

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**ILIMLI HALOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU,
SAFLAŞTIRILMASI, TANISI VE BAZI MOLEKÜLER
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ebru TEKİN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.04

Sunuş Tarihi : 05.06.2015

Bornova-İZMİR

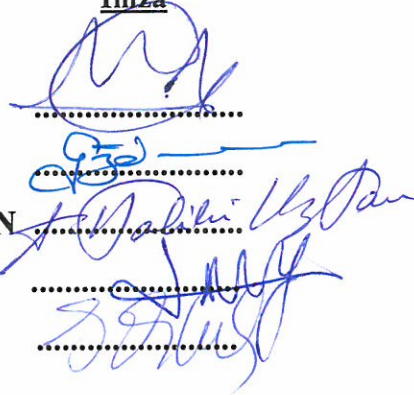
2015

Ebru TEKİN tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**Ilımlı Halofilik Bakterilerin İzolasyonu, Saflaştırması, Tanısı ve Bazı Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 05.06.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa ATEŞ
Raportör Üye : Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR
Üye : Doç. Dr. Alev HALİKİ UZTAN
Üye : Doç. Dr. H. Halil BIYIK
Üye : Doç. Dr. Evrim ÖZKALE

İmza



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Ilımlı Halofilik Bakterilerin İzolasyonu, Saflaştırması, Tanısı ve Bazı Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

05 / 06 / 2015

Adı-Soyadı İmzası

Ebru TEKİN

ÖZET

**ILIMLI HALOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU,
SAFLAŞTIRMASI, TANISI VE BAZI MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

TEKİN, Ebru

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

Haziran 2015, 207 sayfa

Bu çalışmada İzmir Çamaltı Tuzlası tuz yığını ve tuzlu su havuzundan su örneği ve İzmir Kuş Cenneti tuzlu su havuzundan su örneği ile ticari Himalaya tuz örneği gibi çeşitli tuz örneklerinden ılımlı halofilik ve halotolerant bakteriler izole edilmiş, yüksek tuzda yaşayabilen 10 izolat seçilerek saflaştırılmış, ayırteci fenotipik ve biyokimyasal testleri ile 16S rRNA gen bölgesi çalışılmıştır. Sonuç olarak *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* şubelerine ait ve *Halomonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Bacillaceae*, *Micrococcaceae* ve *Enterobacteriaceae* ailelerine ait suşlar elde edilmiştir. *Bacillus* sp. CT-2 suşu; *Bacillus* sp. CT-3 suşu; *Bacillus* sp. CT-4 suşu; *Pantoea* sp. CS-4 suşu; *Oceanobacillus* sp. HT-9 suşu; *Salinivibrio* sp. KC-2 suşu; *Halomonas* sp. KC-101 suşu ılımlı halofilik iken; *Virgibacillus* sp. CT-5 suşu, *Kocuria* sp. CT-6 suşu, *Halomonas* sp. CS-5 suşunun halotolerant karakterde olduğu tespit edilmiştir ve suşlar NCBI Gen Bankasına kaydedilmiştir. Tüm suşlar pH 5-11 arasında gelişen alkalitolerant özelliktedir. Suşların 9'u 4 °C'de gelişen psikrotolerant özelliktedir. Yine suşların 9 tanesi 45, 50 veya 55 °C'de gelişen termotolerant özelliklere sahiptir. Bu özellikleriyle ılımlı halofilik ve halotolerant suşların ülkemizde ilk defa olmak üzere çoklu ekstrem koşullara adapte olmuş *Poliektremotolerant* bakteriler olduğu da ortaya konmaktadır. *Kocuria* sp. CT-6, *Halomonas* sp. CS-5 ve *Oceanobacillus* sp. HT-9 suşlarının *ectBC* gen bölgesi varlığı ile bu çalışmada dizayn edilen orijinal primerler kullanılarak tespit edilmiştir. Bu tez çalışması ile elde edilen suşların *ectBC* gen bölgesine sahip olduğu böylece potansiyel ektoin üreticisi oldukları ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Poliektremotolerant bakteri, Hücre Terapötikleri, ılımlı halofilik ve halotolerant bakteriler, ectBC geni, 16S rRNA geni, Gradient PCR*

ABSTRACT

**ISOLATION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF
MODERATELY HALOPHILIC BACTERIA AND DETERMINATION OF
SOME MOLECULAR PROPERTIES**

TEKİN, Ebru

Ph.D. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

June 2015, 207 pages

In this study moderately halophilic and halotolerant were isolated from various salt samples such as Izmir Camalti Saltern salt bulk and salty water, Izmir Bird Paradise salty water and commercial Himalayan salt, the 10 isolates that can live at high salt concentrations were selected and purified. Differential phenotypical and biochemical tests were done and 16 S rRNA gene regions were analysed. Consequently, the strains were determined that they were in the phylums of *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and in the families of *Halomonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Bacillaceae*, *Micrococcaceae* ve *Enterobacteriaceae*. 7 of them; *Bacillus* sp. CT-2, *Bacillus* sp. CT-3, *Bacillus* sp. CT-4, *Pantoea* sp. CS-4, *Oceanobacillus* sp. HT-9, *Salinivibrio* sp. KC-2, *Halomonas* sp. KC-101 were detected as moderately halophilic and 3 of them; *Virgibacillus* sp. CT-5, *Kocuria* sp. CT-6, *Halomonas* sp. CS-5 were detected as halotolerant. The strains were submitted to NCBI GenBank. All of them were alkalitolerant characteristics in the ability of living at the range of pH 5-11. 9 of them were psychrotolerant characteristics in the ability of living at 4 °C and 9 of them were thermotolerant characteristics in the ability of living at 45, 50 or 55 °C. In addition to their moderately halophilic and halotolerant properties of these bacteria, this is the first report of *Polyextremotolerant* bacteria from Turkey which can tolerate multiple extreme conditions. *Kocuria* sp. CT-6, *Halomonas* sp. CS-5 and *Oceanobacillus* sp. HT-9 strains were positive for *ectBC* gene region analyses by using original primers designed in this study. According to the results these strains were detected as potential ectoine producers for further studies.

Keywords: *Polyextremotolerant bacteria, Cell Therapeutics, Moderately halophilic and Halotolerant Bacteria, ectBC gene, 16S rRNA gene, Gradient PCR*

TEŞEKKÜR

Doktora tezimde Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. İsmail KARABOZ'a başta olmak üzere değerli desteklerinden ötürü tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa ATEŞ'e, jüri üyeleri Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR'e, Doç. Dr. H. Halil BIYIK'a, Doç. Dr. Alev HALİKİ UZTAN'a, Doç. Dr. Evrim ÖZKALE'ye değerli katkı ve önerileri için, beyin fırtınası oluşturarak tür saflaştırmada yaşadığım probleme çözüm bulmama vesile olan Prof. Dr. Osman PARLAK'a, çalışmalarım sırasında teknik destek sağlayan Burçin SAYGILI KARABEY'e ve Caner VURAL'a, Nazenin EFTEKHARİ'e ve FAME analizim sırasında yardımcı olan Melih KORKMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Manevi desteklerinden ötürü Doç. Dr. Alev Haliki UZTAN'a, Doç. Dr. H. Tansel YALÇIN ve Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR'a teşekkürlerimi sunarım. İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan örnek almama olanak sağlayan Billur Tuz A.Ş Genel Müdürü Çağatay TULUNAY'a ve yardımcısı Özgür Bey'e teşekkür ederim. Örnek almaya giderken bana eşlik eden Müzeyyen UĞUR'a teşekkür ederim. Konya Meke Gölü'nden örnek almamda bana yardımcı olan Erhan YARIMOĞLU'na teşekkürü borç bilirim.

Enzim analizi konusunda birlikte çalıştığım ve destek aldığım Doç. Dr. A. Candaş ADIGÜZEL ZENGİN'e, FAME analizleri konusunda destek aldığım ve birlikte çalıştığım Doç. Dr. Gökhan ZENGİN'e teşekkür ederim. Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR, Doç. Dr. Melike BOR ve Doç. Dr. Hediye SÖKMEN ESEN'e teşekkür ederim. Değerli arkadaşlarım Seher YOLCU, Barış UZİLDAY, Rengin ÖZGÜR UZİLDAY, Tuna KARAYTUĞ, Figen ÖZYILDIZ ve Yasemin GÜZEL'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında bana destek olan hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak bugüne kadar büyük özverilerle beni büyüten, okutan, iyi, başarılı ve topluma faydalı bir birey olmama vesile olan Sevgili Aileme sonsuz teşekkür ederim. Ablalarım Meral TEKİN ve Asuman TEKİN'e, kardeşim Esin TEKİN'e yaşamım boyunca her türlü özveride bulunarak bugünkü başarıma ulaşmamda beni her anlamda sınırsız desteklemelerinden ve bilimsel gelişmeme çok büyük katkıda bulunmalarından ötürü sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora sırasında çeşitli eğitimlere katılımımı destekleyen TUBİTAK kurumuna, DNA sekans analizini gerçekleştiren IYTE-BIYOMER'e, Tez Projesini destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Şube Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xlii
SİMGELER VE KISALTMA DİZİNİ.....	xlvi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Halofilik Mikroorganizmalar Hakkında Genel Bilgiler.....	4
2.1.1 Halofilik mikroorganizmaların literatüre girişi.....	4
2.1.2 Halofilik mikroorganizmaların sınıflandırılması.....	8
2.1.3 Ozmoadaptasyon.....	8
2.1.4 Sodyum ve Potasyum iyonlarının hücre içi trafiği ve önemi.....	11
2.1.5 Hücreler tarafından üretilen biyoyumlu molekül çeşitleri.....	13
2.1.6 Biyoyumlu molekül olan ektoinin ilk ortaya çıkışı.....	15
2.1.7 Ektoin molekülünün kimyasal özellikleri.....	17

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.1.8 Ektoin gen bölgesine sahip genomlar.....	18
2.1.9 Sistem biyolojisi yaklaşımıyla ektoin üretimi.....	18
2.1.10 Ektoin degradasyon yol izi.....	19
2.1.11 Ektoin sentaz genleri.....	19
2.1.12 Ektoin üretim denemeleri.....	20
2.1.13 Ektoin biyosentezinin transkripsiyonel regülasyonu.....	21
2.1.14 Kimyasal şaperonlar olarak ozmotlitlerin değerlendirilmesi.....	23
2.1.15 Diğer ozmolitlerin uygulama alanları.....	24
2.2 Çevresel İzolatların Ait Olduğu Taksonomik Gruplar.....	25
2.2.1 <i>Halomonas</i> sp. genel özellikleri.....	25
2.2.2 <i>Halomonas janggokensis</i> türünün genel özellikleri.....	27
2.2.3 <i>Salinivibrio</i> sp. genel özellikleri.....	28
2.2.4 <i>Salinivibrio</i> sp. FAM 10 suşunun genel özellikleri.....	29
2.2.5 <i>Pantoea</i> sp. genel özellikleri	29

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.6 <i>Pantoea agglomerans</i> ve <i>Pantoea agglomerans</i> KB38 suşunun	
genel özellikleri.....	30
2.2.7 <i>Bacillus</i> sp., <i>Oceanobacillus</i> sp., <i>Virgibacillus</i> sp. taksonomik	
özellikleri	31
2.2.8 <i>Bacillus sensu lato</i> grubu	33
2.2.9 <i>Bacillus</i> sp. HZ03 ve <i>Bacillus</i> sp. MH05.....	33
2.2.10 <i>Bacillus hwajinpoensis</i>	33
2.2.11 <i>Oceanobacillus</i> sp. genel özellikleri.....	34
2.2.12 <i>Oceanobacillus iheyensis</i>	35
2.2.13 <i>Oceanobacillus kimchii</i> X50.....	36
2.2.14 <i>Virgibacillus</i> sp. genel özellikleri.....	36
2.2.15 <i>Virgibacillus marismortui</i>	38
2.2.16 <i>Kocuria</i> sp. genel özellikleri.....	39
2.2.17 <i>Kocuria rosea</i>	40
2.2.18 <i>Streptomyces smyrnaeus</i> gen. nov. genel özellikleri.....	41
2.3 Poliektremofiller.....	41

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4 Tür tanımlaması.....	45
3. MATERYAL METOD.....	46
3.1 Halofilik Mikroorganizma İzolasyon Kaynakları.....	46
3.2 İzmir Çamaltı Tuzlası, Meke Gölü Örnekleri ile Ticari Salamura Tuz Örneklerinden Halofilik Bakteri İzolasyon ve Saflaştırma Metodları.....	49
3.3 İzmir Kuş Cenneti Örneklerinden Halofilik Bakteri İzolasyon ve Saflaştırma Metodları.....	49
3.4 Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	51
3.4.1 SW-25 besiyeri (% w/v).....	51
3.4.2 % 17,8 (w/v) NaCl içeren HM besiyeri.....	51
3.4.3 % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyeri	52
3.4.4 % 10 (w/v) total tuz içeren MH besiyeri (g/L).....	52
3.4.5 % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyeri.....	53
3.4.6 Difco™ Marine Agar 2216 (g/L).....	53
3.5 Gram Boyama.....	54
3.5.1 Gram boyama metodu.....	54
3.6 Biyokimyasal Testler.....	55

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.6.1 Kültür ortamı.....	55
3.6.2 Katalaz testi.....	55
3.6.3 Oksidaz testi.....	56
3.6.4 Nitrat indirgenmesi.....	56
3.6.5 Kazein hidrolizi.....	57
3.6.6 Nişasta hidrolizi.....	58
3.6.7 DNaz üretimi.....	58
3.6.8 Tribütirin agar ile lipaz testi.....	59
3.6.9 Lizin dekarboksilaz testi.....	59
3.6.10 Ornitin dekarboksilaz testi.....	60
3.6.11 Arginin dekarboksilaz testi.....	60
3.6.12 Fenilalanin deaminasyonu.....	60
3.6.13 H ₂ S üretimi.....	61
3.6.14 Tek karbon kaynağında asit ve gaz oluşum testleri.....	61
3.6.15 Azot kaynakları testi.....	62
3.6.16 Antimikrobiyal duyarlılık testleri.....	63

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.6.17 Farklı total tuz konsantrasyonlarında büyüme testi.....	63
3.6.18 Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren katı besiyerlerinde büyüme testi.....	64
3.6.19 Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren sıvı besiyerlerinde büyüme testi.....	64
3.6.20 Farklı pH’da büyüme testi.....	65
3.6.21 Tirozin aminoasitinin hidroliz testi ve pigment oluşumu.....	65
3.7 Genomik DNA Ekstraksiyonu.....	66
3.7.1 Invitrogen Purelink Genomik DNA ekstraksiyon kit içeriği.....	66
3.7.2 Genomik DNA ekstraksiyonu öncesi hazırlık aşaması.....	66
3.7.3 Genomik DNA ekstraksiyonu.....	67
3.7.4 Agaroz jel elektroforezi.....	68
3.7.5 Primer tasarımı.....	69
3.7.6 Ektoin sentaz (<i>ectBC</i>) gen bölgesi PCR koşulları.....	72
3.7.7 DNA miktarının hesaplanması.....	78
3.7.8 PCR sonrası jelde görüntülenmesi.....	79

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.7.9 DNA dizi analizi.....	79
4. BULGULAR.....	80
4.1 Tez Kapsamında Toplanan Örnekler.....	80
4.2 Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Büyüme Durumuna Göre İzolatların Seçilmesi.....	85
4.3 Seçilen İzolatların Gram Boyama Görüntüleri ve Petrideki Görünümleri.....	87
4.4 Biyokimyasal test sonuçları.....	90
4.4.1 Oksidaz testi.....	90
4.4.2 Katalaz testi.....	91
4.4.3 Nitrat indirgenmesi test sonuçları.....	91
4.4.4 Proteaz enzim taraması sonucu.....	93
4.4.5 Nişasta hidroliz testi.....	94
4.4.6 DNaz Testi.....	96
4.4.7 Lipaz testi.....	97
4.4.8 Lizin dekarboksilaz testi.....	98
4.4.9 Arginin dekarboksilaz testi sonuçları.....	98

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.4.10 Ornitin dekarboksilaz testi sonuçları.....	98
4.4.11 Fenil alanin deaminasyon testi	99
4.4.12 Triple sugar iron agar'da büyüme testi ve H ₂ S oluşumu.....	99
4.4.13 Tek karbon kaynağı testinde asit, gaz ve büyüme testi sonucu.....	100
4.4.14 Tek azot kaynağında büyüme testi sonuçları.....	104
4.4.15 Antibiyotik duyarlılık test sonuçları.....	105
4.4.16 Farklı NaCl konsantrasyonu testi.....	108
4.4.17 Yarı katı agarda hareketlilik testi.....	114
4.4.18 Farklı pH'larda büyüme testi.....	114
4.4.19 Farklı pH'da büyüme testi sonuçları.....	117
4.4.20 Farklı sıcaklıklarda büyüme testi sonuçları.....	118
4.4.21 Tirozin hidrolizi.....	120
4.5 Genetik Tanı Sonuçları.....	121
4.5.1 Genomik DNA saflığının belirlenmesi.....	121
4.5.2 Genomik DNA ekstraksiyonunun agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.....	121

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.5.3 16S rRNA gen bölgesinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi.....	122
4.5.4 Ektoin sentaz gen bölgesi tayini için genomik DNA izolasyonu.....	122
4.5.5 Ektoin gen bölgesi taraması için genomik DNA izolasyonu nanodrop değerleri.....	123
4.5.6 Ektoin gen bölgesi taraması için gradient PCR Planı.....	123
4.5.7 Ektoin gen bölgesi taraması için gradient PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi.....	124
4.5.8 Ektoin gen bölgesi taraması için gradient PCR sonucu.....	125
4.5.9 Ektoin sentaz gen bölgesi için gradient PCR sonucunun tekrarlanması.....	125
4.5.10 DNA dizi analizi sonuçları.....	128
4.5.11 NCBI-BLAST sonuçlarına göre en yüksek benzerlik gösteren türler.....	148
4.5.12 NCBI'dan alınan izolatlar için 16S rRNA gen bölgesi erişim numaraları.....	149
4.5.13 Filogenetik ağaç.....	150
4.5.14 Tasarlanan primerlere göre ektoin üreticisi olduğu tespit edilen izolatlar.....	152

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.6 Tüm İzolatların Fenotipik ve Biyokimyasal Özelliklerine İlişkin Sonuçlar.....	153
5. TARTIŞMA.....	154
5.1 Örneklerin Toplanması ve Seçimi.....	154
5.2 Biyokimyasal Testlerin Değerlendirilmesi.....	157
5.3 Antibiyotik Dirençliliklerinin Değerlendirilmesi.....	163
5.4 Çamaltı Tuzlası'ndan Bugüne Kadar İzole Edilmiş Halofilik Bakteriler.....	164
5.5 Tip Tür Karşılaştırmaları ve Tür Tanısının Sonuçlandırılması.....	165
5.5.1 CT-2, CT-3, CT-4 izolatlarının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması.....	165
5.5.2 CS-5 ve KC-101 izolatlarının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması.....	167
5.5.3 CT-5 izolatının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması.....	169
5.5.4 CT-6 izolatının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması.....	170
5.5.5 CS-4 izolatının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması.....	171
5.5.6 HT-9 izolatının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması.....	172
5.5.7 KC-2R izolatının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması.....	173
5.5.8 16S rRNA gen bölgelerinin karşılaştırılması.....	174

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5.6 Genel Değerlemeler.....	177
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	180
ÖZGEÇMİŞ.....	203

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 (a) İzmir Çamaltı Tuzlası ve İzmir Kuş Cenneti uydu görünümü 1. Bölge: Örnek alınan İzmir Kuş Cenneti tuzlu su havuzu, 2. Bölge: Örnek alınan İzmir Kuş Cenneti tuzlu su havuzu, 3. Bölge: Örnek alınan İzmir Çamaltı Tuzlası tuzlu su havuzu. (b) Örnek alınan Meke Gölü görünümü (Temmuz 2011).....	47
3.2 İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan toplanan (a) tuz yığını ve (b) tuzlu su örnekleri.....	48
3.3 İzmir Kuş Cenneti tuzlu su havuzlarından toplanan I. Bölge ve II. Bölgeye ait su örnekleri	48
4.1 Çeşitli tuz örneklerinden halofilik bakteri izolasyonu (HT, Himalaya Tuzu; CT Çamaltı Tuzlası tuz yığını; CK, Cihanbeyli Konya ticari salamura tuz; CS, Çamaltı Tuzlası su örneği; MG, Meke Gölü tuz örneği; MS, Meke Gölü Su Örneği; BT Billur Tuz ticari salamura tuz; DA, Denizli Acıgöl ticari salamura tuz örneği).....	80
4.2 İzmir Kuş Cenneti tuzlu su örneklerinin SW-25 sıvı besiyerlerinde inkübasyon sonuçları.....	80
4.3 İzmir Kuş Cenneti tuzlu su örneklerinin SW-25'ten MH katı besiyerine ilk çizgi ekimleri.....	81
4.4 İzmir Kuş Cenneti tuzlu su örneklerinden izole edilen izolatların MH katı besiyerine çizgi ekimleri.....	81
4.5 İzmir Kuş Cenneti tuzlu su örneklerinden izole edilen izolatların MH katı besiyerine çizgi ekimleri.....	82
4.6 Hılamaya Tuzundan (HT) sırasıyla 10^{-2} 'lık petride koloni görünümü ve % 5 total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C'de 6 gün inkübasyon sonucu.....	82

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.7 Hilamaya Tuzu (HT) seyreltme petrilerinden çizgi ekimi örnekleri ve % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C’de 3 gün inkübasyon sonucu.....	83
4.8 Çamaltı Tuzlası tuz yığınının (CT) 10 ⁻⁴ ’lük petriden koloni görünümü ve % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C’de 6 gün inkübasyon sonucu.....	83
4.9 Çamaltı Tuzlası tuz yığınının (CT) % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C’de, 3 gün seyreltme petrilerinden çizgi ekimi sonucu..	83
4.10 Çamaltı Tuzlasından tuzlu su örneğinden (CS) 10 ⁻³ ‘lük petride koloni görünümü % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C’de 6 gün inkübasyon sonucu.....	84
4.11 Cihanbeyli-Konya (CK) ticari salamura tuz örneğinden (a) 10 ⁻⁵ ‘lik petride koloni görünümü, % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C’de 7 gün inkübasyon sonucu (b) % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerine çizgi ekimi 30 °C, 3 gün inkübasyon sonucu.....	84
4.12 Farklı tuz konsantrasyonu içeren MH besiyerlerinde 29 izolattan farklı olanların seçilmesi.....	85
4.13 Farklı tuz konsantrasyonu içeren MH besiyerlerinde 29 izolattan farklı olanların seçilmesi.....	86
4.14 CT-2 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi.....	87
4.15 CT-3 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi.....	87
4.16 CT-4 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.17 CT-5 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi.....	88
4.18 CT-6 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi.....	88
4.19 CS-4 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi.....	89
4.20 CS-5 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi.....	89
4.21 HT-9 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi.....	89
4.22 KC-2 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi.....	90
4.23 KC-101 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi.....	90
4.24 Oksidaz test sonucu (a), (b) Pozitif kontrol <i>Bacillus cereus</i> ve negatif kontrol <i>Staphylococcus aureus</i> 'un oksidaz test sonucu.....	90
4.25 Katalaz testi, pH 7,0 denemesi testinin 37 °C'de 72 saat inkübasyonun ardından H ₂ O ₂ içeren oksijenli suyun koloni üstüne damlatılması.....	91
4.26 CT-2, CT-3, CT-4 izolatlarının ve negatif kontrol grubunun soldan sağa sırasıyla aerobik ve anaerobik tüplerinin nitrat indirgenmesi test sonuçları.....	91
4.27 CT-5, CT-6, CS-4 izolatlarının ve negatif kontrol grubunun soldan sağa sırasıyla aerobik ve anaerobik tüplerinin nitrat indirgenmesi test sonuçları.....	92
4.28 CS-5, HT-9, KC-2, KC-101 izolatlarının ve negatif kontrol grubunun soldan sağa sırasıyla aerobik ve anaerobik tüplerinin nitrat indirgenmesi test sonuçları.....	92

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.29 Proteaz enzim taraması koloni etrafında oluşan zon çaplarının ölçülmesi (a) Birinci günün ölçüm sonuçları (b) İkinci günün ölçüm sonuçları.....	93
4.30 Amilaz testi için % 5 (w/v) total tuz içeren Nişasta agar besiyerinde 37 °C’de 72 saat büyüme testi sonucu.....	94
4.31 (a) ve (b) Amilaz testi sonucu 37 °C’de 72 saat inkübasyonunun ardından 2 gün +4 °C’de bekletildikten sonra gram iyodür damlatılmış test sonucu.....	94
4.32 Üst fotoğraflar 1, 2, 3, 4 nolu izolatların 37 °C’de 72 saat inkübasyonunun ardından amilaz testi sonuçları. Alt fotoğraflar aynı izolatların paralel petrilerinin 72 saatlik inkübasyonunun ardından 48 saat +4 °C’de tutulduktan sonra amilaz testi sonuçları.....	95
4.33 Üst fotoğraflar 5, 6, 7, 8 nolu izolatların 37 °C’de 72 saat inkübasyonunun ardından amilaz testi sonuçları. Alt fotoğraflar aynı izolatların paralel petrilerinin 72 saatlik inkübasyonunun ardından 48 saat +4 °C’de tutulduktan sonra amilaz testi sonuçları.....	95
4.34 (a) Üst fotoğraflar 9, 10 nolu izolatların 37 °C’de 72 saat inkübasyonunun ardından amilaz testi sonuçları. Alt fotoğraflar aynı izolatların paralel petrilerinin 72 saatlik inkübasyonunun ardından 48 saat +4 °C’de tutulduktan sonra amilaz testi sonuçları. (b) Amilaz testinin pozitif kontrolü <i>Bacillus cereus</i> ve negatif kontrolü <i>S. aureus</i>	96
4.35 MH % 5 (w/v) total tuz içeren DNaz agar test besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonucu petri görünümü.....	96

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.36 Üst şekiller soldan sağa sırasıyla işlem görmemiş DNaz test ortamı; Toluidin Mavisi % 0,05 (w/v) damlatılmış DNaz test ortamı; Alt şekiller soldan sağa 1 N HCl damlatılmış ve 10 dakika bekletilmiş DNaz test ortamı; Metil yeşili içeren besiyerine 1 N HCl damlatılmış ve 10 dakika bekletilmiş test ortamı.....	97
4.37 Lipaz testi için % 5 (w/v) total tuz içeren Tribütirin Agar besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonuçları.....	97
4.38 Lizin dekarboksilaz testi soldan sağa 10 izolat ve kontrol besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonuçları.....	98
4.39 Arginin dekarboksilaz testi soldan sağa 10 izolat ve kontrol besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonuçları.....	98
4.40 Ornitin dekarboksilaz testi soldan sağa 10 izolat ve kontrol besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonuçları.....	98
4.41 CT-4 ve CT-5 izolatlarının Fenilalanin deaminasyon testi 48 saatlik inkübasyon sonuçları.....	99
4.42 Triple sugar iron agarda şeker fermentasyon ve H ₂ S üretim testi 24 saatlik inkübasyon sonuçları.....	99
4.43 Triple sugar iron agarda CS-5 izolatının ve kontrol besiyerinin şeker fermentasyon ve H ₂ S üretim testi 24 saatlik inkübasyon sonuçları.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.44	Tek karbon kaynağında büyüme, asit ve gaz oluşum testi. Soldan sağa sırasıyla 1. tüp: Kontrol besiyeri, 2. tüp: L-arabinoz'da büyüme testi asit pozitif gaz negatif sonucu, 3. tüp: 9 nolu izolata ait D-fruktozda asit pozitif gaz negatif sonucu, 4.tüp: 10 nolu izolata ait D-fruktozda asit pozitif gaz negatif sonucu, 5. tüp: 10 nolu izolatin D-mannitolde asit ve gaz negatif büyüme pozitif sonucu 6.tüp: 9 nolu izolatin D-mannozda asit pozitifle negatif arası gaz pozitif büyüme sonucu.....100
4.45	Tek karbon kaynağı olarak D-ribozda büyüme, asit ve gaz oluşum testi. Soldan sağa sırasıyla; 1. tüp: kontrol besiyeri, diğer tüpler sırasıyla 6, 7, 8, 9, 10 nolu izolatların 5 günlük inkübasyonları sonucu büyüme durumları pozitif, asit oluşumu sadece 9 ve 10 nolu izolatlarda pozitif sonucu.....100
4.46	D-mannozda sırasıyla 6, 7, 8, 9, 10 nolu izolatların büyüme, asit ve gaz oluşum testi sonuçları.....101
4.47	CT-2 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları; sırasıyla arka sırada kontrol besiyeri, ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Sorbitol, Maltoz, Melibiyoz, Sükroz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.....101
4.48	CT-3 izolatına ait karbon kaynağı testi sonuçları; sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Glukoz, Sorbitol, Sitrat, Maltoz, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.....101
4.49	CT-4 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları; sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.....102

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.50	CT-5 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları; sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.....102
4.51	CT-6 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları; sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.....102
4.52	CS-4 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.....103
4.53	CS-5 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.....103
4.54	HT-9 izolatına ait karbon kaynakları testi sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.....103
4.55	KC-2 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.....104

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.56 KC-101 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları sırasıyla arka sırada Laktoz, ön sırada sırasıyla soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.....	104
4.57 KC-101 izolatının azot kaynakları test besiyerinde soldan sağa sırasıyla kontrol besiyeri, Asparagin, Arginin, Metiyonin, Valin, İzolösin içeren test besiyerlerinde inkübasyon sonuçları.....	104
4.58 KC-2 izolatının azot kaynakları test besiyerinde soldan sağa sırasıyla; kontrol besiyeri, Treonin, Asparagin, Lizin, Metiyonin, Serin içeren test besiyerlerinde inkübasyon sonuçları.....	105
4.59 CT-2 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları.....	105
4.60 CT-3 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları.....	106
4.61 CT-4 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları.....	106
4.62 CT-5 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları.....	106

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.63 CT-6 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları.....	106
4.64 CS-4 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları.....	107
4.65 CS-5 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları.....	107
4.66 HT-9 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları.....	107
4.67 KC-2 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları.....	107
4.68 KC-101 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları.....	108
4.69 % 0 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları.....	108
4.70 % 0,5 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları.....	109

