDS-PAGE de halofilik izolatları da içeren çok sayıda bakteriyal strainin sistematğinde kullanılmış olan bir tekniktir (Stan-Lotter et al. 1989; Hesselberg ve Vreeland 1995; Stan-Lotter ve ark. 1999).

Stan-Lotter ve arkadaşları (1989), aşırı derecede halofilik *Halobacterium saccharovarum* proteinlerinin isoelektrik fokuslaması ve elektroforezi için uygun şartları araştırmışlar ve 15 ila 200 Kda arasında geniş aralıklı proteinleri elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da elde edilen protein

aralığına bakıldığında 120 ile 10 kDa aralığında bantlardan oluşan patternlerin elde edildiği görülmektedir.

Denner ve arkadaşları (1994) yaptıkları çalışmada kaya tuzlarından elde ettikleri izolatın SDS-PAGE profilinin, analiz ettikleri hiçbir halofilik tipe benzemediğini ve kendine has profile sahip bu izolatın yeni bir tür olarak (*Halococcus salifodinae*) önermişlerdir.

Stan-Lotter ve arkadaşları (1999) iki farklı bölgeden izole ettikleri *Halococcus salifodinae* strainleri arasında çok benzer protein patternlerinin olduğunu rapor etmişlerdir.

Özcan (2004) çalışmasında Tuz Gölü ve başka tuzlu ortamlardan elde ettiği izolatların SDS-PAGE ve plazmid izolasyonu analizlerini gerçekleştirmiştir.

Bizim çalışmamızda Tuz Gölü’nden izole edilen 22 adet izolatın birbirlerine benzerliklerini gösteren dendogramına bakıldığında, SDS-PAGE yönteminin halofilik izolatların gruplandırmasında bir ön ayrımı yapabilecek güçte olduğu düşünülmektedir. Ancak referans halofilleri de içine alan benzerlik dendogramına bakıldığında *H. saccharolyticus* ve *H. dombrowski* arasında %90’ın üzerinde yüksek bir benzerlik olmasına rağmen aynı genus üyesi *H. morrhuae*’nin bunlara benzerliği yalnızca %70’dir. *Halococcus* genusu üyelerinin diğer halofillere oranla nispeten hücre lizisine dirençli olmaları bu sonucun bir sebebi olabilir. Çünkü diğer halofiller için uygulanan lize etme yöntemi sonrası *Halococcus* hücreleri büyük oranda sağlam kalmaktadırlar. Bunlara ek olarak yine aynı dendograma göre izolat 17 ve 19 ise *Halococcus* genusu örneklerine %80’in üzerinde benzerlik göstermiştir. Ancak bu iki izolatın morfolojisine bakıldığında bunların “kok” şekilli hücrelere sahip olmadıkları görülmektedir. Yine aynı dendograma göre *H. volcanii*’nin iki farklı straini aynı jelde %85 civarında benzerliği paylaşmışlardır ki bu da yöntemin optimizasyonunun gerekli olduğunun bir göstergesi olabilir. Çünkü örneklerin SDS-PAGE analizine hazırlanma sürecinde besiyeri içeriği, inkübasyon şartları vb. gibi birçok etken sonucu etkileyebilme potansiyelini taşımaktadır. Dolayısıyla SDS-PAGE yönteminin halofiller için “ayırt edici” olarak nitelendirilebilmesi için optimize edilmiş şartlar ve tekrarlanabilir sonuçların eldesi gerekmektedir.

Çok havuzlu solar tuzlalar deniz suyu tuzluluğundan “halit” doygunluğuna kadar tuzluluğun farklı görüntülerini sunarlar. Her bir havuzdaki tuz konsantrasyonu göreceli olarak sabit tutulur ve mikrobiyal kcommunity yoğunlukları genellikle yüksektir. Tüm dünyadaki tuzlalar yapay ve birbirlerine benzer olmalarına rağmen, besin durumları, suyun geri çekilme zamanları ve iklim koşullarına bağlı olarak farklılık gösterirler. NaCl’nin doyduğu ve halitin biriktiği kristalize havuzlarından halofilik Archaea’nın birçok türü izole edilmiştir. İzolatlar *Haloferax mediterranei*, *Haloferax gibbonsi*, *Haloferax denitrificans*, *Halogeometricum borinquense*, *Halococ saccharolyticus*, *Haloterrigena thermotolerans*, *Halorubrum saccharovorum*, *Halorubrum coriense*, *Haloarcula hispanica* ve *Haloarcula japonica*’nın tip strainlerini içerirler. İsrail Eilat ve Amerika Birleşik Devletleri Newark’taki kristalize havuzlarından alınan tuzlu su örneklerinden, L-arjinin varlığında anaerobik zenginleştirme ortamlarında *Halobacterium salinarium* geliştirilebilmiştir. İspanya Alicante yakınlarındaki tuzla havuzlarında *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Haloferax* ve *Halobacterium* yüksek sıklıkta elde edilmiştir. Elde edilen koloni sayısı toplam prokaryotik varlığın yalnızca çok küçük bir kısmıdır (Oren 2002c).

Çalışmamızda elde edilen koloni sayıları 10^3 - 10^5 hücre/ml varlığını göstermiştir. Oysa DAPI boyamaları mililitrede 10^7 ’lik hücre varlığını ortaya koymuştur.

Tuz Gölü ile ilgili daha önceki çalışmaların hiçbirinde izolatların 16S dizi analizleri yer almamıştır. Bu çalışmada ise elde ettiğimiz izolatlardan koloni morfolojisi olarak farklılık gösterenler seçilerek bunların 16S rRNA PCR ürünleri dizi analizine tabi tutulmuştur. Bu analizler sonrası izolatların çoğunun Archaea grubuna ait oldukları belirlenmiştir. Bunlar yukarıda belirtilen diğer çalışmalarda ve başka hipersalin çevrelerden izolasyonu yapılan Archaea üyeleridir. *Haloferax mediterranei*, *Haloferax alexandrinus*, *Haloarcula hispanica*, *Haloarcula argentinensis*, *Haloarcula marismortui*, *Halorubrum xinjiangense* ve *Halomicrobium mukohatei* olarak tanımlanmış olan Archaea izolatlarının dışında çalışmamızda Bacteria grubu üyesi olarak da *Chromohalobacter marismortui* varlığı ilk defa olarak ortaya konmuştur.

Hipersalin sistemlerdeki fizyolojik/metabolik çeşitlilik çalışmaları lipid analizleri, radyoaktif işaretli solunum/birleşme deneyleri, BIOLOG sistem ve en son olarak da stabil izotop çalışmaları ile yapılmaktadır (Litchfield 2004).

Lipid analizi uygulamalarının toplam kommünite kompozisyonunun belirlenmesi için kullanımı David White ve arkadaşları öncülüğünde başlamıştır. 1977’de King ve arkadaşları, meşe ağacı yaprakları, tatlı sakız yaprakları ve çam iğneleri mikrobiotaları arasındaki farklılıkların fosfolipid sentez oranları ve farklı sınıftaki mikrobiyal lipidlerin kullanılarak tespit edilebileceğini rapor etmişlerdir. Bu daha sonra yağ asitlerini de içine alacak şekilde genişlemiştir. Yaklaşımları toprak, sedimentler, deniz suyu ve yer altı suyunun mikrobiyal kompozisyonu ve ekolojisinin değerlendirilmesi için geniş ölçüde adapte edilmiştir (Ventosa 2004).

Lipid analizleri böylece tuzlu çevrelerdeki mikrobiyal çeşitliliğin ölçümü için ilk araçlardan biri haline gelmiştir. Bu hiç şüphesiz halofilik Archaea üyelerinin Bacteria üyelerinden ayrımını sağlayan diftanil eter lipidlerine sahip olmaları sebebiyledir. Yağ asidi analizleri ve polar lipid analizleri ile mevcut farklı taksonomik gruplardaki mikroorganizmaların varlığı üzerine tahmin yapılabilir. Bununla beraber, günümüze kadar, tuzlalardaki ya da diğer hipersalin çevrelerdeki lipid patternlerinin tam analizi gerçekleştirilmemiştir (Ventosa 2004).

Araştırmacıların çoğu bu çevrelerdeki Archaea/Bacteria varlığının polar lipid fraksiyonlarındaki farklılıklara göre ortaya konması üzerine odaklanmışlardır. Son olarak Oren, Archaea’da en azından 12 farklı glikolipidin bulunduğunu bildirmiştir. Glikolipidler şeker kısımlarının tipleri, sülfatın bulunup bulunmayışı ve sayılarına göre farklılık göstermektedirler. Glikolipidlere ek olarak fosfotidil gliserolsülfat, fosfotidil gliserofosfat ve fosfotidil gliserofosfatın metil esterleri gibi fosfolipidler halofilik Archaea’da yaygın olarak bildirilmiştir. Bacteria’da bulunan en yaygın fosfolipidler fosfotidil etanolamin, fosfotidilkolin, fosfotidikasit ve fosfotidilgliserofosfattır (Ventosa 2004).