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.71 % 1 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları.....	109
4.72 % 1,5 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları.....	109
4.73 % 2 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları.....	110
4.74 % 2,5 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları.....	110
4.75 % 12,5 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları.....	110
4.76 % 15 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları.....	111
4.77 % 15 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon ışıkta görünümü.....	111
4.78 % 19 (w/v) NaCl içeren Nutrient broth ortamında sıvı kültürde büyüme testi sonuçları.....	111
4.79 % 20 (w/v) NaCl içeren Nutrient broth ortamında sıvı kültürde büyüme testi sonuçları.....	112
4.80 % 21 (w/v) NaCl içeren Nutrient broth ortamında sıvı kültürde büyüme testi sonuçları.....	112

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.81 % 22 (w/v) NaCl içeren Nutrient broth ortamında sıvı kültürde büyüme testi sonuçları.....	112
4.82 % 25 (w/v) NaCl içeren Nutrient broth ortamında sıvı kültürde büyüme testi sonuçları.....	113
4.83 % 10, 12,5, 15, 16, 17, 18, 19 (w/v) NaCl konsantrasyonlarında 5 nolu izolatın 5 günlük büyüme durumu (Büyümeyen izolatların tekrar edilmesi).....	113
4.84 % 10, 12,5, 15, 16, 17, 18, 19 (w/v) NaCl konsantrasyonlarında 6 nolu izolatın 5 günlük büyüme durumu (Büyümeyen izolatların tekrar edilmesi).....	113
4.85 Yarı katı agarda hareketlilik testi sonuçları.....	114
4.86 pH 9-11 arasında 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonuçları.....	114
4.87 pH 11’de 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonucunun ışık altında görünümü.....	115
4.88 pH 11 ve pH 10’da 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonuçları.....	115
4.89 pH 10 ve pH 9’da 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonuçları.....	115
4.90 pH 9 ve pH 8’de 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonuçları.....	116
4.91 pH 8 ve pH 7’de 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonuçları.....	116
4.92 pH 7 ve pH 6’de 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonuçları.....	116

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.93	pH 5'te 37 °C'de 72 saatlik büyüme testi sonuçları.....117
4.94	(a), (b), (c), (d), (e), (f)'de sırasıyla pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10 ve pH 11'de büyüme test sonuçları verilmiştir. (a), (b), (c), (d), (e), (f)'de gösterilen petri ler buzdolabında bekletildikten sonra fotoğrafı çekilmiş ve soğukta pigment oluşturdıkları görülmüştür. F'nin analizi daha sonra yapılmış olup soğukta bekletilmemiştir ve pigment oluşumu gözlenmemiştir. % 5 (w/v) total tuz içeren MH broth 37 °C'de 2 gün inkübe edilmiştir.....117
4.95	4 °C'de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 24 saatlik büyüme testi sonuçları.....118
4.96	20 °C'de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 72 saatlik büyüme testi sonuçları.....118
4.97	30 °C'de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 24 saatlik büyüme testi sonuçları.....118
4.98	45 °C'de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 24 saatlik büyüme testi sonuçları.....119
4.99	50 °C'de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 24 saatlik büyüme testi sonuçları.....119
4.100	55 °C'de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 24 saatlik büyüme testi sonuçları.....120
4.101	(a)- 1, 2, 3, 4 nolu izolatlar (b)- 5, 6, 7, 8 nolu izolatlar (c)- 9, 10 nolu izolatların tirozin hidroliz test sonuçları.....120

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.102 % 1'lik (w/v) agaroz jelde (1X TBE pH 8,0) genomik DNA'ların yürütülmesi. 1. kuyucuk: Fermentas Markır (5000 bp), 2. CT-2, 3. CT-3, 4. CT-4, 5. CT-5, 6. CT-6, 7. CS-4, 8. CS-5, 9. HT-9, 10. KC-2. Not: KC-101 yüklenmemiştir.....	121
4.103 % 1,8 (w/v) agaroz jelde (1X TBE pH 8,0) 16S rRNA geni PCR ürünlerinin yürütülmesi. Markır: Invitrogen (100 bp DNA ladder 100-2072 bp arası) Üst jel soldan sağa sırasıyla 1. kuyucuk CT-2, CT-3, CT-4, CT-5, CT-6, CS-4, 7. kuyucuk markır. Alt Jel: 1. kuyucuk markır, CS-5, HT-9, KC-2, KC-101, son kuyucuk negatif kontrol.....	122
4.104 Genomik DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi. Sırasıyla ilk kuyucuklar markır (100 bp Invitrogen 100-2072 bp arası). İkinci kuyucuklar boş, sonraki kuyucuklar sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5 nolu izolatlar üst jelde, alt jelde ise 6, 7, 8, 9, 10 nolu izolatlar yüklenmiştir.....	122
4.105 Yükleme sırası ilk 32; 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder (Invitrogen) (100-2072 bp arası) 2. kuyucuk 5-1, 40 °C, 42 °C, 44 °C, 46 °C; 6. kuyucuk 6-1 40 °C, 42 °C, 44 °C, 46 °C, 10. kuyucuk 7-1 40 °C, 42 °C, 44 °C, 46 °C ; 4-40 °C, 42 °C, 44 °C, Alt jel 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder (Invitrogen) 2. kuyucuk 4-46 °C, 10-1 40 °C, 42 °C, 44 °C, 46 °C, 48 °C, 7-1 48 °C, 7-2 50 °C, 7-2 52 °C, 7-2 54 °C, 7-2 56 °C, 1-16S 58 °C, 9-16S 58 °C, Negatif kontrol 58 °C, 7-2 62 °C.....	124

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.106 İkinci 32 yükleme sırası: 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder (Invitrogen) (100-2072 bp arası) 2. kuyucuk, 2- 48 °C, 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C; 8. kuyucuk 7-2-58 °C, 60 °C, 10. kuyucuk 10-2 50 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C; 16. kuyucuk 8- 50 °C, Alt Jel ise 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder (Invitrogen), 2. kuyucuk 8- 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C, 7. kuyucuk 9- 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C, 14. kuyucuk negatif kontrol, 15. kuyucuk CT-2 (16S) 58 °C, 16. kuyucuk KC-2 (16S) Pozitif kontrol 58 °C.....	124
4.107 Üst jelde 1 ve 16. kuyucuklarda 100 bp DNA ladder (Invitrogen) 7. 8. 9. kuyucuklarda 5 numaralı örneğe ait bant zayıf pozitif, alt jelde 1 ve 9. kuyucuklar markır 8. kuyucuk (16S rRNA geni) enzim için pozitif kontroldür. 7 (52 °C), 7 (56 °C), 7 (60 °C), 8 (52 °C), 8 (56 °C), 8 (60 °C), 9 (52 °C), markır, 10-2 (52 °C), 10-2 (60 °C), 10-2 (52 °C), 10-2 (56 °C), 10-2 (60 °C), 1 (52 °C), 2 (44 °C), 2 (48 °C), 2 (52 °C), 2 (56 °C) sonuç negatif çıkmıştır.....	125
4.108 % 2 (w/v) agaroz jelde gradient PCR tekrarının yürütülmesi. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder (Invitrogen) 5- (44 °C) 5- (48 °C) 5- (52 °C), 12 µl yüklenmiştir.....	126
4.109 % 1,8 (w/v) agaroz jelde gradient PCR pozitif sonuçlarının tekrar yürütülmesi. Markır (1 kb NEB), sırasıyla 2. kuyucuk: 5-1, 3. kuyucuk: 7-2 4. kuyucuk 7-1, 5. kuyucuk: 8, 6. kuyucuk: 9 nolu izolatlar 50'şer µl yüklenmiştir.....	126

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.110 % 1,5 (w/v) agaroz jelde gradient PCR sonuçlarının tekrar yürütülmesi. 1. kuyucuk: 100 bp DNA ladder (Invitrogen), 2. kuyucuk: 7-2, 3. kuyucuk: 9, 4. kuyucuk: 10-2, 5. kuyucuk: 10-1, 6. kuyucuk: 2, Alt jel 1. kuyucuk: markır, 2. kuyucuk: 6-1, 3. kuyucuk: 4, 4.kuyucuk: 2, 5. kuyucuk: 16S rRNA geni (1 nolu izolata ait pozitif kontrol. Pozitif kontrol haricinde örnekler 50'şer µl yüklenmiştir.....	127
4.111 CT-2'nin F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	128
4.112 CT-2'nin R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	129
4.113 CT-3'nin F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	130
4.114 CT-3'nin R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	131
4.115 CT-4'nin F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	132
4.116 CT-4'nin R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	133
4.117 CT-5'in F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	134
4.118 CT-5'in R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	135

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.119 CT-6'in F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	136
4.120 CT-6'in R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	137
4.121 CS-5'in F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	138
4.122 CS-5'in R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	139
4.123 CS-4'ün F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	140
4.124 CS-4'ün R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	141
4.125 HT-9'un F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	142
4.126 HT-9'un R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	143
4.127 KC-2'nin F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	144
4.128 KC-2'nin R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	145

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.129 KC-101'in F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	146
4.130 KC-101'in R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı.....	147
4.131 Taksonlar arası evrimsel ilişki NCBI sonuçlarına göre en benzer çıkan türlerin 16S rDNA gen dizileri ile eldeki izolatların 16S rRNA gen dizileri MEGA6 (Tamura et al., 2013) programıyla analiz edilmesi sonucu çizilen filogenetik ağaç. Bu programa göre Neighbor-Joining metodu kullanılarak evrimsel geçmiş analiz edilmektedir (Saitou and Nei, 1987). Evrimsel uzaklıklar Maximum Composite Likelihood metodu kullanılarak hesaplanmıştır (Tamura et al., 2004). Optimum ağaç dal uzunluğunun toplamı 0.98023979'dur. Evrimsel uzaklığı belirlemek için aynı birimlerdeki dal uzunlukları kullanılarak ağaç skala üzerine çizilmiştir ve birim baz değişimleri birimi olarak gösterilmiştir. Analiz sırasında boşluk içeren ve kayıp tüm data'lar elimine edilmiştir. Son data setinde toplam 774 pozisyon bulunmaktadır.....	150
4.132 Taksonlar arası filogenetik ağaç çizimi. Neighbour Joining metodu (Saitou and Nei, 1987) ile analiz sırasında bootstrap testi (1000 replikat) de yapılarak sonuçları birbiriyle ilişkili taksonların birlikte kümelenmelerini gösteren replike ağaçların yüzdesi olarak ağaçta gösterilmektedir (Felsenstein, 1985). Ağaç skala üzerine çizilmiş olup, dal uzunluğu evrimsel uzaklığı göstermektedir. Evrimsel uzaklık, Maximum Composite Likelihood metodu ile hesaplanmıştır (Tamura et al., 2004). 100 birim nükleotid başına değişim gösteren nükleotid sayısı olarak ölçeklendirilmiştir. Analizde 58 nükleotid dizisi kullanılmıştır. % 95'den az coverage gösteren bölgeler elimine edilmiştir. % 5'ten az alignment gap'ler, kayıp veriler, belirsiz bazlar kısmi delesyonla elimine edilmiştir. Final verisetinde toplam 1295 pozisyon vardır. MEGA6 ile analiz edilmiştir (Tamura et al., 2013).....	151

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.1 Taksalar arası evölüsyonel benzerlik.....	167
5.2 16S rRNA gen bölgelerinin Minimum Evolusyon metodu (Rzhetsky and Nei, 1992) ile karşılaştırılması sonucu MEGA6 programında çizilen filogenetik ağaç.....	176

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların gelişebildiği optimum NaCl aralıkları.....	8
2.2 Doğada çeşitli organizmalara ait hücreler tarafından biriktirilen biyoyumlu molekül örnekleri.....	14
2.3 Çeşitli mikroorganizmalardan Ektoin üretim çalışmalarına örnekler.....	21
2.4 Ektoin molekülünün koruyucu etkileri üzerine yapılan literatür çalışmalarına örnekler.....	22
2.5 Ekstremofillerin büyüme karakteristikleri.....	43
3.1 Saflaştırma yapılan tuz kaynaklarına ilişkin bilgiler.....	46
3.2 Çalışmada kullanılan primer listesi.....	70
3.3 Primer sulandırma.....	70
3.4 PCR reaksiyon koşulları.....	71
3.5 Gradient PCR reaksiyon koşulları.....	71
3.6 16S rRNA gen bölgesi PCR koşulları.....	72
3.7 <i>Bacillus alcalophilus ectBC</i> spesifik primeri F2-R2 kullanılarak yapılan PCR koşulları.....	72
3.8 <i>Bacillus alcalophilus ectBC</i> spesifik primeri F2-R2 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları.....	72

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.9 <i>Salinivibrio costicola</i> <i>ectBC</i> spesifik primeri F1-R1 kullanılarak yapılan PCR koşulları.....	73
3.10 <i>Salinivibrio costicola</i> <i>ectBC</i> spesifik primeri F1-R1 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları.....	73
3.11 <i>Virgibacillus pantothenicus</i> <i>ectBC</i> spesifik primeri F3-R3 kullanılarak yapılan PCR koşulları.....	74
3.12 <i>Virgibacillus pantothenicus</i> <i>ectBC</i> spesifik primeri F3-R3 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları.....	74
3.13 <i>Oceanobacillus</i> <i>ectBC</i> spesifik primeri F4-R4 kullanılarak yapılan PCR koşulları.....	75
3.14 <i>Oceanobacillus</i> <i>ectBC</i> spesifik primeri F4-R4 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları.....	75
3.15 <i>Halomonas</i> <i>ectBC</i> spesifik primeri F5-R5 kullanılarak yapılan PCR koşulları.....	76
3.16 <i>Halomonas</i> <i>ectBC</i> spesifik primeri F5-R5 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları.....	76
3.17 <i>Chromohalobacter</i> <i>ectBC</i> spesifik primeri F6-R6 kullanılarak yapılan PCR koşulları.....	77
3.18 <i>Chromohalobacter</i> <i>ectBC</i> spesifik primeri F6-R6 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları.....	77
3.19 Gradient PCR Tekrarı.....	78

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.20 OneTaq Hot start enzimi için PCR Reaksiyonu.....	78
4.1 Farklı tuz örneklerinden seyreltme plaka tekniği ile sayım sonuçları.....	85
4.2 Seçilen 29 izolatin MH % total tuz konsantrasyonlarında büyüme testi sonuçları.....	86
4.3 Seçilen 10 izolata ve toplandıkları bölge alındıkları tarih ve kodlarına ilişkin verilerin listesi.....	87
4.4 Günlük proteaz enzim zon çaplarının ölçülmesi.....	94
4.5 Azot kaynakları testi sonuçları.....	105
4.6 Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları.....	108
4.7 16S rRNA gen analizi için Genomik DNA'nın Nanodrop değerleri.....	121
4.8 Ektoin sentaz gen bölgesi için Genomik DNA'nın Nanodrop değerleri..	123
4.9 Ektoin gen bölgesi taraması için gradient PCR Planı.....	123
4.10 Ektoin gen bölgesi taraması için gradient PCR sonucu.....	125
4.11 NCBI-BLAST sonuçlarına göre en yüksek benzerlik taşıyan türler.....	148
4.12 NCBI'dan alınan izolatlara ait 16S rRNA gen bölgesi erişim numaraları.....	149
4.13 İzolatların geçici kodları, gerçek kodları, benzerlikleri ve ektoin sentaz geninin saptanması bakımından değerlendirilmesi.....	152

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

4.14	Bu çalışmadaki izolatlarla ait bazı fenotipik ve biyokimyasal özelliklerin karşılaştırılması. 1, <i>Bacillus</i> sp. CT-2 suşu; 2, <i>Bacillus</i> sp. CT-3 suşu; 3, <i>Bacillus</i> sp. CT-4 suşu; 4, <i>Virgibacillus</i> sp. CT-5 suşu; 5, <i>Kocuria</i> sp. CT-6 suşu; 6, <i>Pantoea</i> sp. CS-4 suşu; 7, <i>Halomonas</i> sp. CS-5 suşu; 8, <i>Oceanobacillus</i> sp. HT-9 suşu; 9, <i>Salinivibrio</i> sp. KC-2 suşu; 10, <i>Halomonas</i> sp. KC-101 suşu.....	153
------	---	-----

SİMGELER VE KISALTMA DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
HM sıvı besiyeri	(<i>Halophile moderately</i>) sıvı besiyeri
w/v	(ağırlık/hacim)
SW-25	Sea Water-25 (% 25 (w/v) total tuz içeren besiyeri)
MH besiyeri	(<i>Moderately halophilic</i>) besiyeri
EPS	Ekzopolisakkarit
v/v	(hacim/hacim)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
RNaz	Ribonükleaz
Enhansır	PCR reaksiyonu sırasında DNA'ya bağlanmayı kolaylaştırıcı madde
UV	Ultraviyole
LALIGN	Çoklu dizileme ile gen bölgelerini karşılaştırma programı
GC oranı (% mol)	Genomik DNA'nın içerdiği Guanin+Sitozin oranı

1. GİRİŞ

Sağlık alanında yeni ilaçların keşfi her dönem insanlık tarihi boyunca gerekli olmuştur. Çağımızda teknolojinin hızla gelişmesi ile beraber, üretilen pek çok hassas ölçüm teknikleri ve bilgi birikimi sayesinde sağlık alanında önemli sayılabilecek moleküllerin keşfi için Mikrobiyoloji biliminin önemi ve bu bilim içinde yaşamın ilksel dönemlerinden beri oluşmuş olan zor şartlara uyum sağlamış Ekstremofilik mikroorganizmaların araştırılması yakın geçmişte oldukça önemli bir yere gelmiştir. Bu çalışmamızda da yüksek tuzda yaşayabilen ve ilaç olma potansiyeli olan hücre içi metabolitlerinden Ektoin molekülünü üretebilen türler araştırılmaktadır. Doğal tuzlu habitatlardan ve ticari tuz kaynaklarından potansiyel ektoin üreticisi ılımlı halofilik ve halotolerant karakterde yeni türlerin keşfi, Ektoin gen bölgesinin analizi yapılarak potansiyel ektoin üreticisi türlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Günümüzde tıp, kozmetik ve yaşam bilimleri çalışmalarında geniş kullanım olanağına sahip biyoyumlu molekül olarak adlandırılan ektoin molekülü, yüksek tuzlu çevrelerde karşılaştıkları ozmotik stresle başa çıkabilmek adına hücrelerin üretilip biriktirdikleri, sitoplazmalarında suyu yüksek oranda tutabilen ve böylece hiperozmotik ortam koşullarına karşı sitoplazmik suyun hücre dışına difüzyonuna engel olabilen özelliكتedir. Bu molekülün sadece hücre içi suyu tutma kapasitesinin olmadığı aynı zamanda hücresel mekanizmalarla uyumlu olduğu ve biyokimyasal olaylara da olumlu yönde etki ettiği bulunmuştur. Hatta ve hatta bu özelliğı ile insanda meydana gelen suyun eksikliğıne ve denatürasyona bağlı çeşitli hastalıklarda da tedavi edici özellikte olduğu bulunmuştur. Ekstremofillerin insan sağlığına olumlu ve tedavi edici özelliklerinin bulunması bize ekstrem çalışmalarının ne derece faydalı olduğunun da bir göstergesidir.

Ektoinin en belirgin özelliğı ve en dikkat çekici özelliğı hücrede oluşabilecek her türlü denatürasyonla ilişkili ve su kaybıyla ilişkili hasarları ortadan kaldırabilme potansiyeli olan bir hücre koruyucusu olmasıdır.

Galinski et al., (1985) tarafından ilk keşfedildiğı günden günümüze yapılan birçok in vitro ve in vivo analiz sonuçlarına göre bugün proteinleri, nükleik

asitleri, membranları hatta tüm hücreyi yüksek tuza, yüksek sıcaklığa, donmaya, kurumaya, oksijen radikallerine, radyasyona, denatüre edici ajanlar gibi çeşitli stres koşullarının hasar verici etkisine karşı korumakta olduğunu bilmekteyiz. Günümüzde ektoin; alerjik astım, solunum yolları hastalıkları, göz alerjisi, fotoyaşlanmayı önleyici krem, güneş kremi, deri nemlendiricisi olarak kullanılmaktadır.

Alzheimer'ın tedavisinde anti-amiloid terapötik özelliği ile, Prion tedavisinde proteaza dirençli amiloidlerin yeniden katlanmasını sağlaması nedeniyle insan nöroblastoma hücreleri üzerine Prion'un meydana getirdiği toksisiteyi azaltıcı etkisi ile, HIV için potansiyel bir antiviral etkinliği ile, çeşitli kanser ilaçlarının sağlıklı hücrelere olan hasarını önleyebilmesi ile, bakteriyel lipopolisakkaritlerin oluşturduğu hücresel hasarı önleyebilmesi ile son derece önemli bir molekül olduğu bildirilmiştir (Pastor et al., 2010).

Ektoinin insan sağlığı için kayda değer terapötik özelliklerinin yanı sıra, yaşam bilimleri denemelerinde de kullanılabileceği; enzimleri hasar verici etkilerden ve tampon solüsyonları içerisinde sürekli donma-çözme işlemleri ve ısıtma işlemleri ile oluşacak enzim aktivitesi kayıplarından koruyabileceği ve kriyopreservasyon çalışmalarında daha stabil bir çevre yaratma özelliğinde olduğu yine polimeraz zincir reaksiyonunun etkinliğini de artırma özelliğinde olduğu yani biyostabilizatör olarak rol oynadığı bulunmuştur. Ayrıca bitkilerde kuraklığın artışıyla beraber gündeme gelen tuzlu topraklarda bitkilerin yetişmesi için genetik modifiye bitki üretimi konusunda çalışmalar yapılmış ve düşük düzeyde olumlu etkisinin olduğu da bulunmuştur.

Bakterilerden insana kadar organizmalarda hücre içi homeostazisini düzenlemede ve korumada esansiyel bir öneme sahip, geniş uygulama alanı ve sorun çözme potansiyeli olan bir metabolitin eldesi de bir o kadar önemli hale gelmektedir. Almanya'da üretimleri *Halomonas elongata*'dan yapılan bu molekülün üretimlerinin gelişmekte olan ülkemizde de yaygınlaştırılması ve hücre koruyucu bu özelliğin tıpta henüz uygulanmamış hastalık modellerinde kullanılma potansiyellerinin değerlendirilmesi ve ilaç endüstrisinde koruyucu tedavide kullanılma potansiyelinin değerlendirilmesi için bu çalışmanın sonucunda elde

edilecek ektoin üretim potansiyeline sahip yeni türlere ait özelliklerin belirlenmesi ile büyük çaplı üretimler için ileriki çalışmalarda derin bilgi birikimine sahip olunacağı düşünülmektedir.

Bu projenin amacı; İzmir Çamaltı Tuzlası tuzlu su havuzu ve tuz yığını örnekleri, İzmir Kuş Cenneti tuzlu su havuzu örnekleri ve Himalaya ticari salamura tuz örneği gibi çeşitli tuz kaynaklarından ılımlı halofilik ve halotolerant mikroorganizmaları izole edip, saflaştırmak, tür tanımlaması yapıp, potansiyel ektoin üreticisi olup olmadıklarını genetik olarak belirlemektir.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1 Halofilik Mikroorganizmalar Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1 Halofilik mikroorganizmaların literatüre girişi

Yüzyıllardır gıdalarını tuzlayarak koruyan ve bu nedenle de deniz suyunu buharlaştırmak yoluyla tuz elde etmek için yöntem geliştiren insanoğlu zamanla tuzlanmış gıdaların üzerinde oluşan kırmızı rengin tuzdan gelen bir bakteri olduğunu tespit edip, bu durumun saklanan gıdalarda bozulmalara yol açtığının farkına varmıştır (Gibbons, 1969). Ancak bu halk arasında bilinen etmenlerin literatüre girişi yaklaşık olarak 19 yy. ortalarını bulmuştur (Vreeland et al., 1980). Yüksek NaCl konsantrasyonlarında büyüeyebilen ve bu koşullara gereksinim duyan aynı zamanda kırmızı pigment üreten bu organizmaları Gibbons (1969), ekstrem halofilik bakteri olarak adlandırmış ve % 15 (w/v) NaCl'den fazla tuz konsantrasyonlarında yaşayabildiklerini bildirmiştir. Larsen (1967) ise bakterilerin yaşayabildiği NaCl konsantrasyonları bakımından alt ve üst sınır değerlerini tespit ederek düşük, ılımlı ve ekstrem halofiller olarak sınıflandırılabilceğini öne sürmüştür. Kırmızı pigment üreten halofilik bakteriler bu şekilde sınıflandırılmıştır. O dönemlerde yapılan analizlerden biri de halotolerant bakteri kavramını gündeme getiren ve salatalık turşusundan izole ettikleri 21 pigment üretmeyen halotolerant bakteriyi bildiren LeFevre and Round (1919) aynı zamanda kendilerinden önce besinlerde tuzların bakteriyel bozulmaya sebep olduğuna dair çalışmalar olduğunu da yaptıkları makalede bildirmişlerdir. Turşu fermentasyonundan izole ettikleri bu bakterileri; tolere edebildikleri NaCl konsantrasyonları bakımından 5 grup altında sınıflandıran LeFevre and Round (1919), bir grubun % 0-15 (w/v) NaCl arasında yaşayabildiğini diğer dört grubun ise % 5-25 (w/v) NaCl arasında yaşayabildiğini bildirmiştir. Daha sonraları Matheson et al. (1976) tarafından hücre içi madde konsantrasyonları belirlenmiş ancak daha ileri araştırmaları yapılmamıştır (Vreeland et al., 1980). Bunun üzerine Colwell et al. (1979) çok sayıda halofilik bakteri ve halotolerant bakteri gruplarını bir arke olan *Halobacterium* sp. türleriyle karşılaştırıp aralarındaki benzerlik ilişkileri açısından değerlendirmiş ve çok büyük bir benzerlik olmadığını görünce halotolerant bakterileri daha fazla araştırma yoluna gitmişlerdir. Brown (1976), mikrobiyal su stresi başlıklı çalışmasında suyun canlılar için önemini, serbest su

ve bağı su kavramlarını ortaya atarak bağı suyun hücreler tarafından kullanılmayan su anlamına geldiğini doğadaki mikroorganizmaların gelişimini etkileyen en önemli etmenlerden birinin suyun bulunup bulunmaması olduğunu, çevresel ortamlarda özellikle yüksek tuz, yüksek şeker gibi dışarıdaki madde konsantrasyonunun sitoplazmaya göre yüksek olduğu hipertonic ortamlarda su stresiyle karşı karşıya kalan hücrelerin bu stresle başa çıkabilmek için sahip oldukları özellikleri öne sürmüştür. Ve ilk defa hipertonic koşullara maruz kalan canlıların türkçesi biyoyumlu molekül olan *-compatible solute-* adlı molekülleri sitoplazmalarında biriktirebildiklerini, buna karşın ekstrem halofilik arkelerin ise sitoplazmalarında yüksek miktarda KCl biriktirebildiklerini bildirmiştir. Ardından bir diğer önemli gelişme; Vreeland et al. (1980) tarafından halotolerant bakterilerin taksonomik pozisyonları belirlenerek sonunda ilk defa *Halomonas elongata*'nın bilim dünyasına kazandırılması olmuştur. Vreeland et al. (1980) tarafından ilk defa öne sürülen *Halomonas elongata*'nın ekstrem halotolerant olup % 32 (w/v) NaCl içeren besiyerlerinde, pH 5,0-9,0 arasında, 4-45 °C sıcaklık aralıklarında yaşayabildiği aynı zamanda nitratı nitrite indirgeyebilen, oksidaz negatif, katalaz pozitif, ornitin ve lizin dekarboksilaz pozitif ancak fenilalanin deaminasyonu negatif, H₂S negatif, kazein ve nişasta hidrolizi negatif olduğu bildirilmiştir.

Vreeland et al. (1984)'e göre halofilik olmayanlar, düşük derecede halofilikler, ılımlı halofilikler ve ekstrem halofilikler olmak üzere 4 halofilik grubun var olduğunu bildiren Christian and Waltho (1962) açıklamasına ek olarak, Vreeland et al. (1984) kendilerinin identifiye ettikleri halotolerant bakteriden yola çıkarak halotolerant kavramının da diğer 4 gruba eklenmesi gerektiğini ve halotolerantların hem NaCl varlığında hem de yokluğunda yaşayabilen türlerden oluştuğunu bildirmişlerdir.

Arakawa et al. (1985) ise tuzun proteinlerin stabilizasyonu üzerine etkilerini araştırma denemelerine odaklanmış ve kendilerinden önce Yancey et al. (1982) çalışmasından da yola çıkarak bi takım in vitro testler yapmışlardır. Örneğin önceki çalışmada çok sayıda maddenin proteinlerle etkileşerek proteinlerin öncelikli hidrasyonu ile stabilize olduğu öne sürülmüş ve kendi çalışmalarında da yapısal stabilizasyon için şeker, polihidrik alkoller, tuzlar ve belli amino asitlerin

sulu çözeltilerinin aynı mekanizmayla etki ettiğini bir kez daha ortaya koymuşlardır. Bu mekanizmanın proteinlerin bu maddelerle istenmeyen etkileşimleri sonucunda negatif değerler verdiğini nedeninin ise yüzeydeki suyun serbest enerjisinin artması olduğunu böylece suyun yüzey geriliminin arttığını bildirmişlerdir. Gibbs adsorpsiyon izotermine göre bu durumda uygulanan maddenin su-makromolekül ara yüzeyinden uzaklaştığı öne sürülmüştür. Bunun ise termodinamik olarak istenmeyen bir durum olması nedeniyle, Le Chatelier prensibine göre sistemin bu durumu minimize etmeye eğilimli olması gerektiği bildirilmiştir. Bu durumda su-protein ara yüzündeki bölgenin minimizasyonuna doğru bir eğilimle sonuçlanacağı öne sürülmüştür. Doğal haldeki globüler proteinlerin denatüre durumlarına göre daha küçük yüzey alanına sahip olduğu ve bu nedenle de solvent sistemleriyle kontakt haline geçmeleri halinde dengenin doğal halinde kalmaya eğilimli olacağı bildirilmiştir. Böylece doğal yapı stabil kalmış olacağı ve doğal proteinin öncelikli hidrasyon ile etrafında yoğun miktarda su ile kuşatılacağı bildirilmiştir. Valinin diğer katkı maddelerine göre önemli derecede hidrofobik doğası nedeniyle stabilize edici etkisinin olmadığı, büyük polar olmayan yan zinciri nedeniyle denatüre durumdaki proteinin yeni ortaya çıkan polar olmayan kısımlarıyla etkileşime girmesi nedeniyle doğal globüler proteinin yapısal stabilizasyonunda etkili olmayacağı öne sürülmüştür. Glisinin ve betainin proteinlerle etkileşimi incelendiğinde proteinlerin doğal ve aktif formlarını bozmadıklarını aksine onlarla direkt bağlandıkları gösterilmiş ve sitoplazmik enzimlere glisinin ve betainin toksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bu durumun sadece belli moleküllerin ozmolit olabileceğini ve düşük çözünürlüğü nedeniyle sitoplazmadaki enzimlere toksik olmasa bile organizmalar tarafından neden ozmotik basıncı arttıran maddeler listesinde kullanılmadığını açıkladığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada yapı stabilize edici etkilerinden ötürü belli güçlü elektrolitlerin nötral amino asitlere ve burada çalışılan bileşiklere az çok identik olduğu ve bakteriler tarafından neden nötral bileşiklerin tercih edilip güçlü elektrolitlerin tercih edilmediği Yancey et al. (1982) tarafından öne sürülmüştür. Yancey et al. (1982)'e göre tuzun enzimler üzerine olan toksik etkilerinden dolayı bu toksisitenin tuzların hem enzim hem de substratın elektrostatik özellikleri üzerine olan güçlü pertübasyonu ile ilişkili olduğu ve nötral bileşiklerde böylesi bir pertübasyonun çok zayıf olduğu şeklindedir. Bu durumun tersi ekstrem halofilik arkelerde sitoplazmalarında neden nötral

bileşikler yerine tuz akümüle ettikleri sorusunun cevabıyla farklı bir boyut kazanmakta olup nedeninin ise yaşadıkları çevredeki tuzların suda oldukça yüksek konsantrasyonlarda çözünmelerinden ötürü bu ortama adapte olan arkelerin enzimlerinin de doğal yapılarını korumak amacıyla tuza ihtiyacı olduğu yönünde bir açıklama ile sonuçlanmıştır. Diğer taraftan diğer organizmaların ise enzimleri düşük tuzda doğal hallerinde aktif kalabildikleri bu nedenle de sitoplazmalarında güçlü elektrolitler yerine nötral bileşikleri biriktirmek yoluyla ozmotik basınçlarını arttırıp çevrenin yükselen hipertonic koşuluna yanıt vermekte oldukları öne sürülmüştür. Arakawa et al. (1985) sonuç olarak şekerlerin, bazı amino asitlerin, ve tuzların sulu solüsyonlarında proteinlerin öncelikli hidrasyonuna, suyun yüzey gerilimindeki artışlarından dolayı, suyun kohesiv gücünün artmasından ileri geldiğini öne sürmektedir. Bu bileşiklerin güçlü polariteleri suyun kohesiv gücünü arttırmakta olduğu bu nedenle de proteinlerin etrafında bu bileşiklerin etkisiyle yoğun su moleküllerinin biriktiği bildirilmiştir.

2.1.2 Halofilik mikroorganizmaların sınıflandırılması

Mikroorganizmaların tuz isteklerine göre tür sınıflandırmasını öne süren Kushner and Kamekura (1988), yüksek NaCl konsantrasyonlarında optimum olarak % 15-30 (w/v) NaCl içeren ortamlarda yaşamını sürdüren ve NaCl yokluğunda yaşayamayan türlere ekstrem halofilikler (bakteriler veya arkeler), optimum olarak orta düzeydeki NaCl konsantrasyonlarında % 3-15 (w/v) NaCl içeren ortamlarda yaşamını sürdüren türlere ılımlı halofilikler, optimum olarak % 1-3 (w/v) NaCl içeren ortamlarda yaşamını sürdüren türlere düşük düzeyde halofilikler, optimum olarak % 1 (w/v)'den az NaCl içeren koşullarda yaşamını sürdüren türlere halofilik olmayan türler olarak sınıflandırırken bir de hem tuzun varlığında hem de yokluğunda yaşayabilenlere halotolerant veya halotolerantların yüksek düzeyde NaCl'ü tolere edebilenler ise ekstrem halotolerantlar olarak sınıflandırmışlardır (Çizelge 2.1.2).

Çizelge 2.1 Halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların gelişebildiği optimum NaCl aralıkları

	Optimum % (w/v) NaCl	Optimum NaCl, M
Ekstrem halofilik mikroorganizmalar	% 15-30	2,5-5,2 M NaCl
Ilımlı halofilik mikroorganizmalar	% 3-15	0,5-2,5 M NaCl
Düşük düzeyde halofilik mikroorganizmalar	% 1-3	0,2-0,5 M NaCl
Halofilik olmayan mikroorganizmalar	% 1'den az	<0,2 M NaCl
Halotolerant	Tuzun varlığında ve yokluğunda yaşayanlar	
Ekstrem halotolerant mikroorganizmalar	Halotolerantların yüksek düzeyde NaCl'ü tolere edenleri	

Kushner and Kamekura (1988)

2.1.3 Ozmoadaptasyon

Ozmotik dengenin korunması canlılığın ilk ortaya çıkışından günümüze büyük bir yaşamsal bir öneme sahiptir. Tabiat şartları içerisinde çok sıklıkla meydana gelen iklimsel etkiler nedeniyle birden bire yağın aşırı yağmur beraberinde ozmotik dengenin bozulma tehlikesini gündeme getirmiştir. Özellikle karasal çevrelerde dış çevrenin ozmolarite etkilerine karşı organizmada zamanla

gelişen ozmoadaptasyon mekanizmalarının gücü onların hayatta kalma başarısını oluşturan etmenlerden biri olmuştur. Hindistan'da yapılan bir çalışmada Muson yağmurlarının oluşturduğu kuvvetli rüzgarların Bengal Körfezi'ndeki deniz suyunun yükselmesine bunun da özellikle deniz suyuyla bağlantılı nehir ağzlarında suların yükselmesiyle beraber tatlı suyla tuzlu suyun karışmasına neden olduğu ve deniz suyundan taşınan *V. cholerae*'nin da tatlı sudaki düşük ozmolaritede yaşamını sürdüren *V. cholerae* suşlarına baskın çıktığı ve bu suların tüketilmesiyle de kolera salgını arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (Ali et al., 2002; Pflughoeft et al., 2003). Tatlı suda yaşayan kolera etmeninin insan bağırsak lümenine alındığında hem enfeksiyöz dozu çok düşük olduğu için hem de çok yavaş geliştiği yüksek ozmolariteye sahip lümene adapte olması için geçen süreçte tehlike yaratmadığı gözlenmiş ancak denizel ortamdan gelen ve yüksek ozmolariteye adapte olmuş kolera etmeninin enfeksiyöz dozuyla birlikte bağırsak lümeninde hızla çoğalıp hastalık oluşturduğu bildirilmiştir. Bu nedenle tatlı su çevrelerinde denizel etmenlerden ötürü tuzluluğun artışı *V. cholerae* gibi geniş tuzluluk aralıklarında yaşamını sürdüren bakterilerin büyük salgın oluşturmaları açısından önemli bulunmaktadır (Han and Webster, 2002; Pflughoeft et al., 2003). Ayrıca yoğun bir şekilde yağmur yağması ve taşkınların olması deniz suyunun yükselmesi kadar büyük problem oluşturmadığı da bildirilmiştir (Lobitz et al., 2000; Pflughoeft et al., 2003).

Bunun yanı sıra tatlı su kaynaklarının birden deniz suyu ile karışması gibi çevresel olayların etkisinde kalan organizmalar sürekli olarak ozmotik dengenin bozulması tehlikesiyle yaşamaktadır. Bu duruma yanıt olarak hücre içi biyouyumlu molekül birikimi veya ozmolit birikimiyle verebilmektedir. Bakterilerin yüklü veya yüksüz ozmolitleri biriktirebilmekte olduğu rapor edilmiştir. Ozmolarite artışına ilk yanıt K^+ veya Na^+ gibi yüklü ozmolitlerin çevreden alınması olmaktadır. Bu şekilde hücre içi suyun dışarı diffüzyonunun önüne geçilmiş olmaktadır. Ancak bunun sitoplazma için bir tehlikesi bulunmaktadır. Bu da sitoplazmik iyonik gücün artmasıdır. Yüklü ozmolitler sitoplazma içerisine alındığında sitoplazma içi strese karşı bakterilerin iç biyokimyasal olaylarının yüksek iyonik güce özel bir şekilde adapte olmaları gerektirmektedir. Sürekli bu ortamlara maruz kalarak yüksek sitoplazmik iyonik şiddette en iyi fonksiyon gösterebilen bakterilere bu nedenle halofiller

denmektedir bu ortamlarda zayıf gelişim gösterenler ise halofil olmayanlar denmektedir. Hem halofillerde hem de halofil olmayanlarda hücre içine giren K^+ veya Na^+ iyonları suboptimal iyonik şiddeti arttırdığından bu durum çevresel ozmolaritenin birden artışı ile birlikte büyümede gecikme ile kendini göstermektedir. Halofilik olmayanlar K^+ katyonunu hücresel fonksiyonlarla uyumlu bir yüksüz molekülle yer değiştirerek bu durumu bertaraf edebilirken halofilik olanlar yüksek sitoplazmik K^+ konsantrasyonlarını korumaya devam ederler. Yüksek sitoplazmik iyonik şiddet büyümesi için optimal olan konsantrasyonları aştığı zaman bu bakteriler de biyouyumlu hücre içi molekül üretimini gerçekleştirerek aşırı iyonik ozmolitlerin zarar verici etkisinden kendilerini koruyabilmektedirler. Bu moleküller genellikle amino asitlerden glutamat ve prolin olmakla beraber glisin betain ve ektoin gibi amino asit türevlerinin yanı sıra trehaloz ve mannitol gibi şekerler olmaktadır (Pflughoeft et al., 2003). *E. coli* gibi pek çok organizmada ise *betAB* genleri kolinden glisin betain sentezlemektedir. Glisin betaininin taşınımı hem gram negatif hem de gram pozitifler arasında oldukça yaygındır. Ozmoadaptif prosesler aynı zamanda barsak patojenlerinin virülansında önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar balık ve farelere verilmeden önce Luria-Bertani ortamında 300 mM NaCl eklenen besiyeri kontrole göre *Aeromonas hydrophila*'nın % 50 letal dozu 1 log azaldığı bildirilmiştir. *Listeria monocytogenes*'in bir fare denemesinde çoklu ozmolit transportu genleri durdurulduğunda karaciğerde ve dalakta kolonizasyonu tehlikeye girmiştir. *Vibrio cholerae*, nehir ağzı çevrelerinde doğal olarak yaşayan ama insanda barsak patojeni olarak bilinmektedir. *Vibrio* genusu içerisinde *V. cholerae* halofil olarak sınıflandırılmaktadır ancak 5-15 mM NaCl'a optimal büyüme için gereksinim duyduğu (Reichelt and Baumann, 1974) ayrıca % 25 (w/v) tuzlulukta en iyi geliştiği bildirilmiştir (Huq et al., 1984). *Vibrio cholerae*'nin uzak akrabası olan *Vibrio costicola*'nın 600 mM ve üstü NaCl konsantrasyonlarında primer ozmolit olarak ektoinin olduğu ancak besiyerinde glisin betain olduğu durumda glisin betain ilk olarak akümüle edildiği bildirilmiştir (Regev et al., 1990; Pflughoeft et al., 2003).

2.1.4 Sodyum ve potasyum iyonlarının hücre içi trafiği ve önemi

Hücreler yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için sitoplazmik hacimlerini belli sınırlar içinde tutmak zorundadır. Bu sınırlamalardan birisi de sodyum ve potasyum katyonlarının hücre içi konsantrasyonu üzerinedir. Sodyumun ve potasyumun hücre içi ve hücre dışı trafiğini araştıran Jens Christian Skou (1957) ilk defa $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$ enzimini keşfederek bilim dünyasında çok önemli bir aşama kaydedilmesine sebep olmuştur. Hücre içine yaşamsal öneme sahip besin maddelerinin enerji harcamaksızın taşınması için membranda yer alan Na-madde simportırları görev almaktadır çünkü normal pH aralıklarında gelişen hücrelerin hücre dışındaki Na^+ iyon konsantrasyonu hücre içine göre yüksek olup bu sayede bir konsantrasyon gradienti oluşmaktadır. Hücre ATP'nin enerjisine gereksinim duymadan çok fazla miktarda besin maddesini konsantrasyon gradienti sayesinde taşımaktadır. Ancak bu esnada hücre içinde Na^+ iyonu artışı olmakta ve bu da atom çapının küçük olması ve katyonik yapısı nedeniyle hücre içi makromoleküllerle etkileşime girip onlara zarar verebilme özelliğinden dolayı, 3 ATP harcamak pahasına $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ antiportırları görev alarak 3 Na^+ iyonunu dışarı 2 K^+ iyonunu içeri almak yoluyla hücre içi makromolekülleri sodyumun zarar verici etkisinden korumaktadırlar. Bu nedenle hücre içerisinde K^+ iyonları birikirken Na^+ iyonları dışarıya pompalandığı için yaşamsal aktivitelerin devamlılığı sağlanmaktadır. Aynı zamanda bu durum hücre dışındaki Na^+ iyon konsantrasyonunu arttırdığı için konsantrasyon gradientinin oluşumu da devam ettirilmiş olmaktadır. Hücre içi sitoplazmik hacmin de ozmozla su alarak hücrenin patlamasına engel olunmaktadır. İşte bu denge durumunda hücreler yaşamına devam edebilmektedir (Madigan and Martinko, 2005). % 1 (w/v) NaCl'den az ve normal tuzluluk aralıklarında yaşamlarının devam ettiren halofilik olmayan türler bu şekilde hücresel dengeyi sağlarken halofilik veya halotolerant diğer türler bu durumu farklı stratejiler kullanılarak aşmaktadırlar (Kushner and Kamekura, 1988). Halofilik olmayan türler için bu tür bir denge ve özellikle hücre içine potasyum iyonlarının alımı bu sınırlar içinde bir sorun teşkil etmezken giderek artan tuz konsantrasyonlarında yaşayabilen türler için hücre içi potasyum konsantrasyonu belli dereceye kadar hücre tarafından tolere edilirken belli bir dereceden sonra sorun teşkil eder hale gelmektedir. Çünkü K^+ iyonlarının hücre içinde birikimi katyonik yapısından ötürü negatif yapıli makromoleküllerle (ör;

DNA) etkileşmesi bakımından tehlikelidir. Ancak sodyum iyonunun potasyum iyonuna göre daha küçük atom çapına sahip olması nedeniyle hücre içi protein ve DNA gibi önemli makromoleküllerle etkileşime girip, onları denatüre etme yeteneği potasyum iyonuna göre daha fazla olduğundan potasyumun hücre içinde birikimi gerçekleşmektedir. Giderek artan sodyum iyon konsantrasyonlarına sahip çevrelerde normal hücreler sitoplazmalarındaki suyu kaybederek (plazmoliz) ölmektedirler. Düşük halofilik türler, ılımlı halofilik türler, halotolerant türler ve bazı ekstrem halofilik türler ise dış çevrenin giderek artan sodyum iyon konsantrasyonuna karşı çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirerek bu koşullarda halofilik olmayan türlerin aksine yaşamlarına devam edebilmektedirler. Dış çevrenin giderek artan sodyum iyon konsantrasyonuna karşı, bu yaşamı tehdit eden durumdan kendilerini korumak ve sitoplazmalarındaki suyun hücre dışına diffüzyonuna engel olmak için halofilik ve halotolerant türlere ait hücrelerin, hücre içinde potasyum iyonunun akümülyasyonuna başlayıp hücre içi potansiyel su kaybını en aza indirme yoluyla bir adaptasyon mekanizması geliştirdikleri bilinmektedir. Ancak sitoplazma içerisinde biriken potasyum iyonu da sodyuma göre daha az oranda olsa da yine önemli makromoleküllerle etkileşime geçme potansiyeli olduğundan bu tehlikenin ortadan kaldırılabilmesi için de potasyum katyonu sitoplazmik havuzda yer alan asidik bir aminoasit olan glutamat ile nötralize edilerek hücre için zararsız bir forma dönüştürülmektedir. Bu sayede sitoplazma içi yüksüz tutulmaya çalışılarak çevrenin giderek artan NaCl konsantrasyonuna karşı hücre içindeki suda oldukça çözünen K-glutamat gibi madde birikimleri sayesinde ozmotik basıncın dengelenebildiği ve yaşamın devamlılığının sağlandığı adaptasyon mekanizmalarına sahip oldukları bilinmektedir. K-glutamat gibi suda oldukça çözünebilir ancak yüksek konsantrasyonlarda birikmesine rağmen hücre içi yapılara ve hücre metabolizmasına zarar vermeyen böyle organik moleküllere biyoyumlu molekül *-compatible solutes-* (Brown, 1976) denmekte olup hücrelerin sahip olduğu böyle adaptasyon mekanizmaları onların halofilik olma derecelerini de etkileyen ana unsurlardan biri olarak görülmektedir (Lentzen and Schwarz, 2006; Roberts, 2006). Orta düzey NaCl konsantrasyonlarında optimum olarak yaşayabilen ılımlı halofilik bakteriler ile bu koşulları tolere edebilen halotolerantların biyoyumlu molekül biriktirdikleri bilinmektedir. Ancak hücrelerde gerçekleşen tek adaptasyon çeşidi bu değildir bunun yanı sıra özellikle ekstrem halofilik arkelerde

ve ekstrem halofilik bakterilerde gözlenen; kararlı olabilmek için sodyuma ve potasyuma ihtiyaç duyan hücresel bileşenlere sahip olmak da bir adaptasyon çeşididir. Kararlı olabilmek için sodyuma ve potasyuma bağımlı bu türlere ise - tuzu seven yaşayabilmesi için tuza bağımlı olan türler anlamında ekstrem halofilikler denmektedir. Bunlar özellikle hücre içinde 5 M'a yakın KCl biriktirebilme özelliğinde olan ve potasyum iyonlarını bağlayabilen düşük pI değerine sahip yani asidik yapılarda protein molekülleri ile potasyuma bağımlı hücresel yapılar (çeper, membran, proteinik yapılar vs. gibi) oluşturmak yoluyla evölüsyonel süreçte tuza adapte olmuşlardır (Oren, 2002; Tekin, 2008). Halofilik bakterilerde tuza adaptasyon için asidik proteoma sahip olup olmadıklarını tespit için yapılan genom analizinde *Halomonas elongata*'nın tüm proteomunun asidik olmadığı dolayısıyla tuza adaptasyonda organik biyoyumlu molekül üreticileri tarafından asidik bir proteoma gerek duyulmadığı bir kez daha tespit edilmiştir (Schwibbert et al., 2011).

2.1.5 Hücreler tarafından üretilen biyoyumlu molekül çeşitleri

Dış çevrenin yüksek madde konsantrasyonuna karşı, hücre içi ozmotik dengeyi sağlayabilmek adına hücre içerisinde biriktirilen biyoyumlu molekül çeşitleri; türden türe, sahip oldukları biyosentez genlerine, bu genleri horizontal gen transferleriyle dışarıdan almak yoluyla sahip olabilmeye özelliğine göre veya direkt çevreden hazır alabilmek için gerekli membran transport proteinlerinin varlığına bağlı olarak değişmektedir (Pastor et al., 2010). Bu küçük organik moleküller; düşük moleküler ağırlığa sahip, kimyasal olarak çeşitli, zwitteriyonik (dipolar), yüksüz veya anyonik karakterde (K^+ katyonunu nötralize edici olarak kullanılır) bileşiklerdir (Lentzen and Schwarz, 2006). Doğada biyoyumlu molekül çeşitleri çok geniş bir yelpazede görülmektedir. Örneğin disakkaritlerden trehaloz ve süktroz, poliyollerden gliserol, sorbitol, mannitol, arabinitol, ribitol, eritriol vb. gibi moleküller, gliserol türevlerinden α -glukozilgliserol, mannoz türevlerinden mannozilgliserat (firoin) ve mannozilgliseramid (firoin-A) gibi moleküller, glisin betain, amino asitlerden prolin, glutamin, alanin, glutamat, amino asit türevlerinden ektoin ve ektoin türevi hidroksiektoin, glisin türevi sarkozin (N-metilglisin), amino sülfon asitler (taurin), negatif yüklü fosfodiesterlerden α -digliserolfosfat, di-myoinositolfosfat, siklik 2,3-

difosfogliserat biyoyumlu moleküllere örnektir. Bunların dışında karnitin, gliserofosfokolin, ksilitol, galaktikol, valin, izolösin, aspartik asit, glukoz, fruktoz, fruktanlar, pinitol, myo-inositol, trimetilamin oksit, glisin, homarin, arginin, scyollo-inositol, β -alanin, hipotaurin, N-metil-taurin, kreatin, kolin-o-sulfat, prolin-betain, poliyol-fosfodiesterler hipertermofilik arkelerden bakterilere, mayalardan, sığ ve derin deniz omurgasızlarına, elasmobranşlardan bitkilere, bitkilerden böbrek medullar hücrelerine, karaciğer hücrelerine ve beyin hücrelerine kadar içerik olarak farklı olarak biriktirilmekte olan oldukça temel ve önemli moleküldür (Çizelge 2.2) (Lentzen and Schwarz, 2006; Pastor et al., 2010).

Çizelge 2.2 Doğada çeşitli organizmalara ait hücreler tarafından biriktirilen biyoyumlu molekül örnekleri

	Biyoyumlu molekül birikimi
<i>E. coli, S. typhimurium</i>	Prolin, Trehaloz, Glisin Betain, Ektoin
<i>L. lactis</i>	Betain, karnitin, ektoin, trehaloz
<i>S. cerevisiae</i>	Gliserol, Trehaloz, Gliserofosfokolin
Başka maya ve funguslar	Eritrol, Ribitol, Arabinitol, Ksilitol, Sorbitol, Mannitol, Galaktikol
Bitkiler	Prolin, Valin, İzolösin, Ektoin, Aspartik Asit, Betain, Glukoz, Fruktoz, Sukroz, Fruktanlar, Mannitol, Pinitol, Myo-İnositol
Sığ deniz omurgasızları	Betain, Taurin, Trimetilamin Oksit, Glisin, Alanin, Prolin, Homarin, Arginin
Derin deniz omurgasızları	Scyollo-İnositol, Beta-Alanin, Betain, Hipotaurin, N-Metiltaurin
Elasmobranş	Trimetilamin N-Oksit, Sarkozin, Betain
Böbrek medullar hücreleri	Sorbitol, Betain, İnositol, Taurin, Gliserofosfokolin
Karaciğer hücreleri	Betain, Taurin, İnositol
Beyin hücresi	Kolin, Kreatin, İnositol, Taurin
Halofilik bakteriler	Ektoin, hidroksiektoin, prolin
Ekstrem halofilik arkeler	KCl
Hipertermofilik arkeler	Negatif yüklü Fosfodiesterler, trehaloz, poliol-fosfodiesterler
<i>C. salexigens</i>	Betain, kolin, prolin betain, ektoin, kolin-o-sulfat, hidroksiektoin

(Pastor et al., 2010)

2.1.6 Biyoyumlu moleköl olan ektoinin ilk ortaya çıkışı

Yeni halkasal bir amino asidin bir ekstrem halofilik fototrofik bakteri olan *Ectothiorhodospira* genusundan nüklear manyetik rezonans (NMR) tekniği ve kütle spektrumuyla saptanarak 1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-pirimidin-karboksilik asit olarak sadece belli koşullar altında sitoplazmada akümüle edilen bu molekölün ozmoregülatör fonksiyonları olduğu görülmüş ve ‘ektoin’ olarak Galinski et al. (1985) tarafından ilk defa öne sürülmüştür. Ancak sitoplazmik havuzda sadece bu moleköl değil aynı zamanda bir diğer ozmoregülatöre olan ve glisin betainin yerine sentezlenen α,α -trehalozun da yer aldığını bildirmektedirler. Aynı çalışmada stasyonier fazda sitoplazmadaki diğer ozmoregülatörler içinde % 10 oranında üretildiği bildirilmiştir. Yine kendilerinden önce bildirilen bir çalışmada *Euphorbia latex*’den izole edilen N-asetil- α - γ -diamino bütirik asitin (Liss, 1962) ektoinin açık-halka prekürsörü olarak görülebileceği ve sentez yol izinin ornitin yol izinin analoğu olarak 1,3-diazin türeviyle kondenzasyon reaksiyonu sonucunda halka kapanmasının meydana gelebileceği de öne sürülmüştür (Galinski et al., 1985). Brown (1976) tarafından öne sürülen pek çok biyoyumlu molekölün varlığı Yancey et al. (1982) tarafından da ortaya konmuştur. Ancak yapılan çalışmalar ektoinin yüksek tuzluluk koşullarında üretilen bir biyoyumlu moleköl olduğunu göstermiştir. Ektoinin diğerlerinden farklı yanı proteinleri, nükleik asitleri, hücre membranlarını hatta tüm hücreyi sadece yüksek tuzluluğa karşı değil bunun yanı sıra ısı stresine, donmaya, kurumaya, oksijen radikallerine, radyasyona, ürenin zararlı etkilerine karşı da koruyabildiği üzerinedir (Lentzen and Schwarz, 2006). Ektoin molekölü günümüzde Bitop (Almanya) firması tarafından ilaç olarak piyasaya sürülmüş bir biyoyumlu moleköl çeşididir. Ektoin molekölü piyasaya sürülmeden önce Arora et al. (2004) tarafından in vitro koşullarda insülin amiloidi modelinin hem başlangıç hem de elongasyon fazında oluşan amiloidin oldukça etkili bir inhibitörü olduğu, Kanapathipillai et al. (2005) tarafından A β 42 amiloid beta plaklarının hücrede kümeleşmesi sonucu fonksiyon kaybına ve unutkanlığa neden olan Alzheimer hastalığına karşı ektoin muamelesinin etkili bir inhibitör olduğu, Kanapathipillai et al. (2008) tarafından proteaza dirençli amiloidlerin ektoin ile inhibisyonu neticesinde Prion hastalığını in vitro koşullarda önleyebildiği, Lapidot et al. (1995) tarafından HIV’e karşı antiviral etkinliği

olduğunu ve potansiyel antiviral ilaçlarda kullanılabileceği bildirilmiştir. Pastor et al., (2010) tarafından evrensel bir hücre koruyucusu olması nedeniyle aynı zamanda yaşam bilimleri çalışmalarında özellikle enzim koruyucu olarak, GC oranı yüksek PCR reaksiyonlarının etkinliğini arttırıcı olarak kullanılabildiği bildirilmiştir. Lippert and Galinski (1992) tarafından enzimlerin donma, çözme, ısıtma, kurutma işlemlerinde aktivite kaybını ortadan kaldırıcı özelliğinde özellikle laktat dehidrogenez ve fosfofruktokinaz enzimlerinin aktivitesinin koruyabildiği bu nedenle de yaşam bilimleri ve endüstriyel uygulamalarda biyostabilizatör olarak oldukça değerli bir molekül olduğu bildirilmiştir. Pul et al. (2007) tarafından ektoin türevi olan hidroksiektoinin mikroarray çalışmalarında arkaplan kirliliğini azaltıp hibridizasyon etkinliğini arttırdığı bildirilmiştir. Nakayama et al. (2000) tarafından ektoin sentezi yapan operon *Agrobacterium tumefaciens*'e klonlanarak tütün bitkisine aktarıldığında tuz stresine karşı 0,1-0,3 M'a kadar tuza tolerans sağladığı bildirilmiştir. Günümüzde ise Kunte et al. (2014) tarafından daha çok alerjik hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Bu alerjik hastalıklar arasında alerjik rhinitisin tedavisinde, burun spreyi, gözde alerjik inflamasyonun tedavisinde göz damlası, atopik dermatit tedavisinde kremi, alerjik astım tedavisinde ağız spreyi, foto yaşlanmayı önleyici krem, deri bakım kremi, biyolojik stabilizatör olarak; peroksidaz konjugat stabilizatörü, alkalin fosfataz konjugat stabilizatörü, antikor stabilizatörü, PCR optimizatörü olarak piyasaya sürülmüştür (Bitop, 2014).

Moleküler dinamik simülasyon çalışması ile kimotripsin inhibitörü-2 modelinde protein yüzeyiyle ektoin-su karışımının direkt etkileşmediğini ve proteinin hidrasyon yapısını değiştirmedeğini bildirilmiştir. Bu koruyucu etkinin globüler proteinlerin yanı sıra tüm hücre ve nükleik asitleri üzerine olduğu da bildirilmiştir (Yu and Nagaoka, 2004).

Ektoin türevi hidroksiektoin; ilk defa aktinomis D üreticisi *Streptomyces* sp. tarafından bu antibiyotik DNA üzerine olumsuz etkisini önleyebilmek ve DNA interkalasyonunu önleyebilmek için üretildiği bildirilmiştir (Inbar and Lapidot, 1988). Hidroksil grubu taşıyan hidroksiektoinin, ozmolitin suyla yer değiştirmesine bağlı olarak hücreleri kurumaya karşı korumakta olduğu da bildirilmiştir (Lippert and Galinski, 1992). Yine pek çok suşta hidroksiektoinin

özellikle sıcaklık artışına karşı biriktirildiği de bilinmektedir (Lentzen and Schwarz, 2006).

Ektoin molekülünün aynı zamanda ektoini sentezleme yeteneğine sahip olmayan *Escherichia coli* (Jebbar et al., 1992), *Corynebacterium glutamicum* (Steger et al., 2004) ve *Sinorhizobium melilotii* (Jebbar et al., 2005) gibi bakteriler tarafından da hücre içinde dışarıdan yüksek afiniteli betain-karnitin transportörleriyle alınıp biriktirile özelliğinde olan bir molekül olduğu bildirilmiştir.

Ektoin molekülleri birkaç milimolardan 1-2 M'a kadar hücre içinde biriktirilmektedir (Lentzen and Schwarz, 2006). 0.5 M NaCl'de *Halomonas elongata* baskın bir şekilde potasyum glutamat akümüle ederken daha yüksek tuzluluklarda ektoin akümüle etmektedir (Kraegeloh and Kunte 2002; Lentzen and Schwarz, 2006). Hücredeki ozmolit havuzunun kompozisyonu çevresel koşullarına bağlı olarak sıkça değişmekte ve bu durum ekstraselüler ozmolariteye hızlı yanıt verebilmede oldukça önemli olabilmektedir. Organizmaların ölümüyle veya hipoozmotik koşullarda ozmotik dengeyi sağlayabilmek için ve yine yağmurla, selle çevrenin aşırı seyrelmesiyle hücreden çevreye salınmaktadırlar. Ozmotik stresin süresine; substratın varlığına; çevrede hazır bulunan ozmolitlerin olup olmamasına; biyosentez genlerinin varlığına bağlı olarak hücrede biriktirilmektedir (Sleator and Hill, 2001).