Tuzlu sulardaki mikrobiyal kommünite yapısının lipid analizi uygulamalarına ilişkin ilk çalışma Volkman ve arkadaşları (1988) tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacılar hafif tuzluluktaki Antartika Ace Gölü’nün farklı derinliklerindeki tam lipid profillerini bildirmişlerdir. Derinliğe bağlı olarak bu profillerin değiştiğini belirtmişlerdir. Verilerini copepod *Pyramimonas antarctica*

ve *Chlorobium* sp. dışında spesifik cinslerle ilişkilendirmemişlerdir. Fakat Ace Gölü'nde Archaea varlığını fosfolipid türevli eter lipidlerine dayandırarak rapor etmişlerdir (Ventosa 2004).

Hipersalin sulardaki mikrobiyal kommünitenin spesifik üyelerinin belirlenmesi için lipid analizlerine dayanan başka birkaç çalışma daha vardır. Franzmann (1991) Antartika Deep Gölü sedimentlerinden elde edilen diftanil eter lipidlerinin, şimdi *Halorubrum lacusprofundi* olarak isimlendirilmiş olan, *Halobacterium lacusprofundi* lipid parmak izleri ile eşleştiğini rapor etmiştir (Ventosa 2004).

1995 yılında Oren ve Gurevich, 1992-1993'deki alg patlaması (bloom) sonrası Ölü Deniz'in lipid kompozisyonunu rapor etmişlerdir. Analizlerinden dominant mikroorganizmanın *Haloferax*'in henüz kültür edilmemiş bir straini olduğu yargısına varmışlardır (Litchfield 2004). Oren (1994) aynı teknikleri İsrail Eilat'taki kristalize havuzlarında uygulamıştır. Buradaki lipid patternlerinin çok basit ve yaygın petri izolatu olan *Halobacterium* ile benzer olmadığı bulunmuştur.

Daha yakın zamanda, Litchfield ve arkadaşları toplam kommünite lipid profillerini kullanarak mikrobiyal kommünite dinamiklerini çalışmışlardır. Karşılaştırmalar hem hem Eilat, İsrail hem de Newark, Kaliforniya'daki çok havuzlu tuzalarda belirli bölgelerde yapılmıştır. Lipid patternlerinin iki nokta arasında önemli derecede farklılık gösterdiği bulunmuştur (Litchfield ve ark. 2000; Litchfield ve Oren 2001). Bu çalışmalarda Newark tuzasında bazı bakteriyal lipidlerin yaygın olduğu fakat hiçbirinin Eilat tuzasında aynı anda yaygın olarak bulunmadığı görüşmüştür. Genel olarak, Kaliforniya bölgesinde toplam lipid patternleri daha komplekstir. Buna ek olarak, özellikle Kaliforniya tuzasında olmak üzere beklenmedik mevsimsel değişimlere sahiptirler. Son olarak, kristalize edici havuzlarda bazı benzerlikler olduğu fakat yine Kaliforniya bölgesinin daha kompleks yapıda olduğu ve identifiye edilmemiş sülfatlanmış diglikozildifitanil eter lipidlerini içerdiği bildirilmiştir (Litchfield ve ark. 2000). Bu arada, Eilat tuzası ile İspanya Santa Pola'nın önemli derecede benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Litchfield ve Oren 2001).

Radyoaktif substratlar da büyüme oranının ya da spesifik bileşiklerin çevriminin ölçümü için (genellikle ^{14}C etiketli aminoasitler ya da karbonhidratlar

ve ^3H etiketli timidin) kullanılmaktadırlar. Bu bileşiklere dayanarak farklı tuzlulukta ve farklı zamanlardaki kommünite aktivite düzeyleri karşılaştırılabilir. Oren (1991) Eilat, İsrail tuzlarında aminoasit kullanımının %20'lik tuz konsantrasyonunda en yüksek düzeyde olduğunu bildirmiştir. Bu optimum ^{14}C etiketli protein hidrolizatı kullanıldığında Bacteria ya da Archaea için spesifik antibiyotiklerden ya da farklı safra tuzlarının eklenmesi ile değiştirilebilir (Ventosa 2004).

%0.005 sodyum taurokolat eklenmesi %20'den az tuzluluk düzeylerinde aminoasit alımını %10-50 inhibe etmektedir. %26.7 tuzlulukta ise yalnızca %9 aktivite kalmaktadır. Daha yüksek tuzlulukta tüm alımlar inhibe edilmektedir. Böylelikle safra tuzları ve/veya antibiyotiklerin kullanımı toplam kommünitenin metabolik aktivitesine her bir domainin katkısının belirlenmesine izin verir (Ventosa 2004).

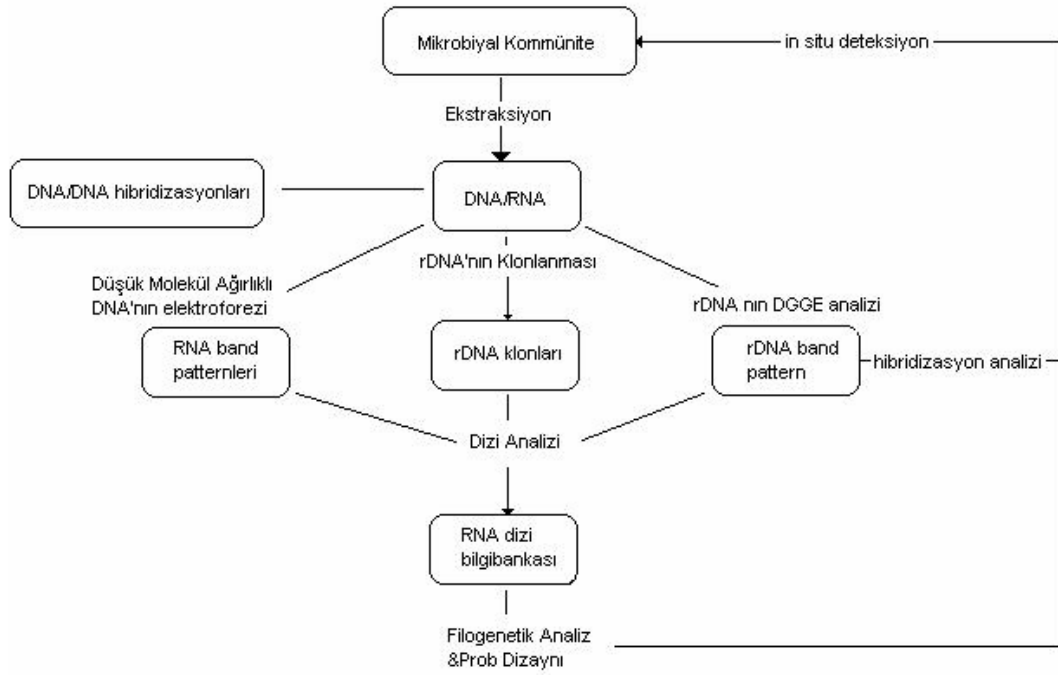
Spesifik karbon kaynaklarının kullanımı Fendrich ve Schink (1988) tarafından da araştırılmış ve Büyük Tuz Gölü'nde (Great Salt Lake) aerobik bakterilerce glukoz, gliserol ve asetatın kullanıldığı rapor edilmiştir. Bu bileşiklerin metabolizması gölün daha tuzlu olan Kuzey yakasında daha yavaştır (Ventosa 2004).

Yukarıda da bahsedildiği gibi tuzla kommünitelerinin metabolik kapasiteleri geleneksel olarak radyoaktif etiketli bileşiklerin kullanımı ya da polifazik taksonominin bir parçası olarak saf kültürler üzerinde değerlendirilmektedir. İzolatları doğru genuslar içine yerleştirmeye yardımcı olurken, metabolize edilen substratlar üzerine böylesi bilgiler, toplam kommünitenin çeşitli organik bileşikleri metabolize etme kapasitesi hakkında fazla bilgi veremezler. Bu 1991 yılında Garland ve Mills'in kommünite metabolik çeşitliliğinin tahmini için 95 farklı karbon kaynağı içeren BIOLOG plakalarının kullanıldığı yeni konsepti ortaya atmalarıyla değişmiştir. Bunlar başlangıç çalışmaları olduğundan, teknik bir çok farklı çevreye uygulanmıştır. Son zamanlarda, Litchfield ve arkadaşları (2000) ve Litchfield ve Gillevet (2002) tarafından solar tuzla kommünitelerine uygulanmıştır. Bu araştırmacılar toplam tuzlulukları %14-15'in altındaki konsantrator havuzlarında metabolik kapasitenin mevsimsel ve bölgesel olarak değiştiğini rapor etmişlerdir (Ventosa 2004).

Aynı zamanda Eilat, İsrail ve Newark, Kaliforniya tuzlaları arasındaki metabolik potansiyeli de karşılaştırmışlardır. Kaliforniya örneklerinin %85'i tarafından kullanılan 9 karbon kaynağının Eilat örneklerince kullanılmadığı ve yalnızca 1 substratın (2,3, butandiol) Kaliforniya örneklerince kullanılmadığı bulunmuştur. En yaygın kullanılan substratlar aminoasitlerden L-alanin, L-asparagin, L-prolin ve karbonhidratlardan alfa D-glukoz, maltoz, D-trehaloz, sukroz, sitrik asit, D-glukozamik asit, adonitol, eritritol, D-melibioz, L-ramnoz, alfa hidrobutirik asit, 2-3-butandiol ve alaninamid'dir.

Mono Gölü örnekleri ile yapılmış başka bir çalışmada, buradaki mikrobiotanın BIOLOG plaklarındaki potansiyel substratların %32'sini kullanabildiği bildirilmiştir (Ventosa 2004).

İn-situ prokaryotik çeşitliliğin moleküler metodlar kullanılarak çalışılması geçtiğimiz son 10-15 yılda giderek popüler hale gelmiştir ve temel olarak 16S rRNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak amplifikasyonu ve dizi analizine dayanmaktadır. Mikrobiyal çeşitliliğin çalışılmasında belirli birtakım moleküler metodlar kullanmak uygundur ve uygulanacak metodun seçimi amaca ve analiz edilecek örnek miktarına bağlı olarak değişebilmektedir. Şekil 4.1.'de mikrobiyal populasyonların genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde kullanılan farklı moleküler yaklaşımlar özetlenmektedir.



Şekil 4.1. Karışık mikrobiyal populasyonların genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde kullanılan farklı moleküler yaklaşımlar (Muyzer ve ark. 1996).

Mikrobiyal çeşitlilik üç farklı düzeyde biyolojik çeşitliliğe gönderme yapmaktadır: tür içi (genetik) çeşitlilik, tür sayısı (türler) çeşitliliği ve kommünite (ekolojik) çeşitliliği (Ovreas ve ark. 2003).

Tür çeşitliliği iki bileşenden oluşur, birincisi bulunan tür sayısıdır ve tür zenginliği olarak gösterilebilir. İkinci bileşen ise bu tür içindeki bireylerin dağılımıdır ve “eşitlik” ya da “dengeli olabilirlik” olarak tanımlanır. Bu nedenle, çeşitlilik konsepti çok yaygın olarak hem bilgi içeriğini hem de bu bilgilerin toplam örnekler içerisindeki dağılımını tanımlar. Bakteriyal sistemlerde eşitlik genellikle bilinmemeyendir. Çünkü bireysel hücreler çok nadir olarak tür düzeyinde identifiye edilirler. Kommünite DNA’sının geniş çaplı analizi, bakteriyal kommünitelerin toplam genetik çeşitliliği hakkında bilgi sağlamaktadır (Ovreas ve ark. 2003).

PCR temelli “parmak izi” teknikleri yüksek çözünürlük verir ve kommünite yapısındaki değişiklikler hakkında fikir verir. Bu parmak izi teknikleri mikrobiyal toplulukların tür kompozisyonları yanında bunların zamansal ve mekansal değişikliklerinin karşılaştırılmasında iyi araçlardır. Bunlar jel

elektroforezleri ile band patternleri üretirler ve en iyi durumda her band tek bir taksonu yansıtır (Ovreas ve ark. 2003).

Parmak izi metodları çevre mikrobiyolojisinde çok geniş bir biçimde kullanılır ve çalışılan mikrobiyal kommünitenin PCR hedefli başka üyelerinin bir kompozisyonunu yansıttığı büyük oranda kabul edilmektedir. PCR parmak izi analizlerine göre, mikrobiyal topluluklar genellikle az sayıda takson tarafından (3 ila 35 band genel olarak kaydedilmiştir) domine edilir ve bunların dışındakilerin bir çoğu çok düşük miktarlarda bulunurlar (Ovreas ve ark. 2003).

Bununla beraber, PCR'ın amplifikasyon safhasında bazı problemler ve kısıtlamalar mevcuttur ve bu nedenle bu metodlar tür zenginliğinin kesin göstergeleri olarak kullanılamazlar. PCR'a dayanan "parmak izi" teknikleri kommünite analizleri için kullanıldığında bunlar toprak ve sedimentlere oranla çoğu akuatik çevrelerde daha düşük sayıda prokaryotik takson (genellikle 10 tür civarında) bulunduğunu ortaya koymaktadır. DNA birleşmesine dayanan metodlar, çeşitlilikteki bu farklılıkları doğrulamıştır, fakat tüm çevrelerde daha yüksek çeşitlilik açığa çıkmıştır. Parmak izi teknikleri sadece en bol bulunan türleri ortaya koyduğu için bazı zıtlık gösteren sonuçlar alınabilmektedir. Ekstrem çevreler genellikle mikroorganizma düzeyinde bile düşük çeşitlilik gösterirler. Bu nedenle mikrobiyal biyoçeşitliliğin çalışılmasında göreceli olarak basit kommünite yapılarıyla avantaj sağlayarak sıklıkla model sistemler olarak kullanılırlar (Ovreas ve ark. 2003).

Son zamanlarda, hipersalin çevrelerdeki biyoçeşitliliğin moleküler metodlarla belirlenmesine yönelik birkaç çalışma yapılmıştır. 4 farklı laboratuvar tarafından farklı parmak izleri analiz edilmiş ve gözlenenin dışında neler olduğu ortaya konmaya çalışılmıştır. Sonuçta tuzluluk derecesi (NaCl gradienti) boyunca sonuçların benzer olduğu görülmüştür (Casamayor ve ark. 2002). Parmak izlerinden elde edilen 16S rDNA dizileri ve klon kütüphaneleri de aynı zamanda analiz edilmiştir (Benlloch ve ark. 1995)

Özellikle tuzca doyma noktasına yakın ya da tuzca doymuş olan deniz tuzlalarının kristalize havuzları çalışılmıştır ve bunların düşük çeşitliliği doğrulanmıştır. Archaea'nın sayısı, biomas ve genetik heterojenite anlamında mikrobiyal kommünitenin en önemli parçası olduğu gösterilmiştir (Anton ve

Rossello-Mora 2000). Dahası Archaeal kommünite yakın ilişkili türlerden oluşmaktadır. Bunlardan çoğu, 1980’de Walsby tarafından tanımlanan kare şeklinde , filotip SPhT olarak gösterilen tek bir genus içinde yer almaktadır.

Geçmişteki ekolojik çalışmaların çoğu, mikroorganizmaların çevreden izolasyonu ve karakterizasyonu ile sınırlı kalmıştır. Bu yaklaşım mevcut biyoçeşitlilik üzerine değerli bilgiler sağlamıştır. Bununla beraber, agar petrilerinde koloni olarak elde edilen mikroorganizma yüzdesi genel olarak düşüktür ve bu nedenle bu tip veriler gerçek kommünite yapısı üzerine çok az bilgi sağlar.

Moleküler biyolojik tekniklerin mikrobiyal ekolojiye uygulanması, özellikle de ribozomal RNA dizilerinin karakterizasyonuna dayalı yaklaşımların kullanılması göstermiştir ki, kültür edilen organizmalar doğal çevrelerde baskın halde olanlardan genellikle farklıdır. Buna ek olarak, halofilik Archaea’nın in situ büyüme oranları ve onları ölüme götüren faktörler hakkında çok şey bilinmemektedir (Oren 2002c).

Kültür bağımsız rRNA tabanlı moleküler çalışmalar tuzla kristalize havuzlarındaki Archaeal kommünitelerin karakterizasyonu için kullanılmıştır. Bu çalışmalar agar petrilerinde elde edilen türlerin hiçbirisinin bu havuzlardaki Archaeal kommünitenin ana parçası olmadığını göstermiştir (Oren 2002c).

İspanya tuzlalarındaki bir çalışmada (Rossello-Mora ve ark. 1999); 5S rRNA, mikrobiyal topluluktan bir ön amplifikasyon yapılmadan ekstrakte edilmiş ve elektroforetik olarak kültür edilmiş halofilik Archaea’dan gelen 5S rRNA ile karşılaştırılmıştır. Kristalize havuzlar iki band vermişler ve bunların ikisi de kültür edilmiş halofilik Archaea ile eşleşmemiştir. Kullanılan bir başka yaklaşım biomasdan elde edilen ekstrakte edilmiş DNA’dan 16S rDNA amplifikasyonu sonrası restriksiyon kesimlerinin karşılaştırılmasına dayanmaktaydı. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)) Archaea ya da Bacteria spesifik primerlerle yapılan amplifikasyonu takiben *Alu I*, *Hinf I* ve *Mbo I* ile kesimlerin yapılmasıyla belirlenmektedir. Bakteriyal çeşitlilik tuzluluk arttıkça azalırken, Archaeal çeşitlilik artmaktadır.

Kristalize havuzlarında bulunan Archaea’nın doğası üzerine en detaylı bilgiler biomasdan izole edilen DNA’dan yapılan 16S rDNA genleri

amplifikasyonu ürünlerinin dizi analizlerinden elde edilmiştir. Bu çalışmaların çoğu İspanya’da Alicante yakınlarındaki Santa Pola solar tuzlarında gerçekleştirilmiştir (Oren 2002c).

Çalışmamızda çevresel örnekten elde ettiğimiz DNA’nın 16S rRNA amplifikasyon ürünlerinden 16S gen kütüphanesi oluşturarak, Tuz Gölü’nde kültür edilemeyen prokaryotik flora kısmın ortaya konması amaçlanmıştır. Archaea ve Bacteria için iki ayrı 16S rRNA kütüphanesi oluşturulmuş ve dizi analizleri yapılacak farklı inserte sahip klonlar ARDRA ile elde edilen patternlere göre belirlenmiştir. Archaea için 8 ve Bacteria için 10 farklı pattern belirlenmiş ve bunları temsil eden klonlar seçilerek dizi analizleri yapılmıştır. Buna göre FISH ve DGGE’de elde edilen sonuçlara paralel olarak Archaea klonları arasında en sık rastlanılan *Haloquadra walsbyi* olmuştur. Bunun dışında *Halosimplex carlsbadense*, *Haloterrigena thermotolerans* ve *Halorubrum* sp.’de varlığı ortaya konan diğer organizmalardır.