2.1.7 Ektoin molekülünün kimyasal özellikleri

Ektoin; $C_6H_{10}N_2O_2$, (4S)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4 karboksilik asit yapısına sahip olup renksiz, kristal yapıda hafif higroskopik bir katıdır. Geniş pH aralığında (pH 1,0-9,0), yüksek sıcaklıklarda (190 °C' de 6 saat) oldukça stabildir. 15-25 °C'de kuru bir şekilde tutulduğunda 4 yıldan fazla stabil kalmaktadır. Aspartat aminoasidinden üretilen halkasal amino asit türevi veya kısmen hidrojenlenmiş pirimidin türevi olarak adlandırılmaktadır. Sudaki çözünürlüğü 550 g/L, metanoldeki çözünürlüğü 36 g/L ve etanoldeki çözünürlüğü 5 g/L olduğu bildirilmiştir (Sigma).

2.1.8 Ektoin gen bölgesine sahip genomlar

Bugüne kadar yapılan 6428 mikrobiyal genom analizi sonucunda 440 genomda ektoin üretici genlerin olduğu bildirilmiştir. Matematiksel olarak tüm genomlar içerisinde ektoin üreticilerinin % 6,84 olduğunu ve ektoin üretimi yapan türlerin içinden 272 genomun ise hidroksiektoini de üretebildiği bu da matematiksel bir ifadeyle ektoin üreticilerinin içerisinde % 61,81'inin hidroksiektoini de üretebildiğini göstermektedir (Widderich et al., 2014). Ektoin gen bölgelerinin lateral gen transferleriyle geçiş yapabildiği de bilinmektedir.

2.1.9 Sistem biyolojisi yaklaşımıyla ektoin üretimi

Endüstriyel olarak *Halomonas elongata* DSM 2581^Tdan günümüzde tonlarca üretim yapılmakta ve enzim stabilizatörleri olarak, deri hücrelerini koruyucu olarak ve insan sağlığı uygulamalarında kullanılmaktadır. Ektoin üretim düzeyleri dış çevrenin tuz düzeyiyle düzenlenmekte olduğundan metabolizması ve üretimin kontrolü üzerine bilinmeyen bilgiler olması bilim insanlarını metabolik mühendisliği çalışmalarına yöneltmiştir. Günümüzde genom sekansı çıkartılmış ve 4061296 bp olduğu tespit edilmiş *H. elongata*'nın tüm ektoin metabolizmasını tanımlamak için analizler yapılmış ve ektoin degradasyon yol izi keşfedilmiştir. Bu yol izinin daha çok ektoin üretemeyen ve halofilik olmayan bakterilerde olduğu da genom karşılaştırmalarıyla tespit edilmiştir. Bu gelişmeler ışığında genom datalarından üretilen metabolik modeller sayesinde ektoin metabolizması için bir metabolik akış modeli tasarlanarak endüstriyel üretimde model tasarımı iyileştirmeler yapılmıştır (Schwibbert et al., 2011).

Ektoin-spesifik-transportör TeaABC çevreden ektoinin alınması ile ilgili substrat olarak ektoini sadece taşıyabilen bir protein olduğu ve endojen ektoinin dışarı salgılanması durumunda dengeyi sağlayan bir transportör olarak ilk defa Grammann et al. (2002) tarafından ortaya konmuştur. *teaABC* mutantının ektoini sürekli dışarı salgılayarak devamlı hücre içindeki ozmotik dengeyi korumak için sürekli üretilmiş olacağı bildirilmiştir (Kunte, 2006). Bu gözlemde TeaABC'nin ektoin sentezini düzenleyebileceği önerilmiştir ancak ektoin salgılanmasının mekanizmasıyla ilgili bilgiler hala bilinmemekte ancak sitoplazmik membran

boyunca ektoin transportu hakkında, ektoin metabolizması hakkında ve metabolik akışı hakkında bilgi sahibi olmanın çok önemli olduğu bildirilmiştir (Schwibbert et al., 2011). Metabolik mühendislik üzerine çalışmalar Marin-Sanguino et al. (2009) tarafından öne sürülmüştür. Sistem biyolojisi yaklaşımıyla öne sürülen metabolik model üretim miktarlarının artırılması için günümüzde uygulanmaktadır (Schwibbert et al., 2011). Bunun dışında yapılan genom kıyaslamaları sonucunda Na^+ bağımlı simport proteinleri ve sodyum-proton proteinlerinin halofilik ve marin türlerde yer aldığı, NSS ailesi ve TRAP ailesi transportörlerin enerjilerini sodyum simportörlerinden karşıladıkları (Mulligan et al., 2007) ve sodyum gradientini kullandıkları bildirilmiştir. NSS ailesi transportörleri nitrojenli bileşiklerin örneğin amino asitlerin düşük konsantrasyonlu çevrelerde yüksek afiniteli taşınımında rol oynamaktadır (Schwibbert et al., 2011).

2.1.10 Ektoin degradasyon yol izi

Doe metabolik yol izi ektoinin DoeA ile N- α -asetil-L-2,4-diaminobütirik asite hidrolizinin ardından diaminobütirik asite deasetilasyonunu gerçekleştiren DoeB enzimiyle diaminobütirik asidin daha sonra ya aspartata dönüştüğü ya da yeniden ektoin sentezine katıldığı tespit edilmiştir. Degradasyon yol izinin keşfedilmesi ektoinin endüstriyel anlamda üretiminin kontrolü için oldukça önemlidir (Schwibbert et al., 2011).

2.1.11 Ektoin sentaz genleri

Ektoin sentez yol izinin *ectABC* olarak bu üç genin kodladığı enzimlerce gerçekleştirildiği ve % 10'nun üstünde tuz konsantrasyonunda yaşayabilen *H. elongata*'dan ilk defa Göller et al. (1998) tarafından bildirilmiştir. Ektoin araştırılan tüm ılımlı halofiliklerde benzer korunmuş biyosentez genlerine sahip bulunmuş ve üretimindeki hücre içi yol izleri bakımından ise aspartattan kökenlendiği bildirilmiştir. Aspartat amino asiti merkezi bir amino asit olup ektoin, lizin, treonin ve metiyonin biyosentezleri bu amino asitten gerçekleşmektedir. Ektoin aspartat-semialdehitten sentezlenir. Aspartat-semialdehit aspartat ailesine ait amino asitlerin sentezinde merkezi ara üründür.

Bu durumda aspartokinaz enzimi β -aspartil fosfat üreterek aspartat semialdehit dehidrogenaz enzimi, L-aspartat- β -semialdehit üreterek ektoin sentezi için gerekli substrat üretilmiş olmaktadır. Bu aşamadan sonra ektoin biyosentez genleri olan *ectABC* devreye girerek 3 adımda ektoin biyosentezini gerçekleştirmektedir. Birinci adım aspartat-semialdehitin 2,4-diaminobütirik aside (DABA) transaminasyon reaksiyonunu gerçekleştiren DABA transaminaz enzimi (EctB) olup amino grubu vericisi olarak glutamat kullanılmaktadır. İkinci reaksiyon DABA'nın asetillenmesi reaksiyonudur bu durumda DABA-N γ -asetiltransferaz (EctA) enzimi görev almaktadır. Üçüncü ve son aşama olarak oluşan N γ -asetil-L-2,4-diaminobütirik asitin ektoin sentaz (EctC) enzimi ile halkasal kondenzasyon reaksiyonu sonucu ektoin üretimi gerçekleşmektedir (Ono et al., 1999). Sıcaklık stresine maruz kalındığında bazı üreticilerin ektoinlerin bazılarını 5-hidroksiektoine ektoin hidroksilaz (EctD) enzimiyle dönüştürdüğü bildirilmektedir (Inbar and Lapidot, 1988; Wohlfarth et al., 1990; Schwibbert et al., 2011).

2.1.12 Ektoin üretim denemeleri

Ektoin üretimi için aspartat amino asidinin varlığı önemli olduğundan aspartatın sentezi için glutamat mükemmel bir substrat, prolin de glutamat sentezi için önemli bir substrat olduğundan genel olarak düşünüldüğünde prolinin ve glutamatın ektoin sentezi için önemli olduğu mantıksal çıkarımı gerçekleştirilmiştir (Pflughoeft et al., 2003). Ektoin üretim denemelerine bazı örnekler; Sauer and Galinski (1998) tarafından *Halomonas elongata*'da % 15 (w/v) NaCl içeren besiyeri koşullarında ağırlıkça % 15,5 ektoin üretilbildiği, ağırlıkça 7,4 gr/L ektoin konsantrasyonuna ulaşıldığı bildirilmiştir. Guzman et al. (2009) tarafından kesikli-beslemeli kültür koşullarında *Halomonas boliviensis*' de % 7,5 (w/v) NaCl içeren besiyerinde ağırlıkça % 7,2 ektoin üretildiği, ağırlıkça 4,3 gr/L ektoin konsantrasyonuna ulaşılabilirdiği ve NaCl konsantrasyonunun % 12,5 (w/v)'e çıkartılması sonucu ektoin üretiminin ağırlıkça % 17'ye çıkarılabildiğini ve ağırlıkça 5,7 gr/L ektoin konsantrasyonuna ulaşılabilirdiği bildirilmiştir. Zhang et al. (2009) tarafından *Halomonas salina* DSM 5928 ile % 3 (w/v) NaCl içeren besiyeri koşullarında üretilen ektoin konsantrasyonunun 6,9 gr/L olduğu ve günlük üretkenliğinin ise 7,9 gr/L olduğu bildirilmiştir. Fallet ve

arkadaşları (2010) tarafından *Chromohalobacter salexigens*'te ise % 10 (w/v) NaCl içeren besiyeri koşullarında ektoin konsantrasyonunun 8,2 gr/L olduğu bildirilmiştir. Schubert et al. (2007) tarafından *Escherichia coli* DH5a'ya gen aktarımı yapıldığında NaCl içermeyen besiyeri koşullarında ektoin konsantrasyonunun 6 gr/L olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 2.3 Çeşitli mikroorganizmalardan Ektoin üretim çalışmalarına örnekler

Mikroorganizma	Ürün	Üretim (mg/g)	Biyokütle (g/L)	NaCl	Referans
<i>Brevibacterium epidermis</i>	E	160	50	1 M	Onraedt et al., 2005
<i>Marinococcus</i> sp. M52	HE	135	56	1,71 M	Frings et al., 1995
<i>Chromohalobacter salexigens</i>	E	540	61	1,84 M	Fallet et al., 2010
<i>Chromohalobacter salexigens</i>	HE	400			Fallet et al., 2010
<i>E.coli</i> DH5a	E	270	22	0 M	Schubert et al., 2007
<i>Haemonas salina</i>	E	358	19,4	0,5 M	Zhang et al., 2009

-E: Ektoin, -HE: Hidroksiektoin

2.1.13 Ektoin biyosentezinin transkripsiyonel regülasyonu

Ektoin biyosentezi; ozmotik stres ve ısı stresine yanıt olarak hücresel regülatör ağlarla entegre bir şekilde ve hücre dışı maddelerle ve demirle düzenlenmektedir (Pastor et al., 2010).

Calderón et al. (2004) tarafından *C. salexigens*'te haritalanan ektoin operonunun *ectABC* genlerinin transkripsiyonunun beş promotor ile regüle edildiği iki tanesinin sigma 70 kontrollü promotorlar olduğu, bir tanesinin sigma S kontrollü promotor olduğu bir tanesinin özelliğinin belli olmayan bir promotor olduğu ve bunların *ectA* geninin yukarısında lokalize olduğu, beşinci promotorun ise *ectB*'nin yukarısında olduğu bildirilmiştir. Schwibbert et al. (2011) tarafından *H. elongata*'da yapılan analizler neticesinde farklı ve kompleks bir promotor dizisinin olduğu tespit edilmiştir. İki transkripsiyonel başlangıç bölgesi *ectA*'nın önünde 25 bp bölgesinde (-10 -35 dizisine sahip sigma 70 kontrollü) ve *ectA*'nın önünde 92 bp bölgesinde (-10 DNA dizisi sigma38 kontrollü -35 dizisi G elementi

olup ozmotik bakımdan indüklenen sigma38 promotoru (Lee and Gralla, 2004), bir tanesi de *ectC* nin 47 bp önünde -12 ve -24 dizileriyle azotla regüle edilen genlerin sigma54 kontrollü promotoru (Ausubel, 1984; Bordo et al., 1998, Schwibbert et al., 2011) bulunmaktadır. 18 bp'lik bir dizi genin -111 -128 bp önünde yer almakta olup FleQ ile kontrol edilen sigma54 promotorunu içerdiği bildirilmiştir (Hu et al., 2005). Bir başka promotor çalışmasında promotor bölgelerinin aşırı sıcaklıkta indüklendiği, ozmotik olarak düzenlendikleri, betain ve ektoin gibi biyoyoumlu molekül varlığında baskılandığı, DNA giraz inhibitörü olan nalidiksik asitle baskılandığı ve aşırı demir varlığında baskılandığı bildirilmiştir (Vargas et al., 2008).

Çizelge 2.4 Ektoin molekülünün koruyucu etkileriyle ilgili yapılan literatür çalışmalarına örnekler

Deri Koruma	Koruyucu	Referanslar
İnsanlarda in vivo yaşlanma önleyici deri koruma	Ektoin	Heinrich et al., 2007
Derinin dehidrasyona karşı korunması ve in siliko modelleri	Ektoin	Graf et al., 2008
İnsanlarda in vitro yaşlanma önleyici, mitokondrial DNA koruma ve seramitler aracılığıyla inflamatuvar yanıtların önlenmesi	Ektoin	Buenger and Driller, 2004
Isı şok proteinlerinin üretiminin teşvik edilmesi ve insan keratinositlerinde proinflamatuvar yanıtların düzenlenmesi	Ektoin	Buommino et al., 2005
Görünür ışığa karşı in vitro fotokoruma	Ektoin	Botta et al., 2008
İnsan derisini in vivo nemlendirme ajanı	Ektoin	Motitschke et al., 2000
Langerhans hücrelerinin UV-indüklü degradasyonuna karşı koruma	Ektoin	Beyer et al., 2000
Potansiyel terapötik kullanımı		
Nanopartikülle uyarılan nötrofilik akciğer inflamasyonuna karşı koruma	Ektoin	Sydlik et al., 2009
Sinir hücrelerini poliglutaminin yol açtığı toksisiteye karşı koruma	Ektoin	Furuscho et al., 2005
Alzheimer beta-amiloidinin agregasyonunun inhibisyonu ve nörotoksisitenin inhibisyonu	Ektoin, Hidroksiektoin	Kanapathipillai et al., 2005
İnsulin amiloid oluşumunun inhibisyonu	Ektoin	Arora et al., 2004
Zimojenlerin proteolizisten korunması	Hidroksiektoin	Kolp et al., 2006
In vitroda Tat-benzeri, arginin içeren peptidin HIV TAR RNA'ya bağlanmasının inhibisyonu	Ektoin	Lapidot et al., 1995
Prion peptidi 106-206'nın agregasyonunun önlenmesi ve nörotoksisitesinin önlenmesi	Ektoin	Kanapathipillai et al., 2008
Gen terapisi için retroviral vektörlerin stabilizasyonu	Hidroksiektoin	Cruz et al., 2006
Hücre Koruma		
<i>Pseudomonas putida</i> 'yı, <i>E.coli</i> 'yi kuraklığa karşı koruma	Hidroksiektoin	Manzanera et al., 2002, 2004
<i>Zymomonas mobilis</i> 'in etanol üretimini teşvik etme	Ektoin	Zhang et al., 2008
<i>Halomonas</i> sp.'de fenolün detoksifikasyonu	Ektoin	Maskow and Kleinsteuber, 2004

Laktik asit bakterilerin ozmotik korunması	Ektoin	Baliarda et al., 2003
<i>E.coli</i> 'de termotoleransın indüksiyonu	Hidroksiektoin	Malin and Lapidot, 1996
Kurutmaya ve depolamaya karşı <i>E.coli</i> 'nin stabilizasyonu	Ektoin, Hidroksiektoin	Louis et al., 1994
Tütün bitkilerinde tuz toleransı	Ektoin	Moghaieb et al., 2006
Makromoleküler koruma		
Rekombinant proteinleri denatürasyona, agregasyona, yanlış katlanmaya ve donmaya karşı koruma	Hidroksiektoin	Barth et al., 2000
Fitaz enziminin termostabilitesi (90 °C'de)	Hidroksiektoin	Zhang et al., 2006
DNA erime sıcaklığının etkili şekilde düşürülmesi	Ektoin	Lapidot et al., 1999
PCR reaksiyonunda biyostabilizatör	Homoektoin	Schnoor et al., 2004
DNA mikroarray kalitesinin iyileştirilmesi	Hidroksiektoin	Mascellani et al., 2007
Oksidatif protein hasarının LDH'da önlenmesi	Hidroksiektoin	Andersson et al., 2000
Sülfektan ajanlara karşı hücre membranının korunması	Ektoin	Bunger et al., 1999
X-ray kristalografisi için protein kristalizasyon koşullarının optimizasyonu	Ektoin	Harjes et al., 2004
Enzimleri ısıtma dondurma kurutmaya karşı koruma	Hidroksiektoin, Ektoin	Lippert and Galinski 1992
(Pastor et al.,2010)		

2.1.14 Kimyasal şaperonlar olarak ozmolitlerin değerlendirilmesi

Çevresel streslere karşı bir tür kimyasal şaperon olarak da değerlendirilen biyoyumlu moleküllerden bazılarının *E. coli*'de ısı stresine karşı bazı moleküler şaperonların aktivitesini arttırdığı dolayısıyla da kimyasal şaperonların moleküler şaperonlarla birlikte ısının meydana getirdiği protein agregasyonunu engelledikleri Diamant et al., (2001) tarafından ortaya konmuştur. Bu sayede hücre içi moleküllerin etkileşimi açısından farklı perspektifle yaklaşım biyoyumlu moleküllerin aynı zamanda kimyasal şaperon olduğu fikrinin ortaya atılmasına sebep olmuştur. Çalışmanın özetinde yüksek tuza adapte etmek için glisin betain düzeyi arttırılan *E.coli* hücrelerinin termal stres altında protein agregasyonunu önlediği ortaya konmuştur. Dört yaygın ozmolitin şaperon aktivitesinin in vitro olarak etkilerinin araştırıldığı çalışmada glisin betain, gliserol, prolin ve trehalozun tek tek ve kombinasyonel olarak GroEL, DnaK, ve ClpB üzerine etkileri incelenmiş ve trehaloz haricindeki diğer ozmolitlerin moleküler şaperonları aktive ettikleri şaperon bağlı polipeptidlerin yerel katlanmasına yardımcı olarak ve reaksiyonun doğal son ürününü stabilize ederek

gerçekleştirdikleri görüşü öne sürülmüştür. Trehaloz uygulamasının ise moleküler şaperon aktivitesini inhibe etmesinin sebebi olarak yüksek konsantrasyonda trehaloz uygulamasının vizkozitede artışa neden olduğu DnaK + GroEL ve DnaK + ClpB gibi DnaK-bağımlı şaperon ağını inhibe ettiği çünkü yüksek vizkozitenin şaperonlarla substratları arasındaki etkileşimi bozduğu ve dolayısıyla protein katlanmasını bu şekilde engellediği bildirilmiştir. Bu nedenle de hücrelerin stres altında hücre içi ozmolit kompozisyonlarını düzenleyerek protein stabilitelerini kontrol edebildikleri ortaya konmuştur (Diamant et al., 2001).

2.1.15 Diğer ozmolitlerin uygulama alanları

Betain; glisin üç enzimatik adımla metiltransferazlarla metilasyon reaksiyonları sonucu oluşması ile *Actinopolyspora halophila* ve *Ectothiorhodospira halochloris* tuza tolerans sağladığı bildirilmiştir (Nyyssola et al., 2000; Margesin and Schinner, 2001). Digliserol fosfat tuz stresi altında hipertermofil *Archaeoglobus fulgidus*'da biriktirildiği bildirilmiştir. *Desulfovibrio gigas*'ta ve *Clostridium pasteurianum*'da ısıya karşı çeşitli dehidrogenazların stabilizasyonunda ve rubredoksinlere karşı protein stabilizasyonunda kullanılmaktadır (Lamosa et al. 2000; Margesin and Schinner, 2001). Trehalozun ise biyomoleküllerin dondurma-kurutma işlemleri sırasında kriyoprotektan olarak kullanıldığı bilinmektedir (Margesin and Schinner, 2001).

2.2 Çevresel İzolatların Ait Olduğu Taksonomik Gruplar

2.2.1 *Halomonas* sp. genel özellikleri

Phylum XIV: *Proteobacteria*

Sınıf III: *Gammaproteobacteria*

Takım VIII: *Oceanospirillales*

Aile IV: *Halomonadaceae*

Cins I: *Halomonas*

Takım XI: *Vibrionales*

Aile I: *Vibrionaceae*

Cins III: *Salinivibrio*

Tür I: *Salinivibrio* sp. FAM 10

Takım XIII: *Enterobacteriales*

Aile I: *Enterobacteriaceae*

Cins XXIII: *Pantoea*

Tür I: *Pantoea agglomerans* KB38

Halomonadaceae familyasına (Franzmann, Wehmeyer and Stackebrandt 1989 emend. Dobson and Franzmann 1996) ait olan Dünya genelinde tuzlu çevrelerden izole edilen düşük veya ılımlı halofilik olarak da adlandırılan halotolerant *Halomonas* tip genusu (Vreeland, Litchfield, Martin, and Elliot 1980 emend. Dobson and Franzmann 1996) % 0,1-32,5 (w/v) NaCl konsantrasyonlarında yaşayabilen Gram-negatif, 0,6-0,8 x 1,6-1,9 µm boyutlarında ve endospor oluşturmeyen basil şeklinde; lateral, polar veya peritrik flajellere sahip hareketli hücrelerden oluştuğu kolonilerinin beyaz veya sarı renge sahip olduğu, suşların yaşlanınca açık kahverengi renge dönüştüğü ve sadece bir türünün kok morfolojisinde olduğu geri kalanlarının ise düz veya kıvrık basil şeklinde ve belli koşullar altında uzayıp esnek filamentler haline dönüşebildikleri bildirilmiştir. Son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanarak aerobik büyürken bazı suşlarının ise nitrat varlığında aerobik büyüyebildiği bildirilmiştir. Bazı suşlarının ise sadece glukoz varlığında ama başka karbohidrat veya amino asit varlığında olmamak kaydıyla nitrat yokluğunda anaerobik koşullarda büyüyebildiği rapor edilmiştir. Nitratın nitrite indirgenmesinin pozitif,

denitrifikasyonun negatif olduğu bildirilmiştir. Katalazın hepsinde pozitif olduğu, 21 bilinen tür içinden sadece 17'sinde oksidazın pozitif olduğu bildirilmiştir. İntraselüler granül üretimi olmayan suşlarının tek azot kaynağı olarak amonyumu kullanabildiği bildirilmiştir. Ana solunum kinonunun Ubikinon-9, ana yağ asitlerinin ise C_{16:1}, C_{17:0cyc}, C_{16:0}, C_{18:1}, C_{19:0cyc} olduğu bildirilmiştir. 16 S rDNA gen bölgelerinde 4 imza nükleotide sahip oldukları bildirilmiştir. Bunların C, 1424 *E. coli* pozisyonunda, 1439 pozisyonunda U, 1462 pozisyonunda A, 1464 pozisyonunda C olduğu bildirilmiştir. Guanin + Sitozin içeriklerinin % 52-68 mol arasında değiştiği tip türünün *Halomonas elongata* olduğu bildirilmiştir (Vreeland et al., 1980). % 8 (w/v) NaCl içeren CAS ortamında pH 5,0-9,0 arasında büyüebildikleri alkalifilik suşların ise genellikle pH 7,0-11,0 arasında ve optimum olarak pH 9,5'da büyüebildiği bildirilmiştir. *Halomonas* sp. cinsine ait türlerinin tek karbon kaynağı olarak sıklıkla glukoz, glukonat, gliserol, fruktoz, mannoz, sükroz, sellobiyoz, süksinat, mannitol, alanin, glutamin, glutamat, asparagin, aspartat, lizin, histidin, fenilalanin, tirozin, triptofan, prolin, arginin, lösin, izolösin, valin, metiyonin, sistein, serin, treoninde büyüebildiği bildirilmiştir (Brenner et al., 2005).

Sekans homoloji benzerlik düzeyleri aynı cinsin türleri arasında farklı cinslerin türlerine kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (Dobson and Franzmann, 1996). Bireysel tür tanımlamalarında kaydedilen datalarla ilgili tutarsızlıkların olduğu da bildirilmiştir. Örnek olarak *H. subglaciscola* ve *H. meridiana*'nın 55 karakteristik özelliği ortak tespit edilmiş ancak 15'i *H. elongata*'da farklı bulunmuştur. Bu fenotipik datalardaki tutarsızlığın söz konusu türlerin taksonomik yerini nasıl etkileyebileceği hakkında bir bilgi şu an için mevcut olmadığı özellikle de spesifik enzim sistemleri ve özellikleri belli olmadan tek karbon kaynağı testlerinin kullanımı ve test sonuçlarının farklılıkları ile fenotipik tanımlama yapmanın bu cinsin türleri için tanımlamada güvenilirliği azaltan bir unsur olduğu bildirilmiştir. Kemotaksonomik düzeyde taksonomik markırların tür içine spesifik veya hücreye özel komponentlere sahip olmaması tür ayırt etmede kullanımlarını sınırlandırdığı bildirilmiştir. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları yapıldığında *H. halodurans* ve *H. elongata* arasında % 28 DNA benzerliği tespit edilmiştir. *H. halophila*'nın *H. elongata*'yla DNA benzerliği bulunamadığı bildirilmiştir. *H. aquamarina* ile *H. venusta*'nın % 41 DNA

benzerliğine sahip olduğu, *H. cupida* ile ise % 16 DNA sekans benzerliğine sahip olduğu bildirilmiştir. *H. pasifica* ile *H. marina* arasında % 12 DNA sekans benzerliğine sahip oldukları bildirilmiştir. *Halomonas* cinsi içindeki diğer türler arasında DNA-DNA hibridizasyonunun henüz tamamlanmadığı da bildirilmektedir. *Halomonas* cinsi ile *Chromohalobacter israelensis* ve *C. canadensis* arasındaki DNA sekans benzerliğinin sırasıyla Guanin + Sitozin oranlarının % 49 ve % 55 mol olduğu bildirilmiştir (Brenner et al., 2005).

2.2.2 *Halomonas janggokensis* türünün genel özellikleri

Janggok güneş tuzlasından izole edilen *Halomonas janggokensis*'in aerobik, Gram-negatif olup spor oluşturmadığı, 0,5-0,7 x 1,6-2,0 µm boyutlarında olduğu, basil şeklinde hücrelere sahip olup kolonilerinin beyaz, düz, yarı saydam ve yuvarlak bütün kenarları olduğu ayrıca peritrik flajele sahip hücrelerinin hareketli olduğu, oksidaz negatif, katalaz pozitif olduğu bildirilmiştir. Optimum sıcaklık aralığının 25-30 °C olduğu ve 5-45 °C sıcaklık aralıklarında yaşayabildiği bildirilmiştir. Optimum pH aralığının pH 7,0-8,0 olduğu ve pH 6,0-10 aralığında yaşayabildiği, gelişebildiği optimum tuzluluk aralığının ise % 10-15 (w/v) NaCl olup % 1-20 (w/v) NaCl aralığında gelişebildiği bildirilmiştir. Indol ve H₂S üretiminin negatif olduğu, nitratın nitrite indirgenmediği, eskülin, kazein, jelatin, nişasta, tween 80 ve üre hidrolizinin negatif olduğu, Voges-Proskauer testinin negatif, ancak DNA hidrolizinin pozitif olduğu bildirilmiştir. Gliserolden, L-arabinozdan, adonitolden, galaktozdan, glukozdan, fruktozdan, mannitolden, sorbitolden, maltozdan, sükrozdan, trehalozdan, ksilitolden, D-turanozdan, D-fukozdan, D-arabitol ve L-arabitol asit üretebildiği ancak eritritolden, D-arabinozdan, ribozdan, D-ksilozdan, L-ksilozdan, metil β-D-ksilozdan, mannozdan, sorbozdan, ramnozdan, dulçitolden, inositolden, metil α-D-mannosit, metil α-D-glukozitten, N-asetilglukozaminden, amigdalinden, arbutinden, eskülin, salisinden, sellobiyozdan, laktozdan, melibiyozdan, inulinden, melezitozdan, raffinozdan, nişastadan, glikojenden, gentiobiyozdan, D-likozdan, D-tagatozdan, L-fukozdan, glukonatdan, 2-ketoglukonattan, 5-ketoglukonattan asit üretiminin olmadığı bildirilmiştir. Tek karbon kaynağı olarak mannitol, D-glukoz, inositol, sükroz, maltoz, D-sorbitol, L-arabinoz, glukonat, propionat, malat, malonat, valerat, asetat, adipat, sitrat, DL-laktat, L-

alanin, 2-ketoglukonat, 3-hidroksibütirat, L-prolin kullanabildiği bildirilmiştir. Ramnoz, N-asetilglukozamin, salisin, D-riboz, D-melibiyoz, L-fukoz, mannoz, itakonat, suberat, kaprat, histidin, fenilasetat, 5-ketoglukonat, glikojen, 4-hidroksibenzoat, 3-hidroksibenzoat, L-serin ise kullanamadığı bildirilmiştir. Ana kinon yapısının ubikinon Q-9 az miktarda Q-8 olduğu bildirilmiştir. Ana yağ asitlerinin C18:1v7c, C16: 0 ve C16: 1v7c, C15:0 iso2-OH olduğu bildirilmiştir. DNA'nın Guanin + Sitozin içeriğinin % 60,2–61,0 mol olduğu bildirilmiştir (Kim et al., 2007).