Bacteria klonları için alınan sonuç da DGGE ve FISH ile elde ettiğimiz sonuçları doğrular niteliktedir. Burada da en sık karşılaşılan patternleri dizi analizi ile tespit ettiğimiz zaman *Salinibacter ruber* strain POLA 13, *Salinibacter ruber* strain POLA 18, *Halophilic eubacterium* EHB-2 ve *Halophilic eubacterium* EHB-4 ile benzerlik gösteren diziler bulunmuştur. Yani Tuz Gölü örneklerinde *Salinibacter* dominant organizma olarak görünmektedir. Bunun dışında *Halanaerobacter lacunarum*, *Acinetobacter baumannii* ve *Cytophaga* sp. Dex80-37 ile benzerlik gösteren dizilerde elde edilmiştir.

PCR ile amplifiye edilmiş gen fragmentlerinin Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE) mikrobiyal ekolojide kullanılan genetik parmak izi tekniklerinden biridir (Muyzer 2000). DGGE’de benzer büyüklükteki DNA fragmentlerinin DNA denatürantlarının gradienti boyunca dizi farklılıklarına göre ayrımları yapılmaktadır. PCR-DGGE parmak izi mikrobiyal genetik çeşitlilikteki varyasyonların izlenmesi için bir araçtır ve predominant komünite üyelerinin “zenginliği” üzerine tahminde bulunmaya olanak sağlar. Dahası DGGE patternlerinin spesifik problemlerle hibridizasyonu veya tek tek bandların dizi analizlerinin yapılmasıyla popülasyonların identifikasyonunu sağlar (Schafer ve Muyzer 2001).

PCR-DGGE mikrobiyal kommunitelerin çeşitliliğinin araştırılmasında, bakteriyal populasyonların uzaysal ve mevsimsel değişkenliklerinin belirlenmesi ve doğal ya da suni çevresel değişiklikler sonrası kommünite davranışlarının izlenmesinde kullanılmaktadır. Toprak, sedimentler, su kolonları, hidrotermal çukurlar, mikrobiyal halılar ya da lağım arıtma tesisleri gibi çok farklı habitatlarda kommünite çalışmaları için kullanılmıştır (Schafer ve Muyzer 2001).

Teske ve arkadaşları (1996) PCR-DGGE yöntemini Danimarka “fiyord”larındaki sülfat indirgeyen bakterilerin dağılımının çalışılmasında kullanmışlardır. PCR-DGGE ve bununla kombine edilmiş hibridizasyon analizleri sülfat indirgeyen bakterilerin kemoklinde ve bunun altında sayıca arttığını göstermişlerdir. Bununla paralel yapılan “En Muhtemel Sayı” yöntemleri de bu sonuçları desteklemiştir. İlginç olarak RNA’dan “reverse transkripsiyon” sonrası cDNA’dan elde edilen PCR ürünlerinin DGGE patternleri aktif populasyonları yansıtmaktadır ve genomik DNA amplifikasyonundan elde edilen bantlardan farklılık gösterebilmektedir. En muhtemel sayı ve DGGE yöntemlerinin gösterdiği benzer sonuçlara rağmen, DGGE bantlarının dizi analiz sonuçları ile ortaya konan sülfat indirgeyen bakterilerin filogenetik gruptaki yeri ile kültür edilenler arasında fark vardır. En muhtemel sayı yöntemi ile belirlenenler *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* ve *Desulfobacter* iken DGGE patternlerinde ortaya çıkarılanlar δ -*Proteobacteria* üyeleridir ve bu da kültür bağımlı ve moleküler metodlar arasındaki bir fark olarak bilinen bir olgudur (Schafer ve Muyzer 2001).

PCR-DGGE analizleri DNA ile olduğu kadar RNA kullanılarak da yapılabilir. DNA türevli PCR ile amplifiye edilmiş 16S rRNA genleri farklı bakteriyal populasyonların varlığı ile ilişki kurarken, rRNA türevli PCR ürünlerinin analizi ise RNA havuzuna hangi bakteriyal populasyonların katkı yaptığını göstermektedir. Ribozomal RNA’nın hücresel konsantrasyonu hücrenin son dönem aktivitesi ile ilgili olduğundan bakteriyal populasyonların aktivitelerinin ölçümüne yardımcı olur (Schafer ve Muyzer 2001).

Rossello-Mora ve arkadaşları (1999) deniz sedimentlerindeki mikrobiyal kommuniteleri bu yöntemle araştırarak RNA türevli amplifikasyonlar sonrası bantları identifiye etmişler ve bu çevrelerdeki aktif grupları rapor etmişlerdir.

PCR-DGGE yöntemi eukaryotik mikroorganizmaları ve Archaea'yı çalışmaya da izin verir. Farklı PCR-DGGE teknikleri Archaeal 16S rRNA gen fragmentlerinin analizi için kullanılmıştır (Ovreas ve ark. 1997; Casamayor ve ark. 2000). Dahası bu teknik viral kommünitelerin çalışılması için de kullanılmıştır.

DGGE parmak izi sadece 16S rRNA gen fragmentleri ile sınırlı değildir. Fonksiyonel genler için de uygulanabilmektedir. *Desulfovibrio* türlerinin hidrogenazı kodlayan genlerini hedefleyen primerler kullanılarak Wawer ve arkadaşları (1997) DGGE ile kompleks mikrobiyal kommünitelerde bu genlerin ekspresyonunu analiz etmişlerdir.

Eukaryotik mikrobiyal kommünitelerin analizi için de 18S rRNA gen fragmentlerinin DGGE analizi gerçekleştirilmektedir. Hannan ve arkadaşları (1998) eukaryot spesifik PCR-DGGE ile lagun sistemdeki 5 Hollanda gölünü çeşitlilik açısından karşılaştırmışlardır.

Genetik çeşitlilik analizleri ve tür identifikasyonları üzerine moleküler bilgilerin çoğu klonlama stratejilerinden özellikle de 16S rDNA fragmentlerinin PCR ile amplifiye edilip klonlanmasından elde edilir. Bununla beraber bu zaman alıcı ve zahmetlidir. Aynı 16S rDNA ile "insert"lenmiş çok sayıda farklı koloninin dizi analizini gerçekleştirmek de pahalı olmaktadır. Öte yanda DGGE, farklı dizi varyanslarını fiziksel olarak ayırabilmekte ve bunu çok hızlı bir şekilde (yaklaşık 5 saat) ve ucuza yapabilmektedir. Kommünitenin kompleksliği üzerine direkt bir görünüm verir ve tek olarak ayrılmış bantların dizi analizini veya spesifik oligonükleotid problemleri ile hibridizasyonu takiben türlerin tanısının yapılmasına da izin verir. Dahası populasyon dinamiği çalışmaları için çok önemli olan aynı jel üzerinde çok fazla örneğin analizini de mümkün kılan bir yöntemdir. Bununla beraber, ayrılmış bantların dizi analizinden elde edilen filogenetik bilgiler kısıtlayıcı olabilmektedir. Çünkü 500 bp büyüklüğündeki fragmentlerin ayrımı yapılmaktadır (Muyzer ve ark. 1996).

Çalışmamızda Mayıs A, Temmuz A, Temmuz E ve Ekim A örneklerini DGGE analizleri ile Archaea, Bacteria ve Eukarya açısından değerlendirilmiştir.

Archaea için yaptığımız DGGE analizi ile Temmuz A örneğinin en fazla çeşitliliği yansıttığı ortaya konmuştur. Bu jelden elde edilen patternlere göre

oluşturulan matriks ve buradan türetilen benzerlik dendogramına göre Mayıs A ve Temmuz E örnekleri %95'in üzerinde, Temmuz A örneği bu iki örneğe %90'ın üzerinde benzerlik göstermektedir. Ekim A örneği ise diğerlerine %75 benzerliktedir.

Bu jelde oluşan patternlere baktığımız zaman özellikle 5A, 6A, 7A, 8A, 11A, 12A ve 14A olarak isimlendirdiğimiz bantların Mayıs A, Temmuz A ve Temmuz E örneklerinde yoğun bir şekilde bulundukları, Ekim A örneğinde ise 8A dışındaki diğer bantların yoğunluk olarak azaldığı gözlenmiştir. Tek bantlar kesilerek tekrar amplifiye edilmişler ve bunların dizi analizleri yapılmıştır. Dizi analizlerine göre tüm örneklerde yoğun olarak görülen bantlar *Haloquadra walsbyi*, *Archaeoglobus profundus*, *Halorubrum* sp., *Halobacterium saccharovororum* ve *Halorubrum orientalis* olarak identifiye edilmişlerdir. Özellikle *Haloquadra walsbyi* dominant organizma olarak tespit edilmiştir ki bu da hipersalin çevrelerde yapılan ve daha önceden bahsedilen diğer çalışmaların sonuçlarına benzerdir. Bu bulgu Tuz Gölü için ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur.

Çalışmamızda Bacteria için yaptığımız DGGE analizi ile Mayıs, Temmuz ve Ekim ayı örneklerinin nispeten benzer patternler verdikleri görülmüştür. Bu jelden elde edilen patternlere göre oluşturulan matriks ve buradan türetilen benzerlik dendogramına göre Mayıs A örneği diğerlerine %75 oranında benzemektedir. Temmuz A ve Temmuz E örnekleri ise %95'in üzerinde benzerliği paylaşmaktadırlar.