2.2.3 *Salinivibrio* sp. genel özellikleri

Latince hızla hareket eden tuzlu suda yaşayan organizma anlamına gelen *Salinivibrio* cinsinin (Mellado et al., 1996) Gram-negatif kıvrık basil şeklinde olduğu ve 0,5-0,6 x 1,0-3,2 µm boyutlarında olup; hücrelerinin tek tek, çiftler halinde ya da ara sıra S şeklinde veya spiral şekilde olabileceği bildirilmiştir. Tek polar flajele sahip hareketli olan türlerinin spor oluşturmayan ılımlı halofilik tür özellikte olduğu ve optimum NaCl konsantrasyonunun 37 °C'de % 2,5-10 (w/v) arasında olduğu büyümenin ise % 0-20 (w/v) NaCl arasında olduğu bildirilmiştir. Sıcaklık aralığı 5-50 °C arasında olduğu ve optimum sıcaklığının ise 37 °C olduğu bildirilmiştir. Gelişebildiği pH aralığının pH 5-10 olduğu optimum ise pH 7,3-7,5 olduğu bildirilmiştir. Büyümesi için herhangi bir büyüme faktörüne ihtiyacı olmadığı rapor edilmiştir. Fakültatif anaerobik, kemoorganotrofik, katalaz ve oksidaz pozitif olup asit üretimi D-glukozda görüldüğü bildirilmiştir. Jelatin hidrolizi pozitif, Voges-Proskauer ve arginin dekarboksilaz testleri pozitif olduğu indol, β-galaktozidaz, lizin, ornitin dekarboksilaz testlerinin negatif olduğu bildirilmiştir. Kolonilerinin halkasal, konveks, opak, düz ve krem renkli olduğu bildirilmiştir. Sıvı kültürlerinin eşit derecede bulanıklık gösterdiği bildirilmiştir. Guanin + Sitozin içeriğinin % 49,4-50,5 mol oranında değişmekte olduğu tip türünün ise *Salinivibrio costicola* olduğu bildirilmiştir (Mellado et al., 1996). Bu cins *Vibrio costicola* ile diğer *Vibrio* türlerini fenotipik özelliklerine göre birbirinden ayırmak için öne sürülmüştür (Mellado et al., 199; Huang et al., 2000; Brenner et al., 2005).

2.2.4 *Salinivibrio* sp. FAM 10 suşunun genel özellikleri

Salinivibrio sp. FAM 10 fenotipik karakterizasyonu incelendiğinde kıvrık basil şeklinde, gram negatif çeper yapısında, krem renkli kolonilere sahip, nitrat indirgenmesi, indol üretimi ve üreaz testi negatif, β -galaktozidaz pozitif olan, glukozdan asit oluşturabilen, sitrat kullanımı pozitif, arginin dihidrolaz pozitif, proteaz pozitif, sitokrom oksidazı pozitif, karbon kaynağı kullanımı testi sonuçlarına göre glukoz, mannoz, mannitol, N-asetil-glukozamin, maltoz, glukonat, kaprat pozitif, arabinoz, adipat, malat, fenil-asetat negatif (API 20NE) olduğu bildirilmiştir. Optimum NaCl konsantrasyonu % 2-4 (w/v) olup % 22 (w/v)'ye kadar büyüyebildikleri bildirilmiştir (Lee, 2012).

2.2.5 *Pantoea* sp. genel özellikleri

Değişik coğrafik ve ekolojik kaynaklardan elde edilen bakteri anlamına geldiği bildirilen *Pantoea* sp. cinsine ait türler düz basil şeklinde, 0,5-1,3 x 1,0-3,0 μ m boyutlarında olup kapsül oluşturmadıkları ve spor oluşturmadıkları bildirilmiştir. Bazı suşlarının simplazmata oluşturdıkları rapor edilmiştir. Çoğu suşların hareketli ve peritrik flajele sahip olduğu bildirilmiştir. Gram negatiftirler. Nutrient agarda kolonileri düz, saydam, az çok konveks, düz kenarları olan ve heterojen olan ve agara yapışan özellikte olduğu bildirilmiştir. Kolonileri sarıdır, soluk bejdir veya soluk kırmızımsı sarı veya pigmentsizdir. Fakültatif anaerobik olup oksidaz negatiftir. Glukoz dehidrogenaz ve glukonat dehidrogenaz üretildiği bildirilmiştir. Kofaktör eklenmeden aktif oldukları bildirilmiştir. D-fruktozdan, D-galaktozdan trehalozdan, D-ribozdan fermentasyon sonucu asit oluşturdıkları bildirilmiştir. Çoğu suşları Voges-Proskauer pozitifdir. Lizin ve ornitin dekarboksillenmediği bildirilmiştir. Üreaz negatiftir. Pektat degrade edilmez. H₂S tiyosülfattan üretilmez. Optimum sıcaklığı 30 °C'dir. Tek karbon ve enerji kaynağı olarak N-asetil-d-glukozamin, L-aspartat, D-fruktoz, D-galaktoz, D-glukonat, D-glukozamin, D-glukoz, L-glutamat, gliserol, D-mannoz, D-riboz, ve D-trehaloz kullanılmaktadır. 5-Aminovalerat, benzoat, kaprat, kaprilat, m-koumarat, etanolamin, gentisat, glutarat, histamin, 3-hidroksibenzoat, 4-hidroksibenzoat, 3-hidroksibutirat, itakonat, maltitol, D-melezitoz, 1-O-methyl-d-glukozid, palatinoz, 3-fenilpropiyonat, propiyonat, L-sorboz, trikarballilat,

triptamin, D-turanoz, ve L-tirozine tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmamaktadır. *Pantoea* spp. bitkilerde, tohumlarda, meyvelerde, toprakta, suda, ve insanlarda (idrara, kan, açık yaralarda, iç organlarda ve hayvanlarda bildirilmiştir. Bazı suşları fitopatogeniktir. DNA'nın Guanin + Sitozin içeriği % 49,7-60,6 mol'dür. *Pantoea agglomerans* (Gavini, Mergaert, Beji, Mielcarek, Izard, Kersters and De Ley, 1989) tip türüdür (Brenner et al., 2005).

2.2.6 *Pantoea agglomerans* ve *Pantoea agglomerans* KB38 suşunun genel özellikleri

D-ksilozdan, D-ribozdan, maltozdan, D-galaktozdan, D-mannozdan, D-fruktozdan, trehalozdan, D-mannitolden asit oluşturabildiği Nutrient agarda 30 °C'de gelişebilirken 44 °C'de gelişmediği bildirilmiştir. 5 gün analiz edilen karbon kaynağı testi pozitif olanlar gliserol, meso-inositol, D-mannitol, L-arabinoz, D-riboz, D-ksiloz, D-galaktoz, D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz, L-ramnoz, D-maltoz, sükroz, trehaloz, salisin, N-asetil-D-glukozamin, D-glukonat, 2-keto-glukonat, süksinat, fumarat, DL-gliserat, D-malat, L-malat, meso-tartrat, cis-aconitat, L-glutamat, L-prolin, DL-4-aminobütirat, ve glukozamindir. 5 günlük sonuçlara göre kullanılmayan karbon kaynakları ise adonitol, dulçitol, sorbitol, meso-ksilitol, L-arabitol, meso-eritritol, L-ksiloz, L-sorboz, melibiyoz, gentiobioz, D-melizitoz, D-tagatoz, D-fukoz, L-fukoz, D-turanoz, α -metil-D-mannosit, α -metil-D-glukosit, p-metil-D-ksilosidet, amigdalın, arbutin, eskulin, inulin, starch, glikojen, asetat, propionat, bütirat, izobütirat, n-valerat, izovalerat, n-caproat, heptanoat, caprilat, pelargonat, kaprat, okzalat, maleat, glutarat, adipat, pimelat, suberat, azelat, sebakat, glikolat, 3-hidroksibütirat, levulinat, sitrakonat, itakonat, mezakonat, fenilasetat, benzoat, o-hidroksibenzoat, m-hidroksibenzoat, p-hidroksibenzoat, D-mandelat, L-mandelat, fitalat, isofitalat, terefitalat, glisin, L-lösin, L-norlösin, DL-2-aminobütirat, L-treonin, L-metiyonin, L-fenilalanin, L-tirozin, D-triptofan, L-triptofan, trigonellin, L-ornitin, L-lizin, L-sitrulin, L-arginin, DL-kinurenin, betain, kreatin, palanin, 3-aminobütirat, 5-aminovalerat, 2-aminobenzoat, 3-aminobenzoate, 4-aminobenzoat. ürea, asetamit, sarkozin, etilamin, bütilamin, amilamin, etanolamin, benzilamin, putressin, spermin, histamin ve triptamin, suşlar arasındaki Guanin + Sitozin içeriğinin % 55,1- 56,8 mol arasında olduğu bildirilmiştir (Gavini et al., 1989). En belirgin özellikleri ise

indol negatif, sarı pigment oluşumu pozitif, VP testi pozitif, arginin dihidrolaz ve lizin dekarboksiaz negatif ornitin ise değişken, maltoz, sükroz ve salisinden asit oluşumu pozitif, adonitol, dulçitol, sorbitol ve melibiyozdan asit oluşumu negatif geri kalanları değişkendir. (Gavini et al., 1989). Bir başka çalışmada *Pantoea agglomerans* KB38 suşu gelişebildiği sıcaklık aralığı 5–35 °C arasında olduğu optimum ise 30 °C’de gelişebildiği rapor edilmiştir (Pesciaroli et al., 2012). *P. agglomerans* sıklıkla sarı pigmentlidir ancak bu pigmentasyonu 37 °C’de zayıf olduğu bildirilmiştir. Kültürlerinin çoğu sükrozdan asit oluşturup triple sugar iron agarda asit oluşturabildiği bildirilmiştir. *P. agglomerans* üç dekarboksilaz testlerinden de negatif reaksiyon vermektedir. *Pantoea* türlerinin ayrıca tiyosülfattan H₂S üretimi, tetratiyonat üretimi, tributirin ve mısır yağının hidrolizi ve β-glukuronidaz üretimi bakımından negatif olduğu bildirilmiştir (Brenner et al., 2005). Bir başka *Pantoea agglomerans* suşu olan *P. agglomerans* R-42’nin 5–45 °C sıcaklıkta, % 1–5 (w/v) tuz konsantrasyonunda yaşayabildiği ve gelişebildiği pH aralığının pH 3-11 olduğu bildirilmiştir (Son et al., 2006).

2.2.7 *Bacillus* sp., *Oceanobacillus* sp., *Virgibacillus* sp. taksonomik özellikleri

Şube XIII: *Firmicutes*

Sınıf I. *Bacilli* class. nov.

Aile I. *Bacillaceae* AL

Genus I: *Bacillus* (Cohn 1872)

Tür 1: *Bacillus* sp. HZ03

Tür 2: *Bacillus* sp. MH05

Tür 3: *Bacillus hwajinpoensis*

Tür 4: *Bacillus baekryungensis*

Genus XIII. *Oceanobacillus* VP

Tür 1: *Oceanobacillus iheyensis*

Tür 2: *Oceanobacillus kimchii* X50

Genus XIX. *Virgibacillus* VP

Tür 1: *Virgibacillus marismortui*

Bacillus ve 18 diğ er cinse sahip *Bacillaceae* familyası büyük çoğunluğunun aerobik veya fakültatif anaerobik olduğu kemoorganotrofik, Gram-pozitif hücre çeperine sahip, endospor oluşturabilen aynı familya içerisinde zorunlu anaerobların, kemolitototrofların, kokların, endospor oluşturmayan organizmaların da olduğu yani istisnai karakteristik özelliklerinin de mevcut olduğu büyük çoğunluğunun Gram-pozitif ancak pek çok türünün de Gram değişken ya da Gram-negatif olduğu bir aile olduğu bildirilmiştir (De Vos et al., 2009).

Basil şekilli, düz veya biraz kıvrık, tek tek veya çiftler halinde bazen zincir şeklinde ara sıra uzun filamentler halinde, her hücrede bir tane endospor bulunan, endosporlarının pek çok farklı koşula oldukça dirençli olduğu ve Gram pozitif veya sadece erken büyüme aşamasında Gram pozitif veya Gram-negatif özellikte olduğu, Mezo-DAP içerdiği ancak L-Lys-d-Glu, Orn-d-Glu ve L-Orn-d-Asp moleküllerini de ara sıra içerdiği bildirilmiştir. Çoğu türlerinin rutin besiyerlerinde örneğin nutrient agarda veya kan agarda geliştiği ve tür içi ve türler arasında koloni morfolojisi ve büyüklüğünün oldukça değişken olduğu bilinmektedir. Yine psikrofilikten termofiliğe, asidofilikten alkalifiliğe hatta tuza tolerant veya halofilikliğe kadar geniş aralıkt  bir fizyolojik çeşitliliğe sahip türleri içermekte olduğu bildirilmiştir. Çoğu türü katalaz  üretirken oksidazın pozitif veya negatif görülebildiği bildirilmiştir. Kemoorganotrofik olup sadece iki türünün fakültatif kemolitotrofik olduğu ve prototrofikten okzotrofiğe genişte pek çok büyüme faktörüne ihtiyaç duyduğu bildirilmiştir. Toprak n veya toprakla kontaminele çevrelerden, sudan, gıdadan, klinik örneklerden izole edilebildiği, sporlarının ısıya, radyasyona, dezenfektanlara ve kurumaya karşı dayanıklı olduğu ve bu nedenle de çeşitli ürünlerde ve tıbbi olarak tehlike yaratması bakımından önemlidir. Çoğu türünün az veya hiç patojenik potansiyele sahip olmadığı istisnai olarak *Bacillus anthracis* 'in haricinde nadiren enfeksiyon yaptıkları bildirilmiştir. Gıda zehirlenmesi ve fırsatçı enfeksiyonlar yapan türleri mevcut olup sadece omurgasızlara patojen *Bacillus thuringiensis* türü mevcut olduğunu bildirilmiştir. Guanin + Sitozin içeriğinin % 32–66 mol arasında değiştiği bildirilmiş olup tip türü *Bacillus subtilis* olduğu bildirilmiştir (De Vos et al., 2009). Ad hoc komitesi 16S rDNA sekans analizinin türleri ayırt etmekte yetersiz kaldığını ve bu nedenle de korunmuş genlerin de analiz edilerek tür tanımlamanın yapılması gerektiğini

önermiştir (Stackebrandt et al., 2002). *Bacillus* türlerine ait hücrelerin sıklıkla yuvarlak uçlara sahip olduğu ancak *B. cereus* hücrelerinin uçlarının kare şeklinde olduğu bildirilmiştir. Hücre boyutlarının 0,4-1,8 x 0,9-10 µm arasında olduğu bildirilmiştir. Bireysel türlerin boyutlarının daha da dar limitlerde olup belli suşların hücrelerinin oldukça düzenli boyutta olduğu bildirilmiştir. Örneğin *B. pumilus* hücrelerinin boyutu 0,6–0,7 x 2,0–3,0 µm iken *Bacillus megaterium* hücrelerinin boyutunun 1,2–1,5 x 2,0–5,0 µm olduğu, suboptimal koşullarda ise hücre ve filamentlerinde pleomorfizm görüldüğü ve sporolasyonların zayıf olduğu da bildirilmiştir (De Vos et al., 2009).

2.2.8 *Bacillus sensu lato* grubu

2000 yılından beri halotolerant veya halofilik cinslere ait *Bacillus sensu lato* adlı ayrı bir filogenetik grup oluşturulmuştur. Bu grup içerisinde yer alan genusların; *Oceanobacillus*, *Alkalibacillus*, *Amphibacillus*, *Cerasibacillus*, *Filobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Halolactibacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Lentibacillus*, *Marinibacillus*, *Paraliobacillus*, *Pontibacillus*, *Salinibacillus*, *Tenuibacillus*, *Thalassobacillus*, ve *Virgibacillus* olduğu ve 2000 yılından beri 17 cinsten 13'ünün açıklandığı oldukça yeni bir hat olup değişime açık bir taksonomik durumu olduğu bildirilmiştir (De Vos et al., 2009).

2.2.9 *Bacillus* sp. HZ03 ve *Bacillus* sp. MH05

Bacillus sp. HZ03 ve *Bacillus* sp. MH05 suşları Kore'nin güneybatı kıyılarındaki tuzlu topraklardan izole edilmiş heterotrofik halotolerant bakteri başlığı altında AY690704.1 ve AY690699.1 Genbankası erişim numaralarıyla NCBI'da yer almaktadır ancak tür tanısına ilişkin veriler bulunmamaktadır (Choi et al., 2004).

2.2.10 *Bacillus hwajinpoensis*

Kore'nin güney denizindeki Hwajinpo kumsalından izole edilmiş olan bu tip türün özellikleri hücrelerinin aerobik basil olması, 1,0-1,3 µm enine, 2,5-4,0 µm boyuna sahip, gram pozitif ama yaşlı kültürlerde gram variable özellikte olduğu

bildirilmiştir. Hareketsiz olup sentral veya subterminal elipsoidal endosporlar üretebildiği bildirilmiştir. Kolonilerinin düz, daireselden hafif düzensize görünüme sahip, hafif yükseltisi olan açık sarı renkte bir görünüme sahip olduğu ve 30°C’de marine agarda 3 gün inkübe edildiğinde çapının 2-4 mm arasında olduğu bildirilmiştir. Optimal büyüme sıcaklığının 30-35 °C arasında olduğu, büyümenin 10-40 °C derece arasında olduğu ancak 4 °C’de ve 41 °C’nin üstünde büyümenin olmadığı bildirilmiştir. Optimal pH aralığının pH 6,0-7,0 olduğu ve pH 5’de büyümenin gözlemediği ama pH 4,5’de büyümenin gözlenmediği de bildirilmiştir. Büyüyebildiği optimal NaCl konsantrasyonlarının % 2-5 (w/v) NaCl aralığında olduğu % 19 (w/v) NaCl’de büyümenin olduğu ancak NaCl içermeyen veya % 20 (w/v) ve üstünde büyümenin gözlenmediği bildirilmiştir. Bu durumda ılımlı halofilik tür kategorisine girmektedir. Anaerobik koşullar altında marine agarda büyüme görülmediği, katalaz pozitif, oksidaz negatif, üreaz negatif olduğu, kazein, jelatin, nişasta, tween 20-80, eskülin hidrolizleyebildiği, fenilalanin deaminasyonunun negatif olduğu, nitrat indirgenmesinin pozitif olduğu bildirilmiştir. L-arabinozdan, D-ksilozdan, L-ramnozdan, miyoinositolden, D-sorbitolden, laktozdan, D-melezitozdan asit oluşturamadığı, D-sellobiyozdan, D-ribozdan, D-galaktozdan, melibiyozdan, stakiyozden ve D-mannitolden, D-raffinozdan, D-mannozdan asit oluşturabildiği bildirilmiştir. Hipoksantini, tirozini ve ksantini hidrolizleyemediği bildirilmiştir. Mezo-diaminopimelik asit çeper yapısında sahip olduğu, ana solunum kinonunun MK-7 olduğu, ana yağ asidinin anteizo-C15:0 olduğu ve Guanin + Sitozin içeriğinin % 40,9 mol olduğu bildirilmiştir. Tip türün SW-72^T (=KCCM 41641^T=JCM 11807^T) olduğu bildirilmiştir (Yoon et al., 2004).

2.2.11 *Oceanobacillus* sp. genel özellikleri

Okyanus basili olarak adlandırılan *Oceanobacillus* cinsi çubuk şekilli hücrelerden ve elipsoidal sporangia boyunca subterminal veya terminal endosporlara sahip, Gram pozitif ve peritrik flajelli, dairesel ve beyazdan beje renkte kolonilere sahip, zorunlu aerobik veya fakültatif anaerobik, fakültatif veya zorunlu alkalifilik ve mezofilik, halotolerant veya halofilik türlere sahip olduğu bildirilmiştir. Optimum NaCl konsantrasyonları % 3–10 (w/v) iken % 20 NaCl (w/v)’e kadar yaşayabildikleri, katalazın pozitif, oksidaz enziminin ise değişken

olduğu, üreazın negatif ve indol oluşumunun negatif olduğu ana yağ asidinin C15:0 anteiso olduğu, MK-7'nin ana menakinon tipi olduğu DNA Guanin + Sitozin içeriğinin % mol içeriğinin 35,8–40,1 arasında olduğu bildirilmiştir. Tip türünün *Oceanobacillus iheyensis* (Lu et al., 2001) olduğu bildirilmiştir.

Oceanobacillus türlerine ait hücrelerin çubuk şekilli olduğu 0,4–0,8 x 1,1–6 µm olduğu ve tek tek oluştukları bilinmektedir. Ekstrem halotolerant olan *Oceanobacillus* suşlarının % 21 (w/v) NaCl'de yaşayabildiği çoğunun tuz yokluğunda da yaşadığı bildirilmiştir. *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis* 20AG (DSM 16557, ATCC BAA-954) suşunun cins içindeki tek temsili halofilik tür olduğu ve minimum NaCl gereksiniminin % 5 (w/v) olduğu, büyümesi için gerekli optimal NaCl konsantrasyonunun ise % 3-10 (w/v) arasında olduğu ve farklı suşlarda değişebildiği bildirilmiştir. *Oceanobacillus iheyensis*'de tuz toleransının ayrıca pH'ya bağımlı olduğu da tespit edilmiştir. Alkalitolerant ve alkalifilik türlere sahip olduğu bildirilmiştir. *Oceanobacillus* suşlarının pH aralıklarının; *Oceanobacillus iheyensis*'de pH 6,5–10,0 (Lu et al., 2001), Daha sonraları *Oceanobacillus picturae*'nin pH 7,0–10,0'da yaşayabildiği (Lee et al., 2006), ve diğer rapor edilen tür olan *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis*'in pH 6,5–9,5'da yaşayabildiği bildirilmiştir (Romano et al., 2006). Tek alkalifilik üyenin *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *oncorhynchi*'nin olduğu pH 9,0'un altında yaşayamadığı bildirilmiştir (Yumoto et al., 2005). *Oceanobacillus oncorhynchi* alttürünün spor oluşumunda, pH ve NaCl aralığında farklılıklar gösterdiği ve anaerobik büyüeyebilen tek tür olması açısından da farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *oncorhynchi*'nin ise mezofilik olduğu ve 5-42 °C sıcaklık aralığında büyüeyebildikleri ve optimum sıcaklıklarının 25-37 °C arasında olduğu bildirilmiştir (De Vos et al., 2009).

2.2.12 *Oceanobacillus iheyensis*

Iheya Denizi'nde 1050 m dip çamurundan izole edilmiş olan *Oceanobacillus iheyensis*'e ait hücrelerin 0,6-0,8 x 2,5-3,5 µm boyutlarında, obligat aerobik olup % 0-21 (w/v) NaCl'de yaşayabildiği ve optimum olarak % 3 (w/v) NaCl'de büyüeyebildiği, büyüme sıcaklık aralığı 15–42 °C (optimum 30 °C)

arasında değiştiği, pH 6,5–10 aralığında gelişebildiği (optimum 7,0–9,5), nitratın nitrite indirgenmediği, jelatin, kasein, tween 40 ve tween 60'ı hidrolizlenebildiği, nişastanın hidrolizlenmediği bildirilmiştir. Ayrıca gliserolden asit üretilebildiği galaktoz, glusitol, D-melibiyoz, rhamnoz ve D-trehalozdan asit üretilemediği bildirilmiştir. Biolog testi ile α -D-glukoz, maltoz, D-mannoz, ve turanozun oksidize edilebildiği bildirilmiştir. Ana yağ asitlerinin C15:0 anteiso, C15:0 iso, ve C14:0 iso olduğu bildirilmiştir. DNA Guanin + Sitozin içeriğinin % 35,8 mol olduğu bildirilmiştir (Lu et al., 2001).

2.2.13 *Oceanobacillus kimchii* X50

Ilımlı halofilik bir tür olduğu belirtilen *Oceanobacillus kimchii* X50^T tip türünün, Korenin geleneksel fermente gıdası olan “Kimçi'den” izole edilmiş olduğu, % 0-15,0 (w/v) NaCl aralığında ve optimum % 3 (w/v) NaCl'de gelişebildiği, pH 7,0-10,0 aralığında gelişebildiği optimum pH 9,0'da gelişebildiği ve sıcaklık aralıkları olarak ise 15-45 °C arasında gelişebildiği optimum ise 37 °C'de gelişebildiği bildirilmiştir. Krem renkli kolonilere, basil şekilli hücrelere sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca % 98,9 oranında *O. iheyensis* HTE831^T'e ve % 97,0 oranında *O. oncorhynchi* subsp. *oncorhynchi* R-2^T'ye benzer olduğu bildirilmiştir. Hücresel yağ asitlerinin anteiso-C_{15:0} ve iso-C_{15:0}, ana izoprenoid kinonunun MK-7 olduğu ve genomik DNA'nın Guanin + Sitozin içeriğinin % 37,9 mol olduğu bildirilmiştir (Whon et al., 2010).

2.2.14 *Virgibacillus* sp. genel özellikleri

Latince yeşil sürgün anlamına gelen *virga* kelimesi ve bacillustan kökenlenen *Virgibacillus*'un toprak ve özellikle tuzlu çevrelerden gıda, su ve klinik örneklerden izole edilebildiği, endospor oluşturduğu, hareketli, marine agarda veya triptikaz soy agarda 2 gün yetiştirildikten sonra koloni boyutunun küçükten orta büyüklüğe 0,5-5 mm'ye geldiği, Gram-pozitif, 0,3–0,8 μ m $\times$ 2,0–8,0 μ m boyutlarında olduğu, tek tek veya çiftler halinde veya yaşlı kültürlerde filamentler oluşturabildiği bildirilmiştir. Büyümenin tuz ile teşvik edilmekte olduğu ve % 4-10 (w/v) NaCl ile arttığı, 10-50 °C arasındaki sıcaklıklarda büyümenin görüldüğü optimum sıcaklığının ise 28-37 °C arasında olduğu

bildirilmiştir. Endosporlarının küreselden elipsoidale değişmekte olduğu; terminalde bulunmasına rağmen bazen de subterminal veya parasentral pozisyonunda yer aldığı bildirilmiştir. Aerobik veya zayıf bir şekilde fakültatif anaerobik olup katalaz pozitif olduğu dairesel olan kolonilerinin hafif düzensiz, düz, parlak veya bazen mat hafif konveks veya hafif yarı şeffaftan opağa görünümü olduğu ve sıklıkla pigmentsiz veya krem benzerinden sarımsı beyaz renkli kolonilere sahip olduğu bildirilmiştir. *Virgibacillus* cinsine ait bir türü marine agarda pembe pigment ürettiği bildirilmiştir. API 20E striplerine göre ve konvansiyonel testlere göre Voges-Proskauer reaksiyonunun negatif olduğu, indolün üretilmediği, nitratın nitrite indirgenmesinin değişken olduğu, kazeinin hidrolizlendiği, eskulinin ve jelatinin bazen zayıf bir şekilde de olsa çoğu türünde hidrolizlendiği bildirilmiştir. API 20E striplerinde yapılan analizler sonucunda üreazın ve H₂S'in sıklıkla üretilmediği, ancak bazı suşlarının H₂S için zayıf pozitif reaksiyon gösterdiği bildirilmiştir. Bir kaç suşun arginin dihidrolaz, sitrat kullanımı, *o*-nitrofenil- β -D-galaktosit kullanımı açısından pozitif reaksiyon gösterdiği bildirilmiştir. Analiz edilen türler arasında rafinozun tek karbon kaynağı olarak kullanılabildiği D-arabinoz, D-fruktoz veya D-ksiloz'da büyümenin olmadığı bildirilmiştir. Ana yağ asidinin C15:0 ante olduğu ana polar lipidlerin difosfatidil gliserol ve fosfatidil gliserol olduğu ve 5 fosfolipid ve bilinmeyen yapıda bir polar lipide sahip olduğu tüm türlerinde bulunduğu bildirilmiştir. Fosfatidil etanolamin ve diğer lipidlerin varlığının ise değişmekte olduğu bildirilmiştir. Ana menakinon tipinin MK-7 olduğu az miktardan iz miktara kadar MK-6 ve MK-8'in mevcut olduğu bildirilmiştir. Hücre çeperi mezo-diaminopimelik asit tipi peptidoglikana sahip olduğu bildirilmiştir. DNA Guanin + Sitozin içeriğinin % 36–43 mol arasında olduğu bildirilmiştir. Tüm türlerinin % 4-10 (w/v) NaCl içeren besiyerlerinde ve marine agarda iyi büyüebildiği bildirilmiştir. Aerobik veya zayıf bir şekilde fakültatif anaerobik olduğu ve katalaz pozitif olup kolonileri marine agarda veya triptikaz soy agarda geliştikten sonra küçükten orta büyüklüğe 0,5-5 mm'ye 2 günde geldiği bildirilmiştir. Pek çok türünün % 20-25 (w/v) tuz konsantrasyonlarını tolere edebildiği *Virgibacillus marismortui* ve *Virgibacillus salexigens* gibi bazılarının tuz yokluğunda yaşayamadığı bildirilmiştir (Arahal et al., 1999; De Vos et al., 2009).

Tam 16S rDNA bölgesi analizinin ise yeni bir izolatı tanımlamada kullanışlı olacağı ancak yine de bunu doğrulamak için DNA-DNA hibridizasyonunun gerekli olduğu bildirilmiştir (Stackebrandt et al., 2002). Tek başına fenotipik verilerin identifikasyonda kullanılamayacağı nedeninin ise diğer aerobik endospor oluşturan bakterilerin bu cinsle pek çok fenotipik özelliği paylaştığı bulunmuştur. Ayrıca zayıf reaksiyon veren türlerin de mevcut olması ve testlere ve API testlerine NaCl katılmasının gerekliliği de yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır (De Vos et al., 2009).

2.2.15 *Virgibacillus marismortui*

Ölü Deniz'den alınan suların depolanmış zenginleştirme kültürlerinden elde edildiği için latince ölü deniz anlamına gelen marismortui olarak adlandırılan bu türün; zorunlu aerobik, hareketli, Gram pozitif basil, 0,5-0,7 x 2,0-3,6 µm olduğu tek tek, çiftler halinde ya da kısa zincirler halinde bulunduğu, oval endosporlara sahip olduğu ve sporların terminal veya subterminal pozisyonlarda görülebildiği bildirilmiştir. Kolonilerinin krem renkli, dairesel, bütün ve opak, % 5-25 (w/v) NaCl aralığında büyüebildiği optimum ise % 10 (w/v) NaCl'de gelişebildiği, tuz yokluğunda büyümenin gerçekleşmediği bildirilmiştir. Optimum olarak 37°C olmak üzere gelişebildiği sıcaklık aralığının 15-50 °C olduğu, gelişebildiği pH aralığının pH 6,0-9,0 arası olduğu optimum ise pH 7,5 olduğu bildirilmiştir. Oksidaz pozitif olduğu, asit üretiminin D-fruktoz, D-glukoz, gliserol, ve maltozda olduğu ancak D-arabinoz, D-galaktoz, laktoz, D-mannitol, sükroz, D-trehaloz, veya D-ksilozda olmadığı bildirilmiştir. Kazein, DNA ve jelatini hidrolizleme kapasitesine sahip olduğu ve nişasta ve tween 80'i hidrolizleme kapasitesinin bulunmadığı bildirilmiştir. Üreaz-pozitif, metil red pozitif, nitratın nitrite indirgenmesinin pozitif olduğu, ancak arginin dihidrolaz, simon sitrat, H₂S üretimi, fenilalanin deaminaz testlerinin negatif olduğu ve D-fruktoz, inulin, maltoz, D-mannitol, D-mannoz, piruvat, D-raffinaz, d-ramnoz ve süksinatı tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiği kloramfenikol, eritromisin, penisilin G, streptomisin ve tetrasikline duyarlı olduğu; nalidiksik asit, neomisin, novobiyosin ve rifampine ise dirençli olduğu bildirilmiştir. Ana yağ asitlerinin kütlece % 10'dan büyük olan yağ asitleri olarak C15:0 ante ve C15:0 iso olduğu

bildirilmiştir. DNA Guanin + Sitozin içeriğinin % 40,7 mol olduğu bildirilmiştir (Essghaier et al., 2009).

2.2.16 *Kocuria* sp. genel özellikleri

Şube XXVI: “*Actinobacteria*”

Sınıf I: “*Actinobacteria*”

Takım X: *Micrococcales*AL

Aile I: *Micrococcaceae*AL

Genus V: *Kocuria* VP

Tür I: *Kocuria rosea*

Takım XIV: *Streptomycetales*

Aile I: *Streptomycetaceae*

Genus I: *Streptomyces*

Tür I: *Streptomyces smyrnaeus*

Kocuria, bu türü bulan bilim adamının soyadı verilerek isimlendirilmiştir. Kokkoid hücrelere sahip gram pozitif, kapsül ve endospor oluşturmayan, hareketsiz, kemoorganotrofik, zorunlu aerobik olup sadece bir suşu biraz fakültatif anaerobik olduğu bildirilmiştir. Katalaz pozitif halofilik olmadıkları ve mezofilik oldukları bildirilmiştir. Peptidoglikan tipi A3a (l-Lys-l-Ala³⁻⁴) olduğu mikolik asit ve teikoik asit üretmedikleri ana solunum kinonlarının ise hidrojenlenmiş menakinonlar olduğu yani MK-7 (H₂), MK-8, veya MK-9 (H₂)’un tek başına veya kombinasyon halinde olduğu bildirilmiştir. Polar lipidleri difosfatidilgliserol ve fosfatidilgliserol olduğu bir türde fosfatidilinositol olduğu ana yağ asitlerinin ise C15:0 anteiso olduğu bildirilmiştir. DNA Guanin + Sitozin içeriğinin % 66–75 mol arasında olduğu, tip türünün ise *Kocuria rosea* olduğu bildirilmiştir. *Kocuria* türlerinin kemotaksonomik özelliklerinin büyük çoğunluğu birbirine benzer bulunmuşken birbirlerinden çoğunlukla bu markırların kantitatif kompozisyonları bakımından farklı olduğu öne sürülmüştür. Tuza toleransları değişken olup çoğu suşları % 5 (w/v) NaCl tolere edebildikleri bildirilmiştir ve sadece bir suşun % 15 (w/v) NaCl’ü tolere ettiği bildirilmiştir. pH aralığı olarak ise sıklıkla biraz alkalifilik oldukları pH 5-12’de yaşayabilen *Kocuria aegyptia* ile pH 7–12’de yaşayabilen *Kocuria polaris* olduğu bildirilmiştir (Reddy et al.,

2003). Tüm türlerinin bir ya da daha fazla karbohidrat kaynağından asit üretebildikleri ve bu özellikleriyle *Micrococcus* türlerinden ayrıldıkları bildirilmiştir. (Stackebrandt, Koch, Gvozdiak and Schumann, 1995). Çoğu türünün DNA ve nişastayı degrade edemediği, jelatinin ise bazı türlerce hidrolizlendiği bildirilmiştir. Esteraz ve lipaz reaksiyonlarının türler arasında farklılık gösterdiği tween 80'inin çoğu durumda kullanılmadığı bildirilmiştir. Karbohidrat dissimilasyonu ile ilgili yol izleri hakkında bilgi olmadığı bildirilmiştir. Pigmentlerinin UV'ye karşı koruyucu etkileri olduğu ve kokkoid yapılarının da zor koşullara dayanıklılık sağladığı bildirilmiştir (Goodfellow et al., 2012).

2.2.17 *Kocuria rosea*

Latince gül gibi anlamına gelen rosea olarak adlandırılan bu bakterinin küresel 1,0-1,5 µm çapında hücrelere sahip çift, tetrat ya da kümeler halinde oldukları bildirilmiştir. Kolonileri dairesel, biraz konveks, düz ara sıra rough ve pembe veya kırmızı renkte olup suda çözünmeyen ekzopigment üretilmediği koloni morfolojisi ve renginin yaşla birlikte çok farklılaştığı ancak hücre morfolojisinin kültüre yaşa ve ortama bağlı olmadığı bildirilmiştir. Büyümesi için ortamda; sistein, tiamin veya sistein, tiamin, pantotenik asit bulunmalıdır. Nutrient brothda orta bulanıklık ve bir çökeltiyle büyüme hali gözlemlendiği bildirilmiştir. Bazı suşların yüzey halkası ve pellicle oluşturduğu % 7,5 (w/v) NaCl'a kadar iyi gelişebildikleri oksidazın negatif olduğu ve nadiren zayıf pozitif olabildiği benzidin testinin pozitif olduğu, nitrat indirgenmesinin pozitif veya zayıf pozitif olduğu; arginine dihidrolaz, fenilalanin deaminaz, üreaz, lesitinaz, fosfataz, b-galaktozidaz, koagulazın negatif olduğu bildirilmiştir. İnorganik nitrogen agarda ve Simons sitrat agarda çoğu suşun büyümediği, eskülin hidrolizi ve jelatin hidrolizinin negatif olduğu tween 80 ve nişasta hidrolizinin değişken olduğu, Asetoin üretiminin negatif ya da zayıf olduğu, indol ve H₂S üretilmediği bildirilmiştir. Çoğunun ramnozu, ksilozu, glusitolü kullanabildiği ve mannoz, galaktoz, laktoz, gliserolden asit oluşturamadığı bildirilmiştir. Glukozdan asit oluşumunun ise değişken olduğu bildirilmiştir. Optimum büyüme sıcaklığının 25-37 °C arasında olduğu, tetrasiklin, eritromisin, oleandomisin, novobiyosin, metisilin, kanamisin, polimiksin, vankomisin, penisilin G, streptomisin,

kloramfenikol, ve neomisine duyarlı olduğu, lizozoma ya az dirençli ya da dirençli olduğu bildirilmiştir. Saprofitik oldukları ancak hemolitik olmadıkları bildirilmiştir. Sitokrom *aa3*, *c550*, *c557*, *b564*, ve *d626*'a sahip oldukları da bildirilmiştir. DNA Guanin + Sitozin içeriğinin % 66–75 mol arasında olduğu bildirilmiştir. (Stackebrandt et al., 1995; Goodfellow et al., 2012).

2.2.18 *Streptomyces smyrnaeus* gen. nov. genel özellikleri

Tatar ve arkadaşları (2014) tarafından *Streptomyces smyrnaeus*'un İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan ilk defa izole edilmiş bir aktinomiset türü olarak aerobik, Gram-pozitif ve asit-fast negatif bir aktinomiset türü olarak pH 4,0-12,0 arasında ve 28-45°C arasında yaşayabilen ancak 4, 10, 50 veya 55 °C'de yaşamayan bu türün nitrat indirgenmesi negatif; adenin, nişasta, tween 40 ve tween 80 hidrolizinin pozitif, ancak kazein ve ksantin hidrolizinin negatif olduğu bildirilmiştir. Arbutin ve allantoin hidrolizi pozitif, üre hidrolizi negatif bulunmuştur. Adonitol, L-arabinoz, sellobiyoz, D-fruktoz, D-galaktoz, D-sorbitol, D-mannitol, D-mannoz, laktoz, maltoz, sükroz, dekstrin, inulin, ksilitol, ksiloz, süksinik asit tek karbon kaynağı olarak kullanılmakta ancak D-arabinoz, dekstran, L-sorboz, L glutamik asit kullanılamamakta olduğu bildirilmiştir. İzolösin, glisin, L-alanin, L-arginin, hidroksi-L-prolin, L-treonin, L-prolin, L-serin ve L-valin tek azot kaynağı olarak kullanılabildiği ancak L-fenilalanin, L-metiyonin, L-histidin veya L-sisteinin kullanılmadığı bildirilmiştir. MK-9 (H8) ve MK-9 (H6) içerdiği, anteiso-C15:0, anteiso-C17:0 ve iso-C16:0 içerdiği bildirilmiştir. Polar lipid profili ise difosfotidilgliserol, fosfotidilgliserol, fosfotidilinositol, fosfatidiletanolamin, 3 adet tanımlanamış atipik aminolipid, bir adet tanımlanamamış aminolipid ve iki adet tanımlanamamış glikolipid mevcut olduğu da bildirilmiştir (Tatar et al., 2014).

2.3 Poliektremofiller

Yaşamın fiziksel ve kimyasal sınırlarını belirlemek bilim insanları tarafından daima merak duyulan konular arasında olmuştur. Çoğunlukla ise ekstrem koşulların neler olduğu ve bu koşullarda yaşamın nasıl sürdürüldüğü üzerinde durulmuştur. Tuzlu ortamlarda NaCl başta olmak üzere sodyum

tuzlarının doygunluk konsantrasyonlarında büyüme durumlarının var olması ile sıcaklık arttırıldığında dolayısıyla tuzun çözünürlüğünde artış meydana geldiğinde mikroorganizmaların büyüme durumunda nasıl bir değişim olacağı soruları akla gelmiş ve bu koşullar altında bakteri biyoçeşitliliğinin nasıl olacağı soruları gündeme gelmiştir. Fiziksel, jeokimyasal ve biyolojik faktörlerin organizmaların büyümesini ve fonksiyonunu sınırlayan en önemli etmenler arasında yer aldığı bilinmektedir (Rothschild and Mancinelli, 2001; Dartnell, 2011). Bu faktörler içerisinde ilk olarak sıvı suyun bulunması, fotonlar aracılığıyla ve/veya kimyasal kaynaklardan enerjinin eldesi, besin maddeleri ve iz elementlerin bulunup bulunmaması büyük önem taşımaktadır. Yine uygun sıcaklık, pH, tuzluluk ve basınç yaşanılabilir alanı tanımlayan diğer parametreler arasında yer almaktadır (Baross, 2007). Mikrobiyal ekstremofil araştırmalarıyla 30 yılı aşkın bir süreden beri yaşanabilir sınırları belirlemede çok yol kat edilmiştir. Uzay araştırmaları sırasında hücre büyümesi ve metabolizması için gerekli biyolojik prosesler de belirlenmiştir (Rothschild and Mancinelli, 2001; Baross, 2007; Pikuta and Hoover, 2007; Canganella and Wiegel, 2011; Stan-Lotter, 2012; Harrison et al., 2013). Çevresel strese toleransın sınırlarını belirlemek evrim, farklılaşma, yaşamın zaman içinde ilerlemesi ve diğer gezegenlerde yaşanabilir alanların varlığının araştırılması açısından bilgi verici olmakta sonuçlarının ise biyoteknolojide kullanılma avantajı da oluşturduğu bilinmektedir (Horneck et al., 2010).

Mikrobiyal ekstremofil araştırmalarının sonucu olarak ikiden fazla ekstrem koşulu tolere edebilen bazı ekstremofillerin *Poliekstremofiller* olarak adlandırılması gerektiği önerilmiştir (Mesbah and Wiegel, 2008; Mesbah and Wiegel, 2012; Bowers, and Wiegel, 2011; Harrison et al., 2013'den). Ekstrem halofilik bakterilerin % 10 (w/v) NaCl ve 1,7 M Na⁺ konsantrasyonuna eşlenik tuz konsantrasyonlarında ya da daha üst konsantrasyonlarda optimum olarak büyüeyebilen bakteriler olduğu fakat bu bakterilerin aynı zamanda pH 8,5'in üstü gibi alkali pH'da optimum büyüeyebilen, optimum olarak 50 °C' nin üstündeki yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen ve yüksek tuz toleransına sahip oldukları bulunduğundan yakın zamanda bu ekstrem halofilik bakterilerin yeniden adlandırılması gerektiği fikri ortaya atılarak üç koşula da optimum büyüeyebilmesi için gereksinim duyan mikroorganizmalar için *Poliekstremofiller* kavramının kullanılması gerektiği önerilmiştir. *Poliekstremofiller*, erken evlasyonel süreçte

ve dünya dışı yaşam formlarının olası özelliklerini yansıtabilecek adaptif mekanizmalarının araştırılması açısından oldukça önemli görülmektedir (Bowers et al., 2009). Minimum, optimum ve maksimum büyüme durumları görüntülenerek sıcaklık, tuzluluk, pH ve radyasyona toleranslarına ilişkin bilgiler dünya dışı yaşam koşullarının belirlenmesine de yol açması açısından önem taşımaktadır (Harrison et al., 2013).

Çeşitli fizyolojik ve besinsel özelliklere sahip ve farklı filogenetik gruplar arasında dağılmış olan ekstrem halofilik türlerin çoğunun mezofilik veya nötrofilik olmasına karşın, ılımlı termofilik ve de pek çok alkalifilik ekstrem halofiller de açıklanmıştır. Bu organizmalar örneğin alkalifilik halofiller teriminde olduğu gibi tolere edebildikleri ekstrem koşullarla birlikte anılmakta, çok az sayıda ekstrem halofillerin alkali koşullar altında optimum büyüyebildiği ama aynı zamanda da yüksek sıcaklıkta büyüyebildikleri belirlenmiştir. Ekstrem halofilik bakteri olup hem alkali pH'da (pH 8,5 üstünde) optimum hem de yüksek sıcaklıkta (50 °C üstünde) optimum büyüyeabilenler üç ekstrem koşulda birden optimum büyüyebilmelerinden ötürü *Poliektremofiller* olarak adlandırılmaktadır. Daha önce yaşam için sınırlayıcı olan poliektremofilik koşulların, erken evrimsel ve dünya dışı yaşam formlarının olası özelliklerini belirleyebilmek açısından büyük önem taşımaktadır. Halofili, alkalifili ve/veya termofili arasında korelasyon olup olmadığı, diğer ekstrem büyüme koşullarıyla arasında ne dereceye kadar etkileşim olduğu yüksek sıcaklık optimumunun aynı zamanda daha az alkali pH'yı veya daha düşük sodyum tuz konsantrasyonunu mu gerektirdiği araştırılmıştır (Bowers et al., 2009).

Çizelge 2.5 Ekstremofillerin Büyüme Karakteristikleri

Büyüme	Minimum	Optimum	Maksimum
Halotolerant	-	$[Na^+] < 0,2 \text{ M}$	$[Na^+] > 0,2 \text{ M}$
Halofilik	$0,2 \text{ M} \leq [Na^+]$	$0,2 \text{ M} < [Na^+] < 1,7 \text{ M}$	-
Ekstrem	$0,2 \text{ M} \leq [Na^+]$	$1,7 \text{ M} \leq [Na^+]$	-
Alkalitolerant	$6,0 \leq \text{pH}$	$\text{pH} < 8,5$	$\text{pH} > 9,0$
Fakültatif Alkalifilik	$\text{pH} < 7,5$	$8,5 \leq \text{pH}$	-
Zorunlu Alkalifilik	$7,5 \leq \text{pH}$	$8,5 \leq \text{pH}$	$10 \leq \text{pH}$
Termotolerant	-	$T < 50 \text{ }^\circ\text{C}$	$T > 50 \text{ }^\circ\text{C}$
Termofilik	-	$50 \text{ }^\circ\text{C} \leq T$	$T > 55 \text{ }^\circ\text{C}$

-pH, optimum büyüme sıcaklığında ölçülmelidir. - anlamı sınırsız demektir (Bowers et al., 2009).

Alkalifilik türlerde pH 8,5'in üstünde tersine çevrilmiş pH gradienti ve böylelikle suboptimal proton motif güç gibi enerjitik problemler taşımaktadırlar. Ekstrem halofilik alkalifillerde bu problem hücre içi sodyum konsantrasyonunu toksik düzeylerin altında tutmak için ki bu birkaç mM kadardır daha büyük bir efor sarf etmesini gerektirmektedir. Genel olarak anaerobik ve aerobik haloalkalifiller benzer olduğu ve ilginç olarak $[Na^+]$ optimum 2,5 M ve optimum pH 8,5'dan büyük olanların obligat anaerobik olup fermentatif bir metabolizmaya sahip oldukları tespit edilmiştir. 50 °C üstünde gelişen termofillerde hücre membranının protonların diffüzyonuna karşı daha geçirgen olduğu ve artan Na^+ diffüzyonu olduğu hücre içi konsantrasyonunu milimolar düzeyde tutmanın oldukça zor hale geldiği tespit edilmiştir. Halofilikler içinde termofilik olanlarının optimum 50 °C ve üstünde gelişebildikleri, termotolerantların ise 46-48 °C'de optimum gelişebildikleri bildirilmiştir. İki tane türün aerob geri kalanlarının ise anaerob olduğu bilinmektedir (Bowers et al., 2009). Çoklu ekstrem koşulları sadece tolere edebilen değil aynı zamanda bu koşullarda iyi gelişebilen bakteriler çoklu ekstrem koşullarda yaşamın sınırlarını keşfetmek açısından büyük olanak sağlamaktadır. Bu durumun çok sayıda adaptif mekanizmalara sahip olabildikleri için gerçekleyen bakterilerde halofilik koşullar altında pH adaptasyonu için sitoplazmik asidifikasyon çoklu monovalent katyon proton antiportörleriyle çeşitli pH aralıklarında kullanılarak sağlamaktadır (Padan et al., 2001; Bowers et al., 2009).

2.4 Tür Tanımlanması

1. **Morfolojik testler:** Gram reaksiyonu, hücre şekli, koloni rengi ve morfolojisi türleri ayırt etmede kullanılmaktadır (Smibert and Krieg, 1994).
2. **16S rRNA gen analizi:** En azından cins düzeyinde bilgi verici olması açısından genomik DNA'nın izolasyonu ile universal primerlerle 16S bölgesi çoğaltılarak DNA dizi analizi yapılarak NCBI Gen Bankasında BLAST analizi yapılarak hangi türe ve cinse yakın olduğu tespit edilmiş olur (Woese, 1987).
3. **Total hücre yağ asidi profilin çıkartılması (FAME):** Total hücre yağ asidi hücredeki toplam yağların önce yağ asidine dönüştürülmesinin ardından metil grubunun eklenmesi ile ucucu hale getirilerek GC/MS'de analiz edilmesine dayalı olarak oluşan piklerin uzunluğundan ve yüzdesinden hücredeki belirgin yağ asidi profillerinin çıkartılması ile tür tayini yapılabilmektedir (Pabba et al., 2011).
4. **Biyokimyasal testler:** Tür tanımlanmasında önemlidir. Özellikle 16S rRNA gen sonuçlarının benzer çıktığı türlerde literatüre göre karşılaştırma yapmak için biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Bu sayede farklı çıkan özelliklerle türlerin birbirinden farkı ortaya konabilmektedir.
5. **Diğer testler:** Polar lipid analizi, membran kinon analizi, DNA Guanin + Sitozin % mol oranının belirlenmesi testleri de önemlidir.

3. MATERİYAL METOD

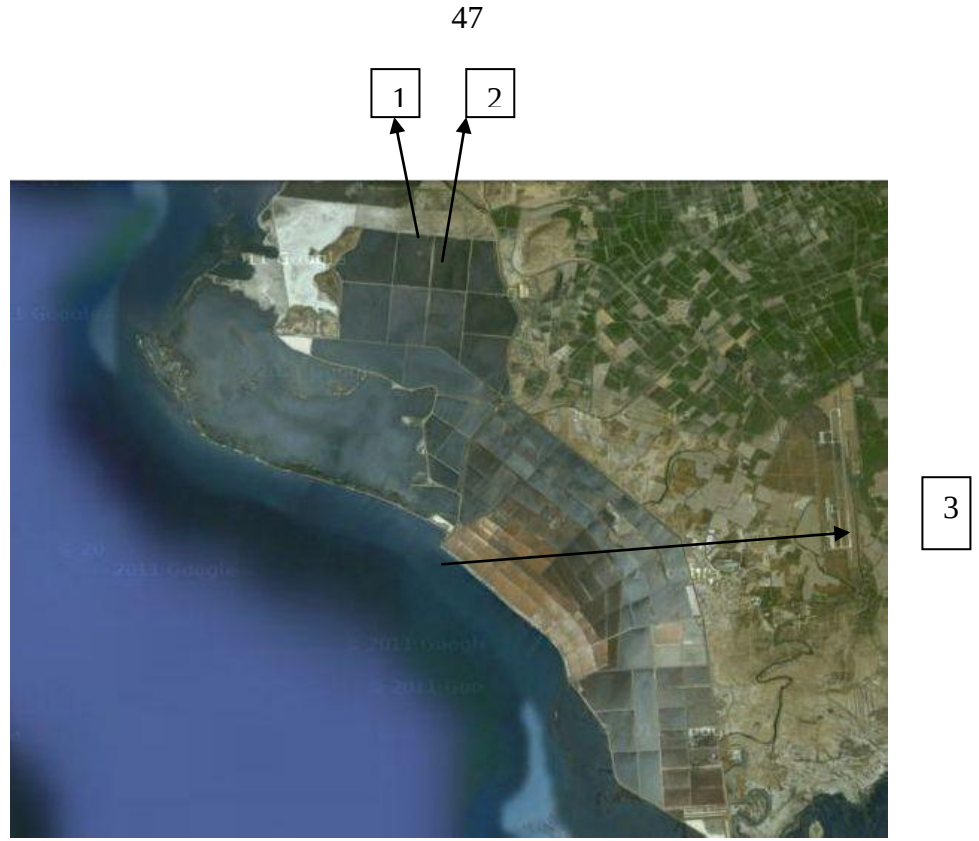
3.1 Halofilik Mikroorganizma İzolasyon Kaynakları

İzmir Çamaltı Tuzlası tuz yığımından tuz örneği ve tuzlu su havuzundan su örneği (% 26,5 Bome değeri) Kasım 2011’de, İzmir Kuş Cenneti tuzlu su havuzundan su örneği Mart 2011’de aseptik koşullarda toplanmıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3). 6 saat içinde laboratuvara getirilen örnekler izolasyon yapıncaya kadar +4 °C’de tutulmuştur. Konya ilinde bulunan Meke Gölü’nden tuz örneği ve su örneği Temmuz 2011’de toplanmıştır. Ticari salamura Himalaya tuzu, Cihanbeyli-Konya ticari salamura tuzu, Billur Tuz ticari salamura tuzu, Denizli Acıgöl ticari salamura tuzu ise satın alınarak eş zamanlı olarak izolasyona alınmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Saflaştırma yapılan tuz kaynaklarına ilişkin bilgiler

İzolatlar	İzolasyon Kaynağı	Örnek Alım Tarihi	GPS Verileri	Tuz Konsantrasyonu
CS-4 CS-5	İzmir Çamaltı Tuzlası Tuzlu Su Havuzu	2-Kasım-2011	38°49’99’’K 26°89’63’’D	Bome değeri % 26,5
CT-2 CT-3 CT-4 CT-5 CT-6	İzmir Çamaltı Tuzlası Tuz yığını	2-Kasım-2011	38°29’17’’K 26°54’33’’D	Katı tuz
HT-9	Ticari Himalaya tuz örneği	2-Kasım-2011	-	Katı tuz
KC-2	İzmir Kuş Cenneti Tuzlu su havuzu	3-Mart-2011	38°33’54’’K 26°53’42’’D	Deniz suyu
KC-101	İzmir Kuş Cenneti Tuzlu su havuzu	3-Mart-2011	38°31’54’’K 26°53’42’’D	Deniz suyu

Ek.1 Bome değeri örnek alım sırasında toplam tuzluluk değerinin ölçülmesi sonucu elde edilmektedir.

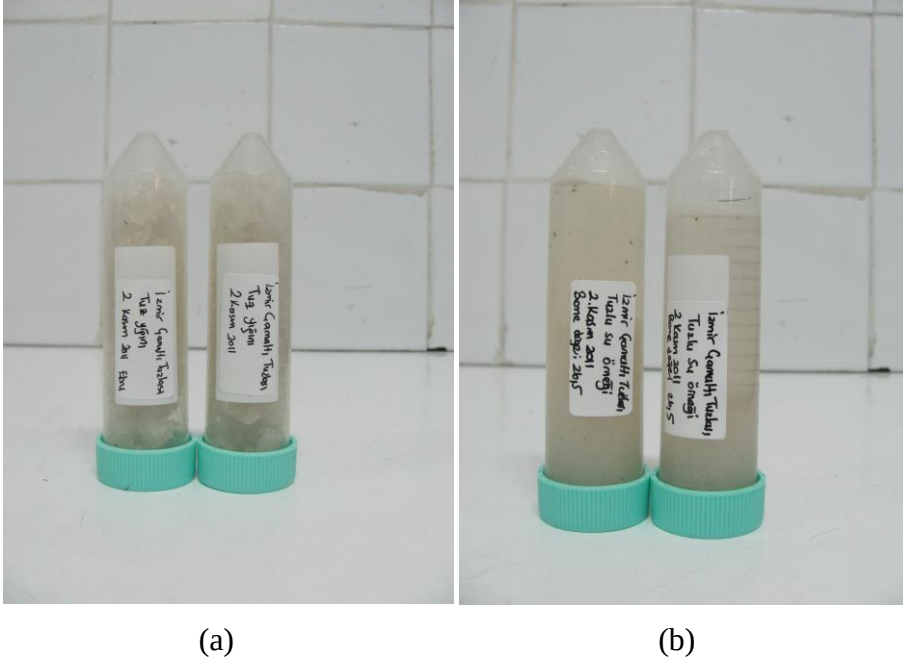


(a)



(b)

Şekil 3.1 (a) İzmir Çamaltı Tuzlası ve İzmir Kuş Cenneti uydu görünümü (Kaynak: Google Earth)
1. Bölge: Örnek alınan İzmir Kuş Cenneti tuzlu su havuzu, 2. Bölge: Örnek alınan İzmir Kuş Cenneti tuzlu su havuzu, 3. Bölge: Örnek alınan İzmir Çamaltı Tuzlası tuzlu su havuzu (b) Örnek alınan Meke Gölü görünümü (Temmuz 2011)



Şekil 3.2 İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan toplanan (a) tuz yığını ve (b) tuzlu su örnekleri



Şekil 3.3 İzmir Kuş Cenneti tuzlu su havuzlarından toplanan I. Bölge ve II. Bölgeye ait su örnekleri

3.2 İzmir Çamaltı Tuzlası, Meke Gölü Örnekleri ile Ticari Salamura Tuz Örneklerinden Halofilik Bakteri İzolasyon ve Saflaştırma Metodları

İzmir Çamaltı Tuzlası tuzlu su havuzu ve tuz yığını örneklerinden, Meke Gölü tuzlu su ve tuz yığını örneğinden ve ticari salamura tuz örneklerinden (Cihanbeyli-Konya, Acıgöl-Denizli, Billur Tuz-İzmir, Himalaya tuzu) *Halomonadaceae* familyasına özgü ılımlı halofilik bakteriler için oldukça seçici bir besiyeri olarak öne sürülen HM (Halophile moderately) sıvı besiyeri kullanılarak izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Steril koşullar altında; katı tuz örneği 0,5 gr, tuzlu su örneği 0,5 ml eppendorf tüplere aktarılıp üzerlerine 0,5'er ml % 17,8 (w/v) NaCl içeren HM sıvı besiyeri eklenip kısa bir süre vortekslenerek 0,2'şer mililitreleri alınıp 100'er ml HM sıvı besiyerine aktarılmıştır (Ventosa et al., 1982). 30 °C'de 3 gün statik olarak inkübe edilmiştir. 3. günde 0,1'er ml örnek alınıp 0,9'ar ml seyreltme suları ile 10^{-6} 'ya kadar seyreltilerek 100'er µl % 5 (w/v) total tuz içeren HM agar besiyeri petri yüzeylerine, L bagetin her defasında % 96'lık alkole batırılıp bek aleviyle yakarak steril edilmesinin ardından yüzeye yayma tekniği ile yayılmıştır. Farklı kolonilerden steril özeyle alınıp % 5 (w/v) total tuz içeren HM agar petrilerine çizgi ekimleri yapılmıştır. Tek düşmüş farklı renk ve morfolojideki koloniler seçilerek sıvı kültüre alınmıştır ve % 5 (w/v) total tuz içeren HM agar besiyeri yüzeyine spotlama yapılmıştır. Tek kolonilerden 1 öze dolusu alınıp % 5 (w/v) NaCl içeren 9'ar ml pH 7'ye NaHCO₃ ile ayarlanmış seyreltme sularında seyreltilerek 10^{-5} seyreltme sularından seyreltme ve yayma plaka tekniği uygulanarak % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerine ekim yapılmıştır. 30 °C'de 2 gün inkübasyondan sonra her seferinde özeyi yakma tekniği ile sürekli çizgi ekimi uygulanarak saflaştırılmıştır.