Bu jelde oluşan patternlere baktığımız zaman özellikle 1B, 2B, 4B, 7B ve 8B olarak isimlendirdiğimiz bantların tüm örneklerde yoğun bir şekilde bulundukları gözlenmiştir. Tek bantlar kesilerek tekrar amplifiye edilmişler ve bunların dizi analizleri yapılmıştır. Dizi analizlerine göre tüm örneklerde yoğun olarak görülen bantlar *Cytophaga* sp., *Salinibacter ruber* ve *Halophilic eubacterium* EHB-2 olarak identifiye edilmişlerdir. Özellikle *Salinibacter ruber* dominant Bacteria üyesi organizma olarak tespit edilmiştir ki bu da hipersalin çevrelerde yapılan ve daha önceden bahsedilen diğer çalışmaların sonuçlarına paraleldir. *Salinibacter ruber*'in Tuz Gölü Bacteria popülasyonları içerisinde dominant grup olması ilk defa bu çalışmada ortaya konmuş olan bir bulgudur.

Çalışmamızda Eukarya için yaptığımız DGGE analizi ile Mayıs, Temmuz ve Ekim ayı örneklerinin nispeten benzer patternler verdikleri görülmüştür. Archaea jelindeki sonuçlara paralel olarak Eukarya jelinde de Temmuz A örneği en fazla çeşitliliği yansıtan örnek konumundadır. Bu jelden elde edilen patternlere göre oluşturulan matriks ve buradan türetilen benzerlik dendogramına göre Temmuz A örneğinin diğerlerine %75 oranında benzediği görülmektedir. Temmuz E, Ekim A ve Mayıs A örnekleri ise %95'in üzerinde benzerliği paylaşmaktadırlar. Eukarya jelinde tüm örneklerde mevcut olan ve dominant gruba temsil eden koyu bant büyük bir ihtimalle *Duneliella salina*'ya aittir. Su örneklerinin mikroskobik incelemeleri sırasında da bu organizmaya yoğun olarak rastlanmıştır.

Floresan in situ hibridizasyon (FISH), Eubacteria prob 338'in toplam sayının %18'i ile hibridizasyon yaptığını göstermiştir. Bakteriyal komünite Archaeal olandan daha homojendir ve hemen hemen tamamı aşırı derecede halofilik bakteriyal genus *Salinibacter*'den oluşmaktadır (Ovreas ve ark. 2003).

Mikrobiyoloji moleküler çağa girmiş durumdadır. Hemen hemen her ay yeni bir bakteriyal genom yayınlanmaktadır ve artık yeni izole edilen bir mikroorganizmanın sınıflandırılmasına en azından bir nükleik asit dizisinin belirlenmesi ve bunun karşılaştırılması ile başlanmaktadır. Açıkça bu amaçla en çok kullanılan molekül Bacteria ve Archaea'daki 16S rRNA olan, ribozomun küçük alt ünitesidir. Nükleik asitlerin dizi bilgilerini elde etmede temelde 2 teknik kullanılır. Birincisi dizinin çıkarılmasını takiben karşılaştırmalı dizi analizi ve ikinci olarak da nükleik asit problemleri ile hibridizasyondur (Amann ve Schleifer 2001).

Birinci durumda, tek iplikli nükleik asit parçaları olarak tanımlanabilecek nükleik asit problemleri, kendi komplementerlerine spesifik olarak bağlanma yeteneği gösterirler. Bu süreç ile hibridizasyon adı verilen probun ilgili hedef moleküle bağlandığı durum gerçekleşir. Çoğu durumda bu olay hedef moleküle bağlanmanın gözlenmesi için tespit edilebilir bir "etiket"in kullanılmasını da içerir (Amann ve Schleifer 2001).

Orijinal olarak DeLong ve arkadaşları (1989) tarafından tanımlanmış olan, fikse edilmiş toplam bakteriyal hücrelerin floresan işaretli rRNA hedefli

oligonükleotidler kullanılarak in situ identifikasyonu, son zamanlarda bakteriyolojide bir çok uygulamaya sahiptir. Ribozomal RNA in situ hibridizasyon için tek hedef değildir fakat açık bazı nedenlerden dolayı en yaygın olanıdır. Stabilitesi ve yüksek sayıdaki kopyaları rRNA'yı mRNA'dan daha kolay bir hedef yapmaktadır (Amann ve Schleifer 2001).

Floresan in situ hibridizasyondaki temel adımlar mikroorganizmaların fiksasyonu, spesifik problemlerle hibridizasyon, bağlanmamış problemlerin yıkama ile uzaklaştırılması ve hibridizasyonun deteksiyonu şeklinde özetlenebilir. İn situ hibridizasyonda bu temel adımların herbirinin, ekstrakte edilmiş hedef nükleik asitlerin spesifik ve hassas deteksiyonu için, gözden geçirilmesi gerekmektedir. Bununla beraber birkaç ek husus da özellikle hatalı negatif sonuçlardan kaçınmak anlamında kritiktir.

Bunlar sırasıyla;

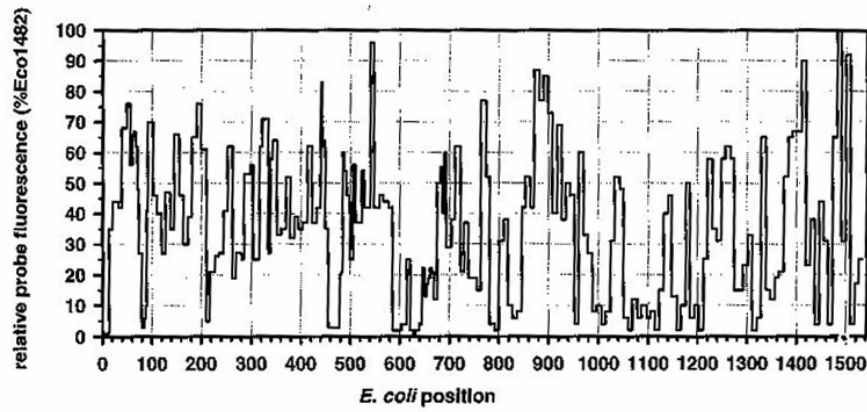
a) Hedef hücrelerin nükleik asit problemleri için geçirgenlikleri (permeabilizasyonları): Başarılı bir in situ hibridizasyonun ön koşulu prob molekülünün hedef moleküle ulaşabilmesidir. Bunun için hücre duvarı, membranlar ve varsa kapsül materyali ya da ekstraselüler polimerik maddeler gibi hücre komponentlerinin probun içeri girebilmesi için geçirgen olması gerekir. Bu yaklaşım içerisinde, oligonükleotidler polinükleotidlerden ve 1 kDa'dan daha düşük moleküler ağırlıktaki küçük floresan "etiket"ler horseradish peroksidaz gibi büyük enzim etiketlerinden çok daha iyidirler (Amann ve Schleifer 2001).

Membranlar genel olarak standart oligonükleotidlere geçirgen olmadıkları için bir fiksasyon adımı gerektirirler. Fiksasyon genellikle örneğin aldehit solusyonları (paraformaldehit, formalin) ve/veya denatüre edici alkol ile muamelesi ile gerçekleştirilir. Bu adım aynı zamanda hücreleri de öldürür.

Kalın duvarlı Gram pozitif bakteriler Gram negatiflere göre farklı fiksasyon protokollerine ihtiyaç duyarlar. Bununla birlikte probun difüzyonu prob ile hedef arasındaki mesafe nedeniyle belirli bir zaman gerektirir. Bu nedenle büyük agregatların sonikasyon gibi etkenlerle ayrılması sağlanmalıdır.

b) Prob hedef bölgesinin in situ uygunluğu: rRNA hedefli floresan in situ hibridizasyon (FISH) ilk uygulandığından beri bazı hedef bölgelerin diğerlerine göre daha güçlü sinyal verdiği görülmüştür. Denatüre edilmiş ekstrakte nükleik

asitler için hedef moleküllerin tamamıyla tek iplikli ve farklı hedef bölgelerinin farklı problemler açısından eş uygunlukta olduğu varsayılır. Fakat bu rRNA hedefli oligonükleotidlerle gerçekleştirilen in situ hibridizasyon için böyle değildir. Burada hedef moleküller ribozomun birleşik parçalarıdır ve hala hücre içindedirler. Hem rRNA proteinleri hem de rRNA-rRNA etkileşimleri hedef bölgenin uygunluğunu etkileyebilmektedir. İşte bu da *E.coli* 16S rRNA'sında 10 nükleotidden az bir yeri hedef alan 200 floresan etiketli oligonükleotidin, tamamıyla aynı hücreler üzerinde çok farklı floresan boyama kapasiteleri göstermesinin sürpriz olmadığı gerçeğini ortaya koymaktadır. Şekil 4.2. de *E.coli* 16S rRNA dizisinin in situ hibridizasyona uygunluğunu göstermektedir (Amann ve Schleifer 2001).



E.coli 16S rRNA'sının in situ uygunluk haritası

Şekil 4.2. *E.coli* 16S rRNA'sının in situ uygunluğunu gösteren harita (Amann ve Schleifer 2001).

İyi seçilmiş uygun bir hedef bölge in situ identifikasyonda çok kritik olan ve hassasiyeti belirleyen floresan sinyalin oldukça parlak olmasını sağlar. rRNA molekülleri ve ribozomların yapısı korunmuş olduğundan dolayı *E.coli* 16S rRNA'sının in situ uygunluğunu gösteren harita diğer organizmalardaki hedef bölgelerin seçimi için yardımcı olmalıdır. Fakat farklı türler arasında in situ uygunluk varyasyonları olduğu da unutulmamalıdır. Bu nedenle yeni dizayn edilmiş bir prob denenirken in situ sinyal seviyesinin düşük olduğu görülürse, bu problemin hücre ile ya da prob ile ilgili olup olmadığının anlaşılması için, iyi

bilinen ve güçlü floresan veren (Eub338 gibi) bir probun aynı şartlarda denenmesi tavsiye edilmektedir (Amann ve Schleifer 2001).

c) İn situ hibridizasyon sensivitesinin artırılması: İn situ hibridizasyon sensivitesi söz konusu olduğunda, bireysel hücrelerin bile identifiye edilebilir olmasının gerektiğinin farkına varılmalıdır. Deniz sedimentleri 10^9 hücre/cm³ içerirler ve çok yüksek oranda da otofloresan özellikte partiküllere sahiptirler. Böyle durumlarda deteksiyon limiti %0.1 den ya da 10^6 hücre/cm³'den daha iyi olmayabilir. Bununla beraber, daha temiz bir su örneği ve doğru ekipmanlarla, bu durumu <1 hücre/cm³ seviyesine çıkarmak da mümkündür.

Sık karşılaşılan başka bir problem de çevreden gelen bakteriyal hücrelerin floresan oligonükleotid problarla hibridizasyon sonrası düşük sinyale sahip olmalarıdır. Son yıllarda, teknik gelişmeler daha duyarlı FISH çalışmalarının yapılmasını sağlamaktadır. Bunlar CY3 gibi daha duyarlı floresan boyaların, daha duyarlı ve güçlü kameraların kullanımını içermektedir (Amann ve Schleifer 2001).

Biz de çalışmamızda CY3 etiketli proplar ve nispeten güçlü kamera sistemleri kullanarak hassasiyeti yüksek sonuçların eldesini sağlamış bulunmaktayız.

rRNA hedefli problarla floresan in situ hibridizasyon (FISH), bir ön kültüre alma işlemi yapılmadan, epifluoresans ve konfokal lazer tarama mikroskopi kullanarak ya da flow sitometri yöntemleri ile karışık bakteri topluluğunun filogenetik identifikasyonuna izin veren bir boyama tekniğidir (Amann ve Schleifer 2001).

Polinükleotid DNA probları ile FISH ve spesifik oligonükleotidlerle FISH tanımlanmış durumdadır. Bakteriyal identifikasyon, bakteriyal komünite yapısı analizleri, ayrı mikrobiyal populasyonların kendi habitatlarında zamansal ve mekansal dinamiklerinin araştırılması gibi amaçlar için kullanılabilirler.

Bakteriler için FISH, on yılı aşkın bir süre önce ilk olarak tanımlanmıştır ve mikrobiyal ekoloji çalışmaları için bir dönüm noktası olarak değerlendirilmektedir (Pernthaler ve Amann 2001).

Son yıllarda FISH tatlı sular, kıyı ve açık deniz planktonik habitatlarına ve kıyı sediment örneklerine başarıyla uygulanmıştır. FISH ile belirlenebilen bakteri fraksiyonlarının, kıyı deniz planktonlarında mikrootografi yoluyla bulunan aktif

hücre miktarı sonuçları ile iyi bir uyum gösterdiği ortaya konmuştur. Proteobacteria'nın farklı alt sınıfları için grup spesifik problar Kar Gölü, tatlı su ve deniz planktonları kompozisyonları arasındaki temel farkların ortaya konması için ya da çamurlu Wadden Denizi sedimentlerinin mikrobiyal komünitelerinin dikey dağılımlarını göstermek için kullanılmıştır.

Ana filogenetik soyların ve bazı bireysel bakteri filotiplerinin mevsimsel dinamikleri göl bakteriyoplanktonlarında çalışılmıştır. Archaeal mevsimsel bulunuşluk ve vertikal dağılımları, Antarktik kıyı sularında polinükleotid ve oligonükleotid problar kullanılarak FISH yöntemi ile ortaya konmuştur.

FISH, predatörlüğün, tatlı su bakteriyoplankton birliktelik kompozisyonunu değiştirebileceğini göstermek için de kullanılmıştır. Aynı zamanda toprak ve atık su muamele sistemlerinde de birçok kullanımı olmuştur (Pernthaler ve ark. 2001).

Bu çalışmada Mayıs, Temmuz ve Ekim ayına ait Tuz Gölü örneklerinin Archaea, Bacteria ve *Salinibacter* spesifik Cy3 etiketli problar kullanarak FISH analizleri ilk kez gerçekleştirilmiştir. Her örnek için DAPI boyamaları ile paralel olarak gerçekleştirilen FISH deneyleriyle, örneklerdeki toplam hücre sayıları, Archaea, Bacteria ve *Salinibacter* sayıları tespit edilmiştir. DAPI boyama sonuçlarına göre Mayıs A örneği $1.19 \times 10^7 \pm 0.18$, Temmuz A $1.38 \times 10^7 \pm 0.08$, Temmuz E $1.48 \times 10^7 \pm 0.08$ ve Ekim A örneği $2.6 \times 10^7 \pm 0.25$ hücre/ml olarak bulunmuşlardır.

Archaea spesifik prob ile elde edilen FISH sonuçlarına göre Mayıs A örneğinin %52.9'unu, Temmuz A örneğinin %57.9'u, Temmuz E örneğinin %59.2'sini ve Ekim A örneğinin %61.5'ini Archaeal hücreler oluşturmaktadır. Bacteria spesifik prob ile elde edilen FISH sonuçlarına göre Mayıs A örneğinin %31.9'u, Temmuz A örneğinin %21.7'si, Temmuz E örneğinin %21'i Bacteria üyelerinden oluşturmaktadır. Bu da göstermektedir ki Archaeal populasyonlar genel olarak Tuz Gölü'nün domine eden organizmalardır.

Çalışmamızda EHB problarını kullanarak Tuz Gölü örneklerinde *Salinibacter* varlığı da araştırılmıştır. Buradan elde edilen deney sonuçlarına göre Mayıs A, Temmuz A ve Temmuz E örneklerinde spesifik hibridizasyon sinyali elde edilmiş ve DGGE ile ortaya konmuş olan *Salinibacter* varlığı FISH ile de

gösterilmiştir. FISH sonuçlarına göre Mayıs A örneğinin %3.9'u, Temmuz A örneğinin %2.31'i ve Temmuz E örneğinin %2.45'i *Salinibacter* üyelerinden oluşmaktadır.

İspanya'daki tuzla kristalize sularının mikroskobik analizi genellikle düz, kare ya da köşeli yapıda gaz vakuollu hücrelerin kommünite içinde baskın olduğunu göstermektedir Böyle kare şekilli halofiller Mısır Sinai'deki tuzlu su havuzlarında ilk defa Walsby tarafından tanımlanmıştır. Bunların bakteriyorodopsin içerdikleri de rapor edilmiştir. Bu kare hücreler uzun bir süre kültür edilememiş ve daha ilk olarak geçen sene kültür edilebilmişlerdir (Oren 2002).

Çalışmamızda da DAPI boyamaları ve spesifik problarla hibridizasyon deneyleri sonrası epifloresan mikroskopta yapılan incelemeler sırasında “kare” şekilli Archaeal hücrelere de oldukça sık rastlanmıştır. Bunlar DGGE ile de varlığı ortaya konmuş olan *Haloquadra walsbyi* 'ye ait hücrelerdir ve yoğun olarak örneklerde bulunmaktadır. Bu sonuç da başka hipersalin çevrelerde yapılmış olan araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir (Ovreas ve ark. 2003).

Bu çalışma ile Tuz Gölü'nün mikrobiyal kommüniteler düzeyindeki durumu açığa çıkarılmıştır. Tuz Gölü'nün FISH, DGGE ve 16S gen kütüphaneleri yardımıyla Archaea ve Bacteria için dominant grupları belirlenmiş durumdadır. Gölden izole edilen organizmalardan bazılarının dizi analiz sonuçlarını da içeren identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. İzolatların genel olarak bazı biyokimyasal testleri, polar lipid analizleri, antibiyotiklere duyarlılık testleri, SDS-PAGE analizleri, optimum büyüme için gerek duydukları sıcaklık, pH ve tuzluluk düzeyleri de ortaya konmuştur.

Sonuç olarak;

1) Bu çalışma ile klasik yöntemle petrilere izole edilebilen canlı bakteri sayısının 10^3 - 10^5 hücre/ml arasında değiştiği ancak DAPI boyamaları ile Tuz Gölü'ndeki toplam hücre sayısının 10^7 hücre/ml civarında olduğu ortaya konmuştur.

2) Tuz Gölü örneklerinin kültür bağımsız tekniklerle analizi sonucu, buradan yapılan örneklemelerde kültür haline getirilemeyen (şimdilik) halofilik üyeleri de yoğun bir şekilde barındırdığı belirlenmiştir.