3.3 İzmir Kuş Cenneti Tuzlu Su Örneklerinden Halofilik Bakteri İzolasyon ve Saflaştırma Metodları

İzmir Kuş Cenneti'nde bulunan deniz suyu içeren iki adet havuzdan aseptik koşullarda alınan 50'şer ml su örneği laboratuvara getirilmiş ve işlem yapılıncaya kadar +4 °C'de tutulmuştur. İzolasyon işlemi deniz suyu kökenli örnekler olması sebebiyle yüksek tuz konsantrasyonuna sahip SW-25 sıvı besiyerlerinde

gerçekleştirilmiştir (Nieto et al., 1989). 50'şer ml SW-25 sıvı besiyeri içeren erlenlere 5'er ml tuzlu su örnekleri ve 5'er ml'lik SW-25 sıvı besiyeri içeren cam tüplerine 100'er µl tuzlu su örnekleri aktarılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından % 17,8 (w/v) NaCl içeren HM seçici besiyerine her seferinde özeyi yakarak çizgi ekimleri yapılmıştır. Yüksek tuz konsantrasyonda gelişebilen koloniler tek tek alınarak % 10 (w/v) total tuz içeren MH agar besiyerine çizgi ekimi yapılmıştır. Çizgi ekimi sonucu gram boyama yapıp karışık olduğu gözlenen koloniler tek tek alınarak 10 ml % 10 (w/v) NaCl içeren (pH 7,5) seyreltme sularında homojenize edilip 1'er ml'leri 9'ar ml seyreltme sularına 10^{-6} 'ya kadar seyreltilip 10^{-4} ve sonrası seyreltme suları % 10 (w/v) total tuz içeren MH agar besiyerine seyreltme plaka tekniği ile ekilmiştir. Buradan alınan tek koloniler 5'er ml'lik % 10 (w/v) total tuz içeren MH sıvı besiyeri içeren kapaklı cam tüplerine aktarılmıştır. Gram boyama yapılarak saflık kontrolü yapılmıştır. Halen karışık görünen koloniler steril özeyle tek tek alınarak % 10 (w/v) NaCl içeren steril seyreltme suları (pH 7,5) ile 10^{-6} 'ya kadar seyreltme yapıp 10^{-4} ve sonrası seyreltme sularından % 10 (w/v) total tuz içeren MH agar içeren petrilere yayma plaka tekniği ile 100'er µl yayılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Koloniler tek tek steril özeyle alınıp % 5 (w/v) total tuz içeren MH agar petrilere saflaşana kadar çizgi ekimi yapılmıştır (Mata et al., 2002). Gram boyama ile saflıkları kontrol edilmiş ve halen karışık olduğu tespit edilince çok düşük miktarda örnek aktarımı amacıyla katı besiyerine spotlama tekniği ile 1'er µl kültürlerden spotlanma yapılmıştır. Spotlama sonucunda çok az miktarda örnek alınıp çizgi ekimi koloniler saflaşınca kadar devam edilmiştir. Ekzopolisakkarit üretici türlerin saflaşması bu şekilde başılamadığı tespit edilince bu kültürler elenmiş ve geri kalan kültürlerin saflaştırılması çalışmasına Marine agarda çizgi ekimi yapılarak devam edilmiştir. Saf olmayan izolatların işlemleri sonlandırılmış saf olduğu tespit edilen izolatlar CT-2, CT-3, CT-4, CT-5, CT-6, CS-4, CS-5, HT-9, KC-2, KC-101 olarak ve işlemler sırasında 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nolu izolatlar olarak kodlanarak biyokimyasal testlere geçilmiştir. Kültürler stoklama amacıyla steril eppendorf tüplerine 500'er µl % 30 gliserol ve 500'er µl % 10 (w/v) total tuz içeren MH sıvı besiyerlerine aktarılıp homojenize edildikten sonra önce +4 °C'de 1 saat tutulmuş ardından -20 °C'ye aktararak stoklanmıştır.

3.4 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

3.4.1 SW-25 besiyeri (% w/v)

NaCl.....	20,25 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	3,725 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	4,925 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,09 g
KCl.....	0,5 g
NaHCO ₃	0,015 g
NaBr.....	0,0065 g
Maya özütü (Difco).....	0,5 g
Distile su.....	100 ml'ye tamamlanır.
pH 7,2	(Nieto et al., 1989)

3.4.2 % 17,8 (w/v) NaCl içeren HM besiyeri

NaCl.....	17,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,036 g
KCl.....	0,2 g
NaHCO ₃	0,006 g
NaBr.....	0,023 g
Proteoz/pepton No:3 (Difco).....	0,5 g
Maya özütü (Difco).....	1,0 g
Glukoz.....	0,1 g
Distile su.....	100 ml'ye tamamlanır.
pH 7,2	(Ventosa et al., 1982)

3.4.3 % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyeri

NaCl.....	4,45 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,025 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,009 g
KCl.....	0,05 g
NaHCO ₃	0,0015 g
NaBr.....	0,0058 g
Proteoz/pepton No:3 (Difco).....	0,5 g
Maya özütü (Difco).....	1,0 g
Glukoz.....	0,1 g
Distile su.....	100 ml'ye tamamlanır.
pH 7,2	(Ventosa et al.,1982)

3.4.4 % 10 (w/v) total tuz içeren MH besiyeri (g/L)

NaCl.....	81,0 g
MgCl ₂	7,0 g
MgSO ₄	9,6 g
CaCl ₂	0,36 g
KCl.....	2 g
NaHCO ₃	0,06 g
NaBr.....	0,026 g
Proteoz/pepton No:3 (Difco).....	5 g
Maya özütü (Difco).....	10 g
Glukoz.....	1 g
Distile su.....	1000 ml'ye tamamlanır.
pH 7,2	(Ventosa et al.,1982)

3.4.5 % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyeri

NaCl.....	4,05 g
MgCl ₂	0,35 g
MgSO ₄	0,48 g
CaCl ₂	0,018 g
KCl.....	0,10 g
NaHCO ₃	0,003 g
NaBr.....	0,0013 g
Proteoz/pepton No:3 (Difco).....	0,5 g
Maya özütü (Difco).....	1,0 g
Glukoz.....	0,1 g
Distile su.....	100 ml'ye tamamlanır.
pH: 7,2	(Ventosa et al.,1982)

3.4.6 Difco™ Marine Agar 2216 (g/L)

Proteoz/pepton No:3 (Difco).....	5,0 g
Maya özütü (Difco).....	1,0 g
Ferrik sitrat.....	0,1 g
Sodyum Klorit.....	19,45 g
Magnezyum Klorit.....	8,8 g
Sodyum Sülfat.....	3,24 g
Kalsiyum Klorit.....	1,8 g
Potasyum Klorit.....	0,55 g
Sodyum bikarbonat.....	0,16 g
Potasyum Bromit.....	0,08 g
Stronsiyum Klorit.....	34,0 mg
Borik Asit.....	22,0 mg
Sodyum Silikat.....	4,0 mg
Sodyum Florit.....	2,4 mg
Amonyum Nitrat.....	1,6 mg
Disodyum Fosfat.....	8,0 mg
Agar.....	15,0 g
Distile su.....	1000 ml'ye tamamlanır.

3.5 Gram Boyama

Kristal viyole, Gram iyodür, Dekolorizasyon sıvısı ve Safranin içeren hazır gram boyama kiti (Merck) kullanılmıştır. Boyama metodu Merck kullanım klavuzuna göre yapılmıştır.

3.5.1 Gram boyama metodu

1. Sıvı kültürden 1 öze dolusu alınarak lam üzerine yayılarak bakteriyal film hazırlanır. Kuruması beklenir.
2. Tamamen kuruyan bakteriyal film bek alevinden 3 kere geçirilerek lama tespit edilir.
3. Lam yüzeyini kaplayacak kadar kristal viyole çözeltisinden damlatılır. 1 dk 30 sn beklenir.
4. Boyanın fazlası akıtılarak suyla yıkanır.
5. Gram iyodür lam yüzeyini kaplayacak şekilde dökülür. 3 dk beklenir.
6. Suyla yıkanır.
7. Lam yüzeyine dekolorizasyon sıvısından dökülerek 10 sn beklenir. Suyla yıkanır.
8. Lam yüzeyine Safranin çözeltisinden dökülerek 1 dk bekletir. Suyla yıkanır.
9. Kurutulur ve görüntü mikroskopta immersiyon yağının kullanımıyla incelenir.

(Merck)

3.6 Biyokimyasal Testler

3.6.1 Kültür ortamı

Biyokimyasal testlerde Mata et al., 2002'den uyarlanan % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyeri; % 4,05 (w/v) NaCl, % 0,35 (w/v) MgCl₂, % 0,48 (w/v) MgSO₄, % 0,018 (w/v), CaCl₂.2H₂O, % 0,1 (w/v) KCl, % 0,003 (w/v) NaHCO₃, % 0,0013 (w/v) NaBr, % 0,5 (w/v) proteoz pepton No:3 (Difco), % 0,5 (w/v) maya özütü (Difco), % 0,1 (w/v) glukoz, pH 7,2'ye 1 N NaOH ve 1 N HCl ile ayarlanarak kullanılmıştır. Katı besiyeri için besiyeri formülizasyonuna % 1,5 (w/v) agar-agar (Mikrobiyolojik) eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri 121 °C'de, 15 dk, 1,1 atm basınçta otoklavda (Hirayama, HV-50 L) steril edildikten sonra kullanılmıştır. pH-metre olarak dijital taşınabilir HQ30d Hach-Lange kullanılmıştır. Distile su cihazından (GFL 2004) elde edilen distile su kullanılarak besiyerleri hazırlanmıştır.

3.6.2 Katalaz testi

Katalaz testi mikroorganizmaların normal metabolik faaliyetleri sonucu açığa çıkan ve kendileri için toksik olan hidrojen peroksit moleküllerini parçalayıp kendileri için daha zararsız hale getirmelerini sağlayan ve reaksiyon sonucu hidrojen peroksiti oksijene ve suya dönüştürmek için ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) gerekli katalaz enzimine sahip olup olmadığını tespit etmemizi sağlayan bir testtir. Testin sonucunun pozitif olarak değerlendirilmesi için koloni yüzeyinde köpürmenin olması yani oksijenin açığa çıkması, testin sonucunun negatif olarak değerlendirilebilmesi için ise köpürmenin olmaması gerekmektedir (Arda, 2006) % 5 (w/v) total tuz içeren MH agar besiyeri dökülmüş petri yüzeylerine mikropipetle 15'er µl spotlanarak yetiştirilen 24 saatlik her bir kültür üzerine % 3 (v/v) hidrojen peroksit içeren oksijenli su damlatılarak köpürme oluşumunun olup olmasına pozitif veya negatif olarak değerlendirilmiştir (Mata et al., 2002).

3.6.3 Oksidaz testi

Oksidaz testi mikroorganizmanın oksijenli solunumda son elektron alıcısı olarak oksijene elektronların transferini gerçekleştiren ve reaksiyon sonucu ya suyun ya da hidrojen peroksitin oluşmasına yol açan enzim olan sitokrom c oksidaza sahip olup olmadığını test etmede kullanılmaktadır. Bu enzimin varlığını test etmek için redoks indikatörü *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilendiamin dihidroklorid (TMFD) kullanılarak hazırlanan çözeltide başlangıç rengi renksizken mikroorganizma ile karşılaştığında oluşan renk kırmızı mavi olması testin sonucunun pozitif olduğunu yani oksidaz enzimine sahip olduğunu göstermektedir (Kovács, 1956). Yalancı pozitif olmasını önlemek için besiyerinde glukoz ve nitrat katılmamıştır. Glukoz içermeyen steril % 5 (w/v) total tuz içeren MH agar katı besiyeri yüzeyine 15'er µl spotlanmış 24 saatlik kültürlerin üzerine mikropipetle taze hazırlanmış % 0,1 (w/v) askorbik asit katılan % 0,5 (w/v) TMFD çözeltisinden damlatılmış ve 1 dakika içinde renk değişimi olup olmadığına bakılarak mora yakın renk varsa pozitif yoksa negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Bacillus cereus*, negatif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* kullanılmıştır (Arda, 2006).

3.6.4 Nitrat indirgenmesi

Nitrat indirgenmesi testi esasında mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucu besiyerinde bulunan nitratı nitrite indirgeyip indirgemediğini test etmede kullanılmaktadır. Bu testin gerçekleştirilmesi için besiyeri formülünden KCl çıkartılan % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerine % 0,2 (w/v) KNO₃ katılarak oluşturulan sıvı % 5 (w/v) total tuz içeren MH sıvı besiyeri içerisinde ters çevrili halde konulan durham tüpü ile 5'er ml besiyeri içeren uzun pamuklu tüpler kullanılmıştır. % 5 (w/v) total tuz içeren MH sıvı besiyerinde 37 °C'de 24 saat aktive edilen 10 izolata ait kültürler, her bir aktif kültürden biri 1 ml steril mineral yağla anaerobik diğeri ise aerobik olmak üzere iki test tüpüne 100'er µl aktarıldıktan sonra 5 gün inkübasyonda tutulmuştur. Durham tüplerinde gaz oluşumu olup olmadığı kaydedildikten sonra nitratın nitrite indirgenip indirgenmediği taze hazırlanmış naftilamin ve sülfanilik asit ayraçlarından 5 damla naftilamin ve 5 damla sülfanilik asit damlatılmak suretiyle renk değişiminin

koyu kırmızı yada kırmızıya yakın renk olup olmamasına göre pozitif, boş besiyeri reaktiflerin damlatılmasıyla oluşan renk olan krem benzeri rengin olması negatif değerlendirilmiştir (Mata et al., 2002).

3.6.5 Kazein hidrolizi

Mikroorganizmaların kazeinin parçalanmasından sorumlu hücre dışına salgılanan proteaz enzimine sahip olup olmadığını test etmek amacıyla yapılan bir testtir. Mikroorganizmanın gelişebileceği besiyeri içeriğine yağsız süt tozu belli oranda eklenerek (% 3 (w/v) besiyeri opaklaştırılmaktadır. Bu enzimi üreten mikroorganizmalar çevresinde şeffaf açık bir bölge oluşumu testin pozitif olduğunu, opak bölgenin değişmemesi ise testin negatif olduğunu göstermektedir. Testin gerçekleştirilmesinde kullanılan % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinin % 5 (w/v) total tuz içeriği ve % 0,5 (w/v) yeast ekstrakt içerecek şekilde düzenlenmiştir. Besiyerinin sterilizasyonu iki ayrı aşamada gerçekleştirilmiştir. Birincisi içinde tuz çözeltisinin olduğu yeast ekstrakt içeren ve agarın olduğu MH agar bileşenlerinin sterilizasyonudur. Bu bileşenler tartılarak yarı hacim su eklenip pH 7,5'a ayarlandıktan sonra % 1,5 (w/v) agar ilave edilip 121 °C'de 15 dk 1,1 atm'de steril edilmiştir. İkinci aşama ise başka bir erlende yağsız süt tozu (% 3, w/v) oranında tartılarak üzerine geri kalan yarı hacim distile su eklenerek pH'sı 7,5'e ayarlandıktan sonra yağsız süt tozunun çökelmeyeceği sıcaklık koşullarında (120 °C 5 dk) tutulmuştur. İki ayrı karışım 65 °C'de 24 saat bekletilip yağsız süt tozu karışımında herhangi bir üreme olup olmadığı kontrol edildikten sonra iki ayrı karışım aynı sıcaklıkta ve köpük oluşturmayacak şekilde karıştırılarak steril plastik petrilere yaklaşık 20'şer ml paylaştırılmıştır. Donan besiyeri bir gün oda sıcaklığında tutularak üzerindeki suyun buharlaşması için ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının gözlenmesi için bekletildikten sonra spotlama tekniği ile bir petriye % 5 (w/v) total tuz içeren MH sıvı besiyerinde 24 saat büyütülen izolatlardan 15'er µl 1 petriye 4 izolat olmak üzere spotlanarak 37 °C'de 2 gün inkübe edilmiştir. Opak olan besiyerini ekim hattı boyunca şeffaf hale getiren izolatlar proteaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Mata et al., 2002).

3.6.6 Nişasta hidrolizi

Nişasta hidrolizi, nişasta polisakkaritini parçalayan amilaz enzimini üretebilen mikroorganizmaların tespit edilebilmesi için yapılan testtir. Bu testte besiyeri; % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinin % 5 (w/v) total tuz içeriği tartıldıktan sonra % 0,2 (w/v) yeast ekstrakt ve % 1 (w/v) çözünür nişasta eklenerek pH 7,5'a ayarlanmasının ardından % 1,5 (w/v) agar ile katı besiyeri hazırlanıp steril edilmiştir. Bir gün oda sıcaklığında bekletilerek herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığına bakıldıktan sonra 20'şer µl aktif kültürlerin petriye spotlanmasıyla 72 saat inkübasyonda bırakılmış ve bu sürenin sonunda 1/10 oranında seyreltilmiş gram iyodür solüsyonu damlatılarak koloni etrafında açık zon oluşumunun varlığı nişasta hidrolizinin pozitif olarak değerlendirilmiştir. Üç paralel petriden ilki 72 saat inkübasyonun sonunda seyreltilmiş gram iyodür solüsyonu damlatılmış geri kalan iki paralel petri ise 48 saat buzdolabında tutulduktan sonra seyreltilmiş gram iyodür solüsyonu (Merck) damlatılmıştır. Pozitif kontrol olarak *Bacillus cereus*, negatif kontrol olarak ise *Staphylococcus aureus* kullanılmıştır. (Cojoc et al., 2009).

3.6.7 DNaz üretimi

Mikroorganizmaların ekstraselüler DNaz üretilip üretilmediğinin test edilmesi açısından içerisinde DNA bulunan % 2 (w/v) triptoz, % 0,5 (w/v) NaCl, % 0,2 (w/v) DNA, % 1,5 (w/v) agar içeren DNaz test agarı hazır besiyerinden % 4,2 (w/v) tartılıp üzerine Kamble and Kadu, 2012'ye göre % 0,1 (w/v) pepton, % 0,2 (w/v) yeast ekstrakt ilave edilerek ve halofilik besiyeri oluşturmak üzere % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinin % 5 (w/v) total tuz içeriği tartıldıktan sonra pH 7,4'ye ayarlanmıştır. Bu içerik tartılarak iki farklı besiyeri hazırlanmıştır. Bir tanesinin içerisinde % 0,005 (w/v) metil yeşil ilave edilip besiyeri steril edilmiştir. Diğer besiyeri ise metil yeşili ilave etmeksizin hazırlanıp steril edilmiştir. Besiyerleri petrilere dökülüp bir gün bekletildikten sonra aktif kültürler 20'şer µl olacak şekilde spotlanmıştır. 3 günlük inkübasyonun ardından DNaz varlığı üç farklı şekilde tespit edilmiştir. Metil yeşili içermeyen petride inkübasyon sonucu koloni üzerine % 0,05'lik (w/v) Toluidin Mavisi damlatılarak 10 dakika bekletilmiş, metil yeşili içermeyen ikinci petriye 1 N HCl damlatılarak 10 dakika

bekletilmiş, metil yeşili içeren üçüncü petriye ise 1 N HCl damlatılıp 10 dakika bekletilmiştir. Koloni etrafında zon oluşumunun varlığı pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kamble and Kadu, 2012).

3.6.8 Tribütirin agar ile lipaz testi

Katı MH % 5 (w/v) total tuz içeren besiyerine % 1 (v/v) olacak şekilde otoklav öncesi eklenen tribütirinden zon oluşumuna bakılmaktadır. % 0,5 (w/v) pepton, % 0,3 (w/v) beef ekstrakt, % 2 (w/v) agar, % 0,1 (w/v) glukoz, % 1 (v/v) tribütirin ile MH % 5 (w/v) total tuz içeriği ile hazırlanmış bu besiyerinde 20'şer µl kültürler spotlanarak 24-48 saat zon oluşumuna bakılmış ve sonuçları kaydedilmiştir. Negatif kontrol olarak *E. coli* kullanılmıştır (Kumar et al., 2012).

3.6.9 Lizin dekarboksilaz testi

Lizin aminoasitinin lizin dekarboksilaz enzimi sayesinde karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılıp kullanılmadığını test etmek için yapılan lizin dekarboksilaz testi için öncelikle büyüme ortamında dekstrozun parçalanması ve asidik ürünlerin açığa çıkması ilk 24 saatte gerçekleşirken pH indikatörünün mor-kırmızıdan sarı rengine dönüşümünün ardından (pH <5,2) ortamda bulunan lizin ikinci 24 saatte kullanılarak dekarboksile edilirse açığa bazik ürünler çıkmaktadır böylece besiyeri pH'sı tekrar yükselerek nötral veya alkali olduğunda sarı renkten tekrar mor-kırmızı rengine dönüşmesi gözlemlendiği takdirde lizin dekarboksilaz enziminin varlığı pozitif kabul edilmektedir aksi takdirde negatif kabul edilmektedir. Lizin dekarboksilaz broth içeriği olan % 0,5 (w/v) jelatin pepton, % 0,5 (w/v) L-lizin, % 0,3 (w/v) yeast ekstrakt, % 0,1 (w/v) dekstroz, bromkresol purple % 0,002 (w/v)'a ilave olarak % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinin % 5 (w/v) total tuz içeriği tartıldıktan sonra pH 6,8'e ayarlanarak steril edilmiştir. 24 saatlik aktif kültürlerden 100'er µl eklenerek üzerlerine 1'er ml steril mineral yağı eklenip inkübe edilmiştir. 37 °C'de 24 ve 48 saatlik sonuçları günlük olarak takip edilip 1 hafta inkübe edilmiştir (Brooker et al., 1973).

3.6.10 Ornitin dekarboksilaz testi

Ornitin dekarboksilaz broth içeriği % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinin % 5 (w/v) total tuz içeriği tartıldıktan sonra % 0,5 (w/v) jelatin pepton, % 0,5 (w/v) ornitin, % 0,3 (w/v) yeast ekstrakt, % 0,1 (w/v) dekstroz, bromkresol purple % 0,002 (w/v) pH 6,8'e ayarlanarak steril edilmiştir. Aktifleştirilmiş 24 saatlik kültürlerden 100'er µl eklenip üzerlerine 1'er ml steril mineral yağı eklenerek inkübe edilmiştir. Lizin dekarboksilaz testine benzer şekilde ornitin dekarboksilaz testi için ornitin ikinci 24 saatte ortam pH'sını asidikten alkaliye dönüştürmesi ornitin dekarboksilaz enziminin pozitif olduğunu göstermektedir. İnkübasyon sonuçları 37 °C'de bir hafta gözlenmiştir (Fay and Barry, 1972).

3.6.11 Arginin dekarboksilaz testi

Arginin dekarboksilaz broth içeriği % 5 (w/v) total tuz içeriğine ilave % 0,5 (w/v) jelatin pepton, % 0,5 (w/v) arginin, % 0,3 (w/v) yeast ekstrakt, % 0,1 (w/v) dekstroz, bromkresol purple % 0,002 (w/v) pH 6,8'e ayarlanarak steril edilmiştir. Aktifleştirilmiş 24 saatlik kültürlerden 100'er µl eklenerek üzerlerine 1'er ml steril mineral yağı eklenerek inkübe edilmiştir. Lizin dekarboksilaz testine benzer şekilde arginin dekarboksilaz testi için arginin ikinci 24 saatte ortam pH'sını asidikten alkaliye dönüştürmesi arginin dekarboksilaz enziminin pozitif olduğunu göstermektedir. İnkübasyon sonuçları 37 °C'de bir hafta gözlenmiştir (Goldschmidt and Lockhart, 1971).

3.6.12 Fenilalanin deaminasyonu

% 0,2 (w/v) DL-fenilalanin içeren nutrient broth ile hazırlanan fenilalanin agar (Difco) hazır toz besiyeri kullanılarak hazırlanan yatık brothlarda fenilalanin aminoasidinden amin grubunu parçalayıcı olan fenilalanin deaminaz enzimine sahip olup olmadığı serbest amonyum ve fenilpurivik asit oluşumunun mikroorganizmanın inkübasyonundan sonra besiyerine % 10 (w/v) ferrik klorid eklenmesi ve 0,1 N HCl'den 5 damla eklenmesiyle 5 dk içinde reaksiyona girerek yani demir bileşiği asidik ortamda yani fenilpurivik asit varlığında koyu yeşil bir

renk oluşturması durumunda pozitif, besiyeri renginin değişmemesi durumunda ise fenilalanin deaminaz üretimi bakımından negatif kabul edilmiştir (Ederer et al., 1971).

3.6.13 H₂S üretimi

Hidrojen sülfidin üretilip üretilmediğinin tespiti için triple sugar iron agar yani 3 farklı şeker içeren besiyerine % 5 (w/v) total tuz içeriği eklendikten ve pH ayarı yapıldıktan sonra özeyle tüpün dip kısmına ve yüzey kısmına olmak şartıyla ekim yapılmıştır. Buna göre fermentasyon sonucu üç farklı şekerin ekilen izolatlar tarafından kullanılıp kullanılmadığı pH indikatörü ile renk değişimine ve gaz oluşumuna bakılarak karar verilmiştir. Bunun yanı sıra hidrojen sülfid üretilip üretilmediği ortam içeriğinde bulunan demirle yapacağı reaksiyon sonucu siyahlaşma varlığına bakılarak pozitif olduğu siyahlaşma yoksa negatif olduğu sonucuna varılmıştır (Mata et al., 2002).

3.6.14 Tek karbon kaynağında asit ve gaz oluşum testleri

NaCl.....	7,5 g
KCl.....	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,02 g
KNO ₃	0,1 g
Bromtimol mavisi.....	0,03 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,05 g
Tiamin (10 mg/100 ml).....	50 µl
Test karbon veya azot kaynağı.....	% 1
Distile su.....	100 ml'ye tamamlanır.
pH 7,0	(Ventosa et al., 1982)

Ventosa et al., (1982)'de belirtildiği gibi hazırlanan test karbon kaynağı bazal ortamına ek olarak Romano et al., (2005)'e göre tiamin vitamin çözeltilisinin ilave edilmesiyle modifiye edilerek hazırlanan bu besiyerinde test edilecek karbon kaynakları ve tiamin eklenmeden son pH 7,0 olacak şekilde hazırlanıp 4,5'ar ml

cam tüplere paylaştırılıp ters çevrili durham tüplerinin ilavesi ve havalarının alınmasının ardından otoklavlanmıştır.

Karbon kaynakları olarak; L-arabinoz, D-fruktoz, D-galaktoz, Bakto- inositol, D-mannitol, D-riboz, D-melezitoz, D-trehaloz, D-salisin, Maltoz, Laktoz, D-sorbitol, Melibiyoz, D-rafinoz, Gliserol, Sukroz, Sitrat, D-glukoz, D-mannoz, D-sellobiyoz, Arbutin kullanılmıştır. Her bir karbon kaynağı bazal ortamını içeren 4,5 ml besiyerine her bir test karbon kaynağı şırınga filtre ile steril edilmiş (0,45 µm, Sartorius) % 10'luk (w/v) solüsyondan ve steril koşullar altında 0,5'er ml aktararak ilgili her bir tüpe son konsantrasyonu % 1 (v/v) olacak şekilde aktarılmıştır. 10 µl şırınga filtreye steril edilmiş tiamin çözeltisinden (10 mg / 100 ml) tüplere aktarıldıktan sonra besiyeri 1 gün bekletilerek herhangi bir kontaminasyon var olup olmadığı kontrol edildikten sonra kültür inokülasyonu aşamasına geçilmiştir.

İnokülasyonda kullanılacak 10 izolat 37 °C'de 24 saatlik 25'er ml erlende Marine Broth sıvı besiyerinde yetiştirildikten sonra kültürler 15 ml'lik steril falkon 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip steril test karbon kaynağı bazal besiyerinde homojenize edildikten sonra 5000 rpm'de 5 dk tekrar santrifüjlenip üstüne tekrar bazal besiyeri eklendikten sonra % 2 (v/v) olacak şekilde tüplere 100'er µl aşılanmış ve 5 günlük sonuçları gözlemlenmiştir (Ventosa et al., 1982, Mata et al., 2002, Romano et al., 2005).

3.6.15 Azot kaynakları testi

NaCl.....	7,5 g
KCl.....	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,02 g
Bromtimol mavisi.....	0,03 g
KH ₂ PO ₄	0,05 g
Test azot kaynağı.....	% 0,1
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.
pH 7,0	(Ventosa et al., 1982)

Azot kaynakları olarak; L-sistein, L-izolösin, L-serin, L-valin, L-metiyonin, L-lizin, L-treonin, L-arginin, DL-asparagin son konsantrasyonu % 0,1 (w/v) olacak şekilde 4,5'ar ml test besiyerine 0,5'er ml eklenmiştir (Mata et al., 2002).

İnokülasyonda kullanılan 10 izolat 37 °C'de 24 saatlik 25'er ml erlende Marine Broth sıvı besiyerinde yetiştirildikten sonra kültürler 15 ml'lik steril falkonlarda 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip steril test karbon kaynağı bazal besiyerinde homojenize edildikten sonra 5000 rpm'de 5 dk tekrar santrifüjlenip üstüne tekrar bazal besiyeri eklendikten sonra % 2 (v/v) olacak şekilde tüplere 100'er µl aşılanmış ve 5 günlük sonuçları gözlemlenmiştir.

3.6.16 Antimikrobiyal duyarlılık testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testi için MH % 5 (w/v) total tuz içeren katı besiyerine 100'er µl 24 saatlik sıvı kültürden 100'er µl petriye aktarılaraq steril tek kullanımlık pamuklu çubukla yayılmış üzerine Ampicillin 10 µg (A10), Eritromisin 15 µg (E15), Streptomycin 10 µg (S10) (BBL), Penisilin G 10 µg (P10) (BBL), Basitrasin 0,04 U (B), Tetrasiklin (30 µg) (TE30) ve Novobiyosin 5 U (N5) antibiyotikleri yerleştirilerek 24 saat inkübasyona bırakılmış ve zon çapları ölçülerek milimetre cinsinden belirlenmiştir (Mata et al., 2002).

3.6.17 Farklı total tuz konsantrasyonlarında büyüme testi

Saf izolatların minimum, optimum ve maksimum büyüebildikleri % (w/v) total tuz konsantrasyonlarının test edilmesi amacıyla yapılmıştır. Buna göre % 0, % 0,5, % 2,5, % 3, % 5, % 7,5, % 10, % 15, % 20, % 25, % 30 (w/v) total tuz konsantrasyonlarını içeren bazal katı MH besi ortamlarında pH 7,5'da 10'ar µl sıvı kültürlerin petri üzerine spotlandıktan sonra 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Mata et al., 2002).