3) Tuz Gölü örneklerinin kültür bağımsız tekniklerle analizi sonucu Archaeal populasyonlar içinde *Haloarcula walsbyi*'nin, Bacteria populasyonları arasında da *Salinibacter ruber*'in dominant organizmalar olduğu ilk defa olarak ortaya konmuştur.

4) 25 izolatın 16S rDNA dizi analizine göre identifikasyonu ilk kez bu çalışma ile gerçekleştirilmiş ve izolatların çoğunun Archaea grubuna ait oldukları belirlenmiştir. Bunlar *Haloferax mediterranei*, *Haloferax alexandrinus*, *Haloarcula hispanica*, *Haloarcula argentinensis*, *Haloarcula marismortui*, *Halorubrum xinjiangense* ve *Halomicrobium mukohatei* olarak identifiye edilmişlerdir. Bacteria grubu üyesi olarak ise *Chromohalobacter marismortui* tanımlanmıştır.

5) Bu çalışma ile Tuz Gölü örnekleri ilk defa olarak komünite düzeyinde FISH, DGGE ve 16S rRNA gen kütüphanesi kurulması yöntemleri kullanılarak çalışılmış ve Archaeal populasyonların daha baskın oldukları belirlenmiştir.

6) DGGE Archaea jelinden elde edilmiş olan bantların reamplifikasyonları ve bunların dizi analizleri sonrası *Haloquadra walsbyi*, *Archaeoglobus profundus*, *Halorubrum* sp., *Halobacterium saccharovorum* ve *Halorubrum orientalis*'e benzerlik gösteren diziler elde edilmiştir.

7) DGGE Bacteria jelinden ise *Cytophaga* sp., *Salinibacter ruber* ve Halophilic eubacterium EHB-2'ye benzerlik gösteren diziler elde edilmiştir.

8) 16S rRNA kütüphanesi çalışmasıyla da dizi analizleri sonrası Archaea klonları arasında *Haloquadra*, *Halosimplex carlsbadense*, *Haloterrigena thermotolerans* ve *Halorubrum* sp. varlığı ortaya konan diğer organizmalardır.

9) Bacteria klonları için *Salinibacter ruber* strain POLA 13, *Salinibacter ruber* strain POLA 18, *Halophilic eubacterium* EHB-2 ve *Halophilic eubacterium* EHB-4, *Halanaerobacter lacunarum*, *Acinetobacter baumannii* ve *Cytophaga* sp. Dex80-37 ile benzerlik gösteren diziler bulunmuştur.

Öneriler ve gelecekte yapılması planlanan çalışmalar:

Bu çalışmada, kültürel yöntemle izole edilmiş olan 122 izolatın ancak 25 tanesinin dizi analiz çalışmaları yapılabilmektedir. Geriye kalan izolatların (103) arasında yeni türler bulunma ihtimali mevcut olduğundan kalan izolatların DNA dizi analizlerine dayanan identifikasyon işlemleri gelecek çalışmalarda tamamlanacaktır.

Ayrıca, DGGE yöntemi kullanılarak elimizdeki izolatların elde ettiğimiz kültür bağımsız analiz sonuçları ile karşılaştırılması yönünde ileriye dönük bir deney planlanmıştır. Bu yaklaşım ile elimizdeki izolatların her birinin DNA'sını içeren bir karışım hazırlanarak buradan kurulacak 16S PCR amplifikasyon ürünlerinin DGGE ile vereceği patternlere bakılacaktır. Bu patternlerin, çalışmamızda çevresel örnekten elde ettiğimiz patternlerden ne kadar farklılık gösterdiği belirlenebilir. Bundan sonra da farklılık gösteren bantların dizi analizleri sonrası identifikasyon mümkün olabilir ki bu bize yeni türlerin varlığını (eğer var ise) gösterebilecektir.

Bu çalışmadaki kültür bağımsız deney sonuçlarının da gösterdiği gibi *Salinibacter ruber* Tuz Gölü'nde mevcuttur ve bunun izolasyonuna yönelik daha spesifik besiyerlerinin kullanıldığı çalışmalar ileride gerçekleştirilecektir.

Yağ asidi metil esterleri (Fatty Acids Methyl Esters)(FAME))'nin gaz kromatografi ile analizi Bacteria domaini üyelerinin karakterizasyonunda kullanılabilen etkili bir yöntemdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre Bacteria domainine ait olduğu belirlenen 9 adet izolatın yağ asidi metil esterlerine göre karakterizasyonları laboratuvarımızda sahip olduğumuz MIDI sistem ile tamamlanacaktır.

Son olarak, bundan sonraki çalışmalarımız gölden izole edilmiş veya yeni izole edilecek organizmaların biyoteknolojik potansiyellerinin değerlendirilmesine yönelik olacaktır.

5. KAYNAKLAR

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. ve Lipman, D. J. (1997), *Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs*. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.
- Amann, R. 1., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S.W., Devereux, R. ve Stahl, D. A. (1990), *Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1919-1925.
- Amann, R. 1., Ludwig, W., ve Schleifer, K. H. (1995), *Phylogenetic identification of individual microbial cells without cultivation*. Microbiol. Rev. 59: 143-169.
- Amann, R. ve Y Ludwig, W. (2000), *Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology*. FEMS Microbiology Reviews. 24: 555-565.
- Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F. ve Amann, R. (1999), *Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds*. Environ. Microbiol. 1: 517-523.
- Anton, J., Rossello-Mora, R., Rodriguez-Valera, F. ve Amann, R. (2000), *Extremely halophilic Bacteria in crystallizer ponds from solar salterns*. Appl Environ Microbiol. 66: 3052-3057.
- Anton, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodriguez-Valera, F., Amann, R. ve Rossello-Mora, R. (2002). *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 485-491.
- Arahal D. R., Dewhirst F. E., Paster, B. J., Volcani B. E. ve Ventosa A. (1996), *Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences*. App. Environ. Microbiol. 62: 3779-3786.

- Benlloch, S., Martinez-Murcia, A. ve Rodriguez-Valera, F. (1995), *Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment*. System. Appl. Microbiol. 18: 574-581.
- Benlloch, S., Acinas, S. G., Anton, J., Lopez-Lopez, A., Luz, S. P. ve Rodriguez-Valera, F. (2001), *Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from asolar saltem: culture versus PCR*. Microb. Ecol. 41: 12-19.
- Benlloch, S., Lopez-Lopez, A., Casamayor, E. O., Ovreas, L., Goddard, V., Daae, F. L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedros':Alio, C. ve Rodriguez-Valera, F. (2002), *Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltem*. Environ. Microbiol. 4: 349-360.
- Birbir, M. Ve Sesal, C. (2003), *Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Salt Lake*, Turk J. Biol. 27: 7-22.
- Boone, D. R, Casstenholz, R. W. ve Garrity, G. M. (eds.). 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2^{od}. Edn. New York. Springer.
- Bradford, M. M., (1976), *A Rapid and Sensitive Method for the quantition of microgram quantities protein utilizing the principle of protein dye-binding*, Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Chandler, D. P., Fredrickson, J. K. ve Brockman, F. J. (1997), *Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries*. Molecular Ecology 6: 475-482.
- Cifuentes, A., Anton, J., Benlloch, S., Donnelly, A., Herbert, R. A. ve Rodriguez-Valera, F. (2000), *Prokaryotic diversity in Zostera noltii-colonized marine sediments*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1715-1719.
- Çamur, Z. M. ve Mutlu, H. (1995), *Tuz Gölündeki Mineral Çökeliminin Termodinamik Değerlendirmisi*, Türkiye Jeoloji Bülteni, cilt 38, sayı 2: 67-73.
- DasSarma, S. ve Arora,. P. (2001), *Halophiles*. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group.

- Da Costa, M. S., Santos, H. ve Galinski, E. (1998), *An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea*. Adv. Bioch. Engin. Biotech. 61: 117-153.
- DeLong, E. (1992), *Archaea in costal marine environments*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 5685-5689.
- DeLong, E. F., Franks, D. G. ve Alldredge, A. L. (1993), *Phylogenetic diversity of aggregate attached vs. free living marine bacterial assemblages*. Limnol. Oceanogr. 38: 924-934.
- Denner, E. B. M., McGenity, T. J., Busse, H.-J., Grant, W. D., Wanner, G. ve Stan-Lotter, H. (1994), *Halococcus salifodinae sp. nov., an archaeal isolate from an Australian salt mine*. Int. J. Systematic bacteriol. 44:774-780.
- Dyall-Smith, M. (2004), *HaloHandbook*, [www. microbiol.unimelb.edu.au / staff/mds/ HaloHandbook](http://www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook).
- Franzmann, P. D., Staekenbradt, E., Sanderson, K., Volkman, J. K., Cameron, D. E., Stevenson, P. L., McMeekin, T. A. ve Burton H. R. (1987), *Halobacterium lacusprofundi sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake Antarctica*. Syst. Appl. Microbiol. 11: 20-27.
- Galinski, E. (1995), *Osmoadaptation in bacteria*. Adv. Microb. Physiol. 37: 272-328.
- Garcia-Martinez, J., Acinas, S. G., Anton, A. I. ve Rodriguez-Valera, F. (1999), *Use of 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity*, J. of Mic. Methods, 36, 55-64.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J. ve Pace N. R. (1988), *Phylogenetic group specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells*. J. Bacteriol. 170: 720-726.
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S. ve Plemenitas A. (2000), *Hypersaline waters in salterns natural ecological niches for halophilic black yeast*. FEMS Microbiol. Ecol. 32: 235240
- Grant, W. D. ve Ross, H. N. (1986), *The ecology and taxonomy of halobacteria*. FEMS Microbiol. Rev. 39: 9-15.

- Grant, S., Grant, W. D.; Jones, B. E., Kato, C. ve Li, L. (1999), *Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern*. *Extremophiles* 3: 139-145.
- Head, I. M., Saunders, J. R. ve Pickup, R. W. (1998), *Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms*. *Microb. Ecol.* 35: 1-21.
- Hesselberg, M. ve R. H. Vreeland. (1995), *Utilization of protein profiles for the characterization of halophilic bacteria*. *Curr. Microbiol.* 31:158-162.
- İnandık, H. (1955), *Türkiye Gölleri*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 44, İstanbul.
- Jones, B. E., Grant, W. D., Duckworth, A. W. ve Owenson, G. G. (1998), *Microbial diversity of soda lakes*. *Extremophiles* 2: 191-200.
- Kallı, N. (2000), *Tuz Gölü'nden İzole Edilen Aşırı Halofilik Bakterilerin İzolasyon ve İdentifikasyonlarının Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kushner, D. (1985). *The Halobacteriaceae*. p. 171-214. En C. Woese and Wolfe, S (ed.), *The bacteria*. Vol 8. Academic Press, London.
- Lane D. J. (1991), *16S/23S rRNA sequencing. in: nucleic acid techniques in bacterial systematics*. pp 115-175. Edited by E. Stackebrand & M. Goodfellow. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
- Litchfield, C. D., Irby, A., Kis-Papo, T. ve Oren, A. (2000), *Comparisons of the Polar Lipid and Pigment Profiles of Two Solar Salterns Located in Newark, California, USA and Eilat, Israel*, *Extremophiles*, 4:259-265.
- Litchfield, C. D., Irby, A., Kis-Papo, T. ve Oren, A. (2001), *Comparative Metabolic Diversity in Two Solar Salterns*, *Hydrobiologia*, 61:73-80.
- Litchfield, C. D. ve Oren, A. (2001), *Polar lipids and Pigments As Biomarkers for the Study of the Microbial Community Structure of Solar Salterns in Different Geographic Locations*, *Hydrobiologia*, 61:81-89.
- Ludwig, W. ve Schleifer, K. (1994), *Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 155-173.
- Ludwig, W. ve Klenk, H. P. (2001), *Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics*. In *Bergey's manual of*

- Systematic Bacteriology. Edited by D. R. Boone, G. Garrity and R. W. Castenholz. New York: Springer-Verlag.
- Martinez-Murcia, A., Acinas, S. G. ve Rodriguez-Valera, F. (1995), *Evaluation of prokariotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments*. FEMS Microbiol. EcoL. 17: 247-255.
- McGenity T. J ve Grant, W. D. (1995), *Transfer of Halobacterium saccharovorum , Halobacterium sodomense, Halobacterium trapanicum NRC 34071 and Halobacterium lacusprofimdi to the genus Halorubrum gen. nov. ,as Halorubrum saccharovorun comb. nov., Halorubrum sodomense comb. nov., Halorubrum trapanicum comb. nov. , and Halorubrum lacu~profundi comb. nov.* Syst Appl Microbiol, 18: 237 -243.
- Müller, V. ve Oren, A. (2003), *Metabolism of chloride in halophilic microorganisms*. Extremophiles 7: 261-266.
- Munson, M. A., Nedwell, D. B. ve Embley, T. M. (1997), *Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4729-4733.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. ve Vitterlinden, A. G. (1993), *Profiling in complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reactionamplified gene s coding for 16S rRNA*. Appl. Environ. Microbiol 59: 695-700.
- Muyzer, G. Hottentrager, S., Teske, A. ve Wawer, C. (1996), *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rDNA-A New Molecular Approach to Analyse the Genetic Diversity of Microbial Communities*, Mol. Microb. Ecol. Manual, 3.4.4.:1-23.
- Nogales, B., Moore, E. R., Abrham, W. R. ve Timmis, K.N. (1999), *Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenylpolluted moorland soil*. Environ. Microbiol. 1: 199-212.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J. ve Pace, N. R. (1986), *Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach*. Ann. Rev. Microbiol. 40: 337-365.

- Oren, A. (1990), *The use of protein synthesis inhibitors in the estimation of the contribution of halophilic archaebacteria to bacterial activity in hypersaline environments*. FEMS Microbiology Ecology 73: 187-192.
- Oren A. (1990b), *Estimation of the contribution of halobacteria to the bacterial biomass and activity in solar salterns by the use of bile salts*. FEMS Microbiology Ecology. 73: 41-48.
- Oren, A., Duker, S. ve Ritter, S. (1996), *The polar lipid composition of Walsby's square bacterium*. FEMS Microbiol. Let. 138: 135-140.
- Oren, A., Ventosa, A. ve Grant, W.D. (1997), *Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales*. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 233-238.
- Oren, A. (1999), *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*, CRC Pres, Boca Raton, London.
- Oren, A. ve Litchfield C. D. (1999b), *A procedure for the enrichment and isolation of Halobacterium*, FEMS Microbiology Letters, 173, 353-358.
- Oren, A. ve Rodriguez- Valera, F. (2001), *The contribution of halophilic Bacteria to the red. coloration of saltern crystallizer ponds*. FEMS Microbiol. Ecol. 36: 123-130.
- Oren, A. (2002), *Halophilic microorganism and their environments*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Oren, A. (2002b), *Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications*. J. Ind. Microbiol. Biotech. 28: 56-63.
- Oren, A. (2002c), *Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria*. FEMS Microbiol. Ecol. 39: 1 -7.
- Özcan, B. (2004), *Türkiye'den Halofilik Arkebakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Pace, N. (1996), *New perspective of the natural microbial world: molecular microbial ecology*. Features, 62: 463-470.

- Pernthaler A., Pernthaler, J. ve Amann R. (2002), *Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria*. App. Environ. Microbiol. 68: 3094-3101.
- Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickham, G. S. ve Pace, N. R. (1992), *Differential amplification of rRNA genes by the polymerase chain reaction*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3147-3148.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. Ve Ramos-Cormenzana, A. (1981), *Characteristics of the Heterotrophic Bacterial Populations in Hypersaline Environments of Different Concentrations*, Microb. Ecol. 7:235-243.
- Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. ve Imhoff, J. F. (1985), *Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern* , Microb. Ecol. 11:107-115.
- Rodriguez-Valera, F., Acinas, S. G. ve Anton, J. (1999), *Contribution of molecular techniques to the study of microbial diversity in hypersaline environments*. p. 27-38. A. Oren (ed.). Microbiology and biochemistry of hypersaline environments. CRC Press, Boca Raton.
- Rossello-Mora, R. ve Amann, R. (2001), *The species concept for prokaryotes*. FEMS Microbiol. Rev. 25: 39-67.
- Rossello-Mora, R., Lee, N., Anton, J. ve Wagner, M. (2003), *Substrate uptake in extremely halophilic microbial communities revealed by microautoradiography and fluorescence in situ hybridization*. Extremophiles. 7: 409-413.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S. ve Amann, R. (1997), *Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of Horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3268-3273.
- Stan-Lotter, H., Lang, F. J. Ve Hochstein, L. I. (1989), *Electrophoresis and isoelectric focusing of whole cell and membrane proteins from the*

- extremely halophilic archaeobacteria*. Appl. And Theor. Electrophoresis 1:147-153.
- Stan-Lotter, McGenity, T. J., Legat, A., Denner. E. B. M., Glaser, K., Stetter, K. O. ve Wanner, G. (1999), *Very similar strains of Halococcus salifodinae are found in geographicly separated Permo-Triassic salt deposits*. Microbiology, 145:3565-3574.
- Stan-Lotter, H., Pfaffenhueimer, M., Legat, A., Busse, H. J., Rdax, C. ve Gruber, C. (2002), *Halococcus dombrowskii sp. Nov. An archean isolate from a Permian alpine salt deposits*. Int. J. Systematic and Evolut. Microbiol. 52:1807-1814.
- Tindall, B.J. (1992), *The Family Halobacteriaceae .In:The Prokaryotes. A Handbook of Bacteria:Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, Vol. 1 (Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H., Eds.), pp. 768-808. Springer-Verlag, New York.
- Towner, K. J. ve Cockayne, A. (1993), *Molecular methods for microbial identification and typing*. Chapman & Hall 202p.
- Uygun, A. ve Şen, E. (1978), *Tuz Gölü Havzası ve Doğal Kaynakları I: Tuz Gölü Suyunun Jeokimyası*, Türkiye Jeoloji Kurumu Bülteni, 21: 113-120.
- Vaneechoutte, M., Rossau, R. P., Vos, D., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., Rouck, A. D., Fiers, T., Claeys, G. ve Kersters, K. (1992), *Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA)*. FEMS Microbiol. Lctt. 93: 227-234.
- Ventosa, A. (ed) (2004), *Halophilic Microorganisms*, Springer-Verlag, Berlin.
- Walsby, A.E. (1980), *A square bacterium*. Nature. 283: 69.
- Yalçın, F., (2000), *Characterization of Bacterial Isolates from Salt Lake*, Yüksek Lisans Tezi, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Ankara.