3.6.18 Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren katı besiyerlerinde büyüme testi

Saf izolatların minimum, optimum ve maksimum büyüyebildikleri % (w/v) NaCl konsantrasyonları testi için 8 gr/L Nutrient Broth (NB) hazırlanarak ayrı besiyeri şişelerine paylaştırılmış ve her biri içine % 0, % 0,5, % 1, % 1,5, % 2, % 2,5, % 3, % 3,5, % 5, % 7,5, % 10, % 12,5, % 15 (w/v) pH 7,4-7,5 arasında ayarlanmıştır. 50'şer ml hazırlanan her bir farklı tuz konsantrasyonuna sahip besiyerlerinden 7'şer ml alınıp cam tüplere aktarılmış geri kalan besiyerine % 1,5 (w/v) agar eklenip sonra otoklavlanmış ve 3'er petriye dökülüp 1 gün bekletilmiştir. Herhangi bir kontaminasyon problemi olup olmadığı kontrol edildikten sonra ekim 10'ar µl spotlama şeklinde yapılmıştır.

Yukarıdaki besiyerlerine inokülasyon için % 12,5 (w/v) NaCl içeren MH Broth'ta 50'şer ml erlenlerde yetiştirilen 24 saatlik 10 izolata ait sıvı kültürleri, 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra ardışık çöktürme işlemiyle konsantre edilmiş ve pH'larının 0,5 M NaOH ve 0,5 M HCl ile 7,4-7,5 arasında değişen ve 10'ar ml NB % 0, % 0,5, % 1, % 1,5, % 2, % 2,5, % 3, % 3,5, % 5, % 7,5, % 10 (w/v) NaCl içeren önceden hazırlanmış steril besiyerleri konsantre hücre pelletleri üzerine 400'er µl ayrı ayrı eklenerek her bir izolatın her bir tuz konsantrasyonu için ayrı ayrı yıkama işlemi gerçekleştirilmiş tekrar santrifüjlenip aynı besiyerlerinden 60'ar µl ile homojenize edilip 10'ar µl spotlama 3 paralel ekim yapılarak gerçekleştirilmiştir. % 12,5 (w/v) NaCl ve üstü tuz konsantrasyonlarında ekim yapılırken yıkama işlemi yapılmamış ve 10'ar µl kültür petrilere aşıl原因mıştır. 37 °C'de 24 saatin sonunda büyüme durumları kaydedilmiştir (Mata et al., 2002).

3.6.19 Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren sıvı besiyerlerinde büyüme testi

Spotlama sonucu büyümenin zayıf gözleendiği izolatlara yüksek NaCl konsantrasyonları denemesi % 19, % 20, % 21, % 22, %25 (w/v) NaCl içeren Nutrient Broth besiyerlerinde pH 7,4-7,5 aralığında ayarlanarak cam tüplere 5'er ml aktararak steril edilmiş ve 1'er ml kültür inoküle edilerek 5 gün inkübasyonda tutulmuştur. Büyüme olmayan 5 ve 6 nolu izolatların % 10, 12,5, 15, 16, 17, 18,

19 (w/v) NaCl içeren Nutrient Broth besiyerlerinde tekrar büyüme sonuçları da alınmıştır (Mata et al., 2002).

3.6.20 Farklı pH’da büyüme testi

% 5 (w/v) total deniz tuzu konsantrasyonları içeren bazal ortam pH’sı 1 N NaOH ve 1 N HCl ile ayarlanarak pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11’de büyüme testi katı nutrient agar besiyerine 10’ar µl sıvı besiyerinin 3 paralel spotlanması ile test edilmiştir. 37 °C’de 24 saatin sonunda büyüme durumları kaydedilmiştir. İkinci pH denemesinde % 5 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyeri kullanılarak ve pH’ları 1 N NaOH ve 1 N HCl ile pHmetrede pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11’e ayarlanarak aynı şekilde test edilmiştir (Mata et al., 2002).

3.6.21 Tirozin aminoasitinin hidroliz testi ve pigment oluşumu

% 0,5 (w/v) tirozin katılarak hazırlanan MH % 5 (w/v) total tuz içeren katı besiyerinde test edilen kültürler 20’şer µl olacak şekilde petriler 4’e bölünerek spotlanmış ve 24 saat sonunda zon oluşumu ve pigment oluşumu açısından değerlendirilmiştir (Mata et al., 2002).

3.7 Genomik DNA Ekstraksiyonu

3.7.1 Invitrogen Purelink Genomik DNA ekstraksiyon kit içeriği

- Genomik DNA Lizis/Binding Buffer (50 ml)
- Genomik DNA Digestion buffer (45 ml)
- Genomik DNA Wash Buffer 1 (50 ml)
- Genomik DNA Wash Buffer 2 (37,5 ml)
- Genomik DNA Elüsyon tamponu (50 ml) (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,1 mM EDTA)
- RNaz A [20 mg/ml, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, (5 ml)] +4 °C
- Proteinaz K (20 mg/ml, tampon içinde) +4 °C
- Lizozim tamponu (steril edilmiş 25 mM Tris-HCl, pH 8, 2,5 mM EDTA, % 1 Triton-X 100)
- Lizozim (20 mg/ml veya 50 mg/ml) (Invitrogen) +4 °C

3.7.2 Genomik DNA ekstraksiyonu öncesi hazırlık aşaması

Genomik DNA ekstraksiyonu öncesinde kültürlerin işleme hazırlanması aşamasında 6 ml kültür 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda 1,5’ar mL eppendorf tüplere steril koşullar altında alınmış ve 10000 rpm’de 10 dk santrifüjlendikten sonra işlem yapılncaya kadar buzdolabında tutulmuştur.

Genomik DNA ekstraksiyonu öncesinde değişik sıcaklık uygulamaları için ısı bloğu 55 °C’ye ayarlanarak çalıştırılmıştır. 37 °C için etüv işlem sırasında kullanılmıştır. Genomik DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere taze hazırlanması gereken solüsyonlardan olan lizozim enzim solüsyonu uygulamanın hemen öncesinde bek alevi başında tartım yapılarak 0,25 gr lizozim / 5 ml lizozim tamponunda çözölmüştür ve işlem yapılncaya kadar +4 °C’de tutulmuştur. Yine uygulama öncesinde toplam 10 izolat için ve her birine 500 µl aktarmak için 5 ml olacak şekilde 2 ml Genomik DNA Wash Buffer 1 (WB1), 3 ml % 95’lik etanol eklenerek hazırlanmıştır. Aynı şekilde Genomik DNA Wash Buffer 2 (WB2), 10 izolat için her birine 500 µl aktarmak için 5 ml hacminde 1,5 ml Genomik DNA Wash Buffer 2 + 3,5 ml % 95’lik etanol eklenerek hazırlanmıştır.

3.7.3 Genomik DNA ekstraksiyonu

1. 24 saatlik kültürlerin 6 ml'si 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek süpernatantları uzaklaştırılmıştır.
2. Hücre pelletlerinin üzerine 180 µl Genomik DNA Lizozim Digestion Buffer eklenerek yukarı aşağı yönde ters çevrilerek karışması sağlanmıştır. 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
3. Süre sonunda 20 µl proteinaz K eklenmiş oda sıcaklığında 3 dk bekletildikten ve alt üst edilerek karışması sağlandıktan sonra 20 µl RNaz A eklenmiş oda sıcaklığında 2 dk beklendikten sonra 55 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
4. 200 µl Genomik DNA Lizis Digestion Buffer'dan eklenmiştir. 1 saat 55 °C'de beklendikten sonra üstüne 200 µl % 96'lık etanol eklenmiş ve 5 sn yukarı aşağı yönde maddeler çözünene kadar ters çevrilerek karıştırıldıktan sonra Purelink Spin Kolonu koleksiyon tüpü içerisine kolonun alt ucunu herhangi bir yere değdirmeden yerleştirilmiş ve kolona hazırlanan 640 µl lizat eklenmiştir.
5. 12000 rpm'de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
6. Koleksiyon tüpünü atılarak kolon yeni bir koleksiyon tüpüne kolonun alt ucunu herhangi bir yere değdirmeden yerleştirilmiştir.
7. Santrifüj edilmiş kolonun üzerine % 96'lık etanolle hazırlanan (200 µl WB1 + 300 µl % 96'lık etanol) Wash Buffer 1'den 500 µl eklenmiştir.
8. 12000 rpm'de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
9. Koleksiyon tüpünü atılarak kolon yeni bir koleksiyon tüpüne aktarılmıştır.

10. Kolonun üzerine % 96'lık etanolle hazırlanan (150 µl WB2 + 350 µl % 96'lık etanol) 500 µl Wash Buffer 2 eklenmiştir. 12000 rpm'de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
11. Elüsyon için steril 1,5 ml'lik eppendorf tüpü alınmış ve kolon bu tüpün içine yerleştirilmiştir.
12. 100 µl hacimde Genomik DNA Elüsyon tamponu ile genomik DNA kolondan eppendorf tüpüne geçmesi için 1 dk oda sıcaklığında tutulduktan sonra 3 dk maksimum hızda 14000 rpm'de santrifüjlenmiştir.
13. Kısa süreli olarak 4 °C'de uzun süreli ise -20 °C'de küçük hacimler halinde depolanmıştır.

Genomik DNA ekstraksiyonu yukarıdaki maddelerde görüldüğü gibi Invitrogen Purelink Genomik DNA ekstraksiyon kiti yönergelerine göre yapılmıştır.

3.7.4 Agaroz jel elektroforezi

Genomik DNA ekstraksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini ve PCR ürünlerinin çoğalıp çoğalmadığını kontrol için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Genomik DNA için 1X TBE tamponu içerisinde % 1 (w/v) agaroz (Seakem, LE Agaroz, Lonza) jel hazırlanmıştır. Elektrofez sonucu jel transillüminatörde UV ışığı altında görüntülenmiştir (Temizkan ve Arda, 2008).

Tris Borik Asit EDTA (TBE) stok çözeltisi (5X/L)

54 g Trisma-base

27,5 g Borik Asit

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) (Temizkan ve Arda, 2008).

Agaroz jel elektroforezinin yapılması için öncelikli olarak TBE stok çözeltisi hazırlanıp otoklavda steril edilmiştir. Agaroz jel elektroforezinin yürütülebilmesi için kullanılacak olan bu tamponun konsantrasyonu 1X olduğu

için başlangıçtaki stok çözeltisi 1/5 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. 50 ml 1X TBE tamponu içerisinde % 1 (w/v) agaroz jel (Seakem, LE Agaroz, Lonza) mikrodalgada tamamen eriyinceye kadar kaynatılmış ve jel ılıdığında Redsafe 20000X jel boyası (1 µl) eklendikten sonra hazırlanan jel, her iki tarafı bantlanmış ve tarakları içine yerleştirilmiş jel tankına dökülmüş, donması için 1 saat beklenmiştir. Bu süre zarfında 500 ml 1X TBE tamponu stok çözeltiden hazırlanarak elektroforezde kullanılmak üzere tankın yürütüleceği elektroforez ünitesi içerisine aktarılmıştır. Jelin donup donmadığı kontrol edildikten sonra bantları çıkartılarak tank elektroforez ünitesine yerleştirilmiştir. Taraklar dikkatli bir şekilde jelden çıkartıldıktan sonra genomik DNA yüklenmesi aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada parafilm üstüne alınan 5'er µl genomik DNA örnekleri, 1'er µl 6X boya ile karıştırılıp jele yüklenmiştir. İlk kuyucuklara uygun DNA ladderlarından biri 3'er µl (Fermentas GeneRuler TM Express DNA ladder (5 kb ile 100 bp arası veya 1 kb NEB) diğer kuyucuklara genomik DNA örnekleri 6'şar µl yüklenerek örnekler 1 saat boyunca 80 V'ta yürütülmüştür. Süre sonunda jel tanktan alınarak DNA bantlarının olup olmadığı jel görüntüleme sisteminde (Transillimünatör) bakılarak fotoğraflanmıştır. Genomik DNA örnekleri PCR işlemi yapılncaya kadar eppendorf tüplerin ağzı parafilmle kapatılarak +4 °C'de tutulmuştur (Temizkan ve Arda, 2008).

3.7.5 Primer tasarımı

Özgün primer tasarımı için MEGA6 (Tamura et al., 2013), NCBI Gen Bankası verileri (Altschul et al., 1990), Bioweb programı (University of Wisconsin, 2013), NCBI primer-blast (Ye et al., 2012, Primer3 plus programı (Untergasser et al., 2012) programları kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan primer listesi

¹ Hpsf pure	5'3' dizisi	² nmol	³ Tm	Kaynak
F1Sc	AAGGATGACGGTGAAGGTT	73,227	60	Bu çalışmada dizayn edildi.
R1Sc	TGTTTCCTGGCTTGATGGGA	75,139	60	Bu çalışmada dizayn edildi.
F2Ba	ATGACACAACTGATATGAG	96,023	54	Bu çalışmada dizayn edildi.
R2Ba	TTATTCTTCGCTTGATCAA	80,906	52	Bu çalışmada dizayn edildi.
F3Vp	AAGCTAGATACAGAGTG	87,033	48	Bu çalışmada dizayn edildi.
R3Vp	ACCAAAGGAGGATTAAA	68,405	46	Bu çalışmada dizayn edildi.
F4O	ATTAACGCTGCCCCGTCTTGA	79,229	60	Bu çalışmada dizayn edildi.
R4O	CCCTTCACCTTCGATGCAGT	102,260	62	Bu çalışmada dizayn edildi.
F5H	TTCGTAACCTCGAAGAA	74,796	48	Bu çalışmada dizayn edildi.
R5H	CGTGAAGACACAAGCAA	72,495	50	Bu çalışmada dizayn edildi.
F6C	AGCAGAGCGTCAAGGAAGTC	111,494	62	Bu çalışmada dizayn edildi.
R6C	CGAGATGGACTGTCGGATCG	125,079	64	Bu çalışmada dizayn edildi.
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	79,547	60	Weisburg et al., 1991
1542R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	75,758	64	Weisburg et al., 1991

¹HPSF=yüksek saflıkta tuz içermeyen primer, ²nmol= Primer konsantrasyonu, ³Tm sıcaklığı= 2*(A+T)+4*(C+G) hesaplamasına göre Tm değerleri belirlenmiştir (*alfaDNA*).

Çizelge 3.3 Primer Sulandırma

Primer adı	100 µM (nmol*10) µl	10 µM	Saklama Koşulu
27F	795,47	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
1542R	757,00	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
F1Sc	732,27	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
R1Sc	751,39	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
F2Ba	960,23	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
R2Ba	809,06	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
F3Vp	870,33	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
R3Vp	684,05	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
F4O	792,29	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
R4O	1022,60	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
F5H	747,96	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
R5H	724,95	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
F6C	1114,94	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl
R6C	1250,79	1 hacim primer+ 9 hacim apirojen su	100'er µl

Çizelge 3.4 PCR reaksiyon koşulları

Reaksiyon Bileşenleri	Miktarı
Apirojen steril ultrasaf su	20 µl
10x PCR Tamponu w/20 mM	5 µl
10 mM dNTP karışımı	5 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl (10 pmol)
Reverse Primer (10 µM)	1 µl (10 pmol)
i-star taq polimeraz (5U/µl)	0,5 µl
DNA (1 ng-1 µg) 5 µl	Değişen miktarlarda
Son hacim	50 µl'ye su ile tamamlanmıştır.

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5 Gradient PCR reaksiyon koşulları

Reaksiyon Bileşenleri	Miktarı
Apirojen steril ultrasaf su	11,8 µl
10X PCR Tamponu w/20 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM dNTP karışımı (2,5 mM her bir dNTP	2 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl (10 pmol)
Reverse Primer (10 µM)	1 µl (10 pmol)
i-star taq polimeraz (5U/µl)	0,2 µl
DNA (1 ng-1 µg) 5 µl	2 µl
Son hacim	20 µl

i- star taq DNA polimeraz 250 ünite enzim içeriği:

- i- 10X PCR Tamponu w/20 mM MgCl₂), 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, (1 ml) (-20 °C)
- ii- 10X MgCl₂'süz PCR tamponu (1 ml) (-20 °C)
- iii- 10 mM dNTP (2,5 mM her bir deoksiribonükleotid trifosfat konsantrasyonu) (500 µl) (-20 °C)
- iv- 25 mM MgCl₂ (1ml) (-20 °C)
- v- Enhansır solüsyonu (-20 °C)
- vi- i-star taq DNA polimeraz enzimi (-20 °C)

Çizelge 3.6 16S rRNA gen bölgesi PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C'de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C'de 20 sn
	Primer bağlanması	59 °C'de 20 sn
	Primer uzaması	72°C'de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C'de 5 dk
+4 °C'de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

3.7.6 Ektoin sentaz (*ectBC*) gen bölgesi PCR koşulları

Çizelge 3.7 *Bacillus alcalophilus ectBC* spesifik primeri F2-R2 kullanılarak yapılan PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C'de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C'de 20 sn
	Primer bağlanması	47 °C'de 20 sn
	Primer uzaması	72°C'de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C'de 5 dk
+4 °C'de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.8 *Bacillus alcalophilus ectBC* spesifik primeri F2-R2 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C'de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C'de 20 sn
	Primer bağlanması	48 °C'de 40 sn
		50 °C'de 40 sn
		52 °C'de 40 sn
		54 °C'de 40 sn
		56 °C'de 40 sn
		58 °C'de 40 sn
	Primer uzaması	72°C'de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C'de 5 dk
+4 °C'de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.9 *Salinivibrio costicola ectBC* spesifik primeri F1-R1 kullanılarak yapılan PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C’de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C’de 20 sn
	Primer bağlanması	59 °C’de 20 sn
	Primer uzaması	72°C’de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C’de 5 dk
+4 °C’de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.10 *Salinivibrio costicola ectBC* spesifik primeri F1-R1 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C’de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C’de 20 sn
	Primer bağlanması	50 °C’de 40 sn
		52 °C’de 40 sn
		54 °C’de 40 sn
		56 °C’de 40 sn
		58 °C’de 40 sn
		60 °C’de 40 sn
		62 °C’de 40 sn
	Primer uzaması	72°C’de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C’de 5 dk
+4 °C’de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.11 *Virgibacillus pantothenicus ectBC* spesifik primeri F3-R3 kullanılarak yapılan PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C’de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C’de 20 sn
	Primer bağlanması	47 °C’de 20 sn
	Primer uzaması	72°C’de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C’de 5 dk
+4 °C’de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.12 *Virgibacillus pantothenicus ectBC* spesifik primeri F3-R3 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C’de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C’de 20 sn
	Primer bağlanması	40 °C’de 40 sn
		42 °C’de 40 sn
		44 °C’de 40 sn
		46 °C’de 40 sn
1 döngü:	Primer uzaması	72°C’de 60 sn
	Son uzatma	72 °C’de 5 dk
+4 °C’de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.13 *Oceanobacillus ectBC* spesifik primeri F4-R4 kullanılarak yapılan PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C’de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C’de 20 sn
	Primer bağlanması	59 °C’de 20 sn
	Primer uzaması	72°C’de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C’de 5 dk
+4 °C’de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.14 *Oceanobacillus ectBC* spesifik primeri F4-R4 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C’de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C’de 20 sn
	Primer bağlanması	50 °C’de 40 sn
		52 °C’de 40 sn
		54 °C’de 40 sn
		56 °C’de 40 sn
		58 °C’de 40 sn
		60 °C’de 40 sn
	Primer uzaması	72°C’de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C’de 5 dk
+4 °C’de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.15 *Halomonas ectBC* spesifik primeri F5-R5 kullanılarak yapılan PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C’de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C’de 20 sn
	Primer bağlanması	47 °C’de 20 sn
	Primer uzaması	72°C’de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C’de 5 dk
+4 °C’de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.16 *Halomonas ectBC* spesifik primeri F5-R5 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C’de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C’de 20 sn
	Primer bağlanması	40°C’de 40 sn
		42°C’de 40 sn
		44°C’de 40 sn
		46°C’de 40 sn
		48°C’de 40 sn
	Primer uzaması	72°C’de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C’de 5 dk
+4 °C’de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.17 *Chromohalobacter ectBC* spesifik primeri F6-R6 kullanılarak yapılan PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C’de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C’de 20 sn
	Primer bağlanması	59 °C’de 20 sn
	Primer uzaması	72°C’de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C’de 5 dk
+4 °C’de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.18 *Chromohalobacter ectBC* spesifik primeri F6-R6 kullanılarak yapılan gradient PCR koşulları

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C’de 2 dk
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C’de 20 sn
	Primer bağlanması	50 °C’de 40 sn
		52 °C’de 40 sn
		54 °C’de 40 sn
		56 °C’de 40 sn
		58 °C’de 40 sn
		60 °C’de 40 sn
		62 °C’de 40 sn
	Primer uzaması	72°C’de 60 sn
1 döngü:	Son uzatma	72 °C’de 5 dk
+4 °C’de bekletme		

PCR reaksiyonu: i-star taq (Intronbio) polimeraz kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.19 Gradient PCR Tekrarı

i-star taq enziminin bitmesi nedeniyle gradient PCR tekrarı yeni bir polimeraz enzimi olan OneTaq Hot start DNA polimeraz (MO4815) kullanılarak

ve sadece pozitif sonuç veren izolatlarla gerçekleştirilmiştir. OneTaq Hot start DNA polimeraz enzimi reaksiyon koşulları aşağıda verilmiştir.

Bileşenler	50 µl reaksiyon	Son konsantrasyon
5X OneTaq GC Reaksiyon	10 µl	1X
10 mM dNTP	1 µl	200 µM
10 µM Forward Primer	1 µl	0,2 µM
10 µM Reverse Primer	1 µl	0,2 µM
OneTaq Hot start DNA Polimeraz	0,5 µl	2,5 units/50 µl
Kalıp DNA	5 µl	< 1,000 ng
Apirojen steril su	50 µl'ye	

PCR reaksiyonu: OneTaq Hot start DNA polimeraz (MO4815) kullanım koşullarına göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.20 OneTaq Hot start polimeraz enzimi için PCR Reaksiyonu

1 döngü:	Başlangıç denatürasyon	94 °C'de 30 sn
30 döngü:	Denatürasyon	94 °C'de 30 sn
	Primer bağlanması	44 °C'de 40 sn 48 °C'de 40 sn 52 °C'de 40 sn
	Primer uzaması	68 °C'de 1 dk 30 sn
1 döngü:	Son uzatma	68 °C'de 5 dk
+4 °C'de bekletme		

3.7.7 DNA miktarının hesaplanması

Genomik DNA'nın çözüldüğü 10 mM Tris-HCl, pH 9, 0,1 mM EDTA çözeltisi kör olarak kullanılarak 260/280, 260/230 ve DNA konsantrasyonları (ng/µl) olarak nanodropta ölçülerek DNA, RNA ve protein ve organik madde saflığı açısından değerlendirilmiştir.

3.7.8 PCR sonrası jelde görüntülenmesi

PCR ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi işlemi için % 1,5, % 1,8 veya % 2 (w/v) agaroz ile 1X TBE tamponu ile hazırlanan jellerde jel hazırlama prosedürü uygulanarak elektroforez yapılmıştır. PCR ürünlerinin yürütülmesi için 100 bp Invitrogen veya 100 bp NEB markırları kullanılmıştır. 1X TBE’de agaroz jelde Redsafe 20000X boyasıyla (1 µl) 50 ml hazırlanan jel kullanılarak yürütülmüştür. Transillüminatörde UV ışığı altında görüntülenerek sonuç fotoğraflanmıştır.

3.7.9 DNA dizi analizi

Çoğaltılan gen bölgelerinin dizilerinin belirlenmesi için öncelikle PCR sonrası bantların saflaştırılması işlemi ve DNA dizi analizi işlemleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde (BIYOMER) hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. DNA sekans cihazı (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer) ile 800 bp uzunluğa kadar dizi analizi yapan cihaz ile forward ve reverse olmak üzere gen bölgesinin iki yönlü okunması sonucu kromatogramda yürütülen dizileri Finch TV ile görüntülenmiştir. Sonuçları LALIGN programı kullanılarak (Huang and Miller, 1991) forward ve reverse dizi karşılaştırılmış ve 1500 bp’e yakın bölge elde edilmiştir. NCBI’da gen bölgeleri taranarak filogenetik olarak en yüksek benzerliğe sahip ilk organizmaya ait veriler tablo halinde verilmiştir.

4. BULGULAR

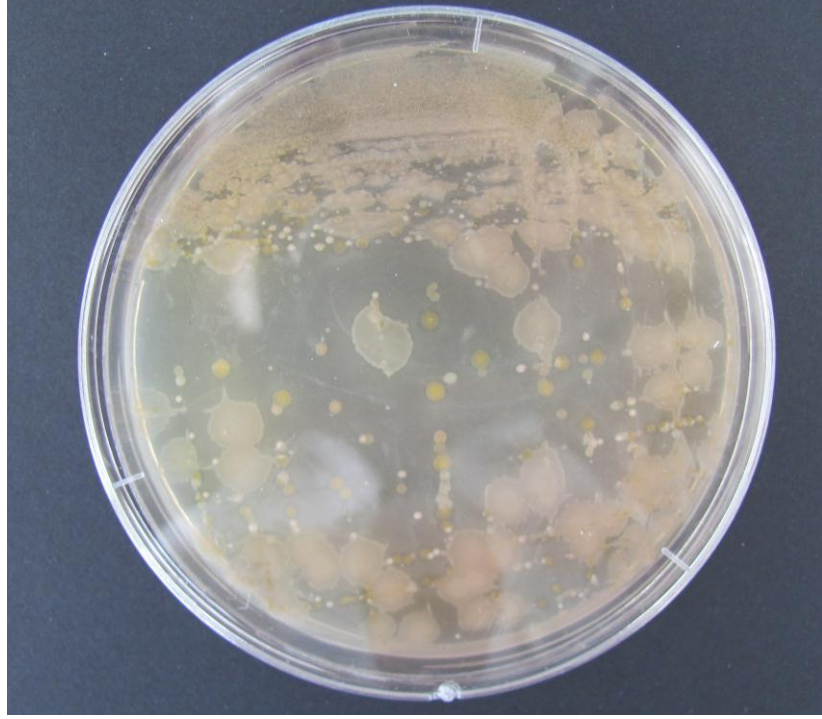
4.1. Tez Kapsamında Toplanan Örnekler



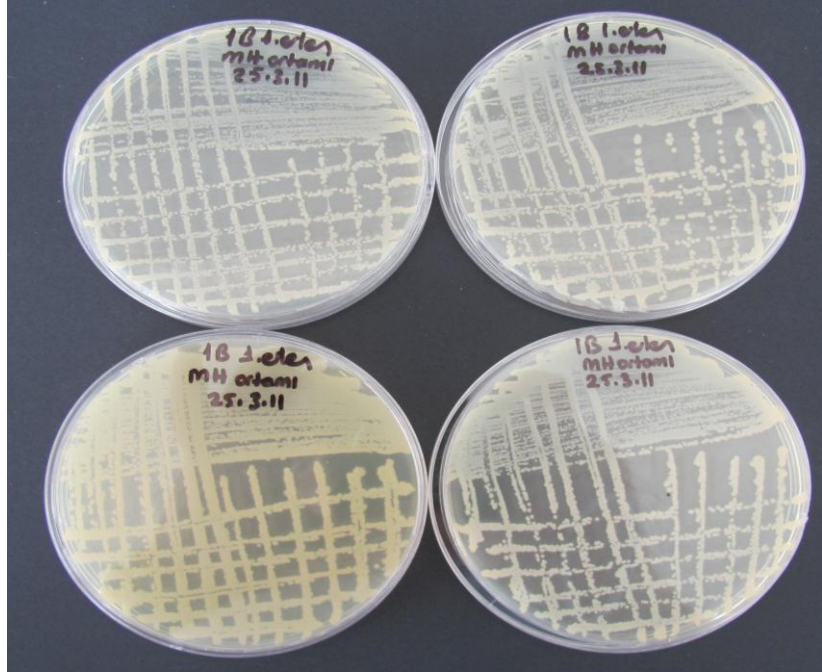
Şekil 4.1 Çeşitli tuz örneklerinden halofilik bakteri izolasyonu (HT, Himalaya Tuzu; CT, Çamaltı Tuzlası tuz yığını; CK, Cihanbeyli Konya ticari salamura tuz; CS, Çamaltı Tuzlası su örneği; MG, Meke Gölü tuz örneği; MS, Meke Gölü Su Örneği; BT, Billur Tuz ticari salamura tuz; DA, Denizli Acıgöl ticari salamura tuz örneği)



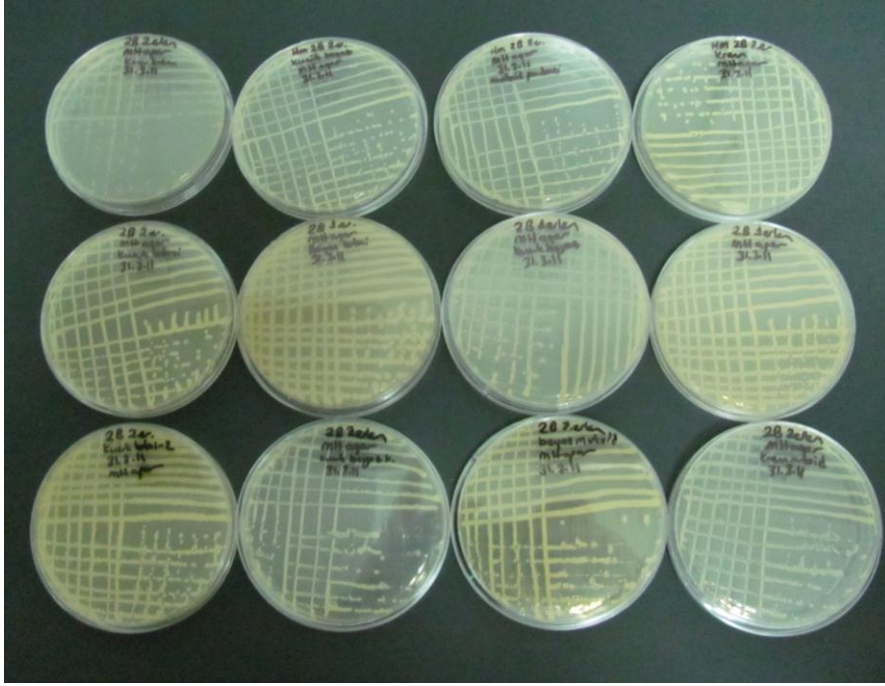
Şekil 4.2 İzmir Kuş Cenneti tuzlu su örneklerinin SW-25 sıvı besiyerlerinde inkübasyon sonuçları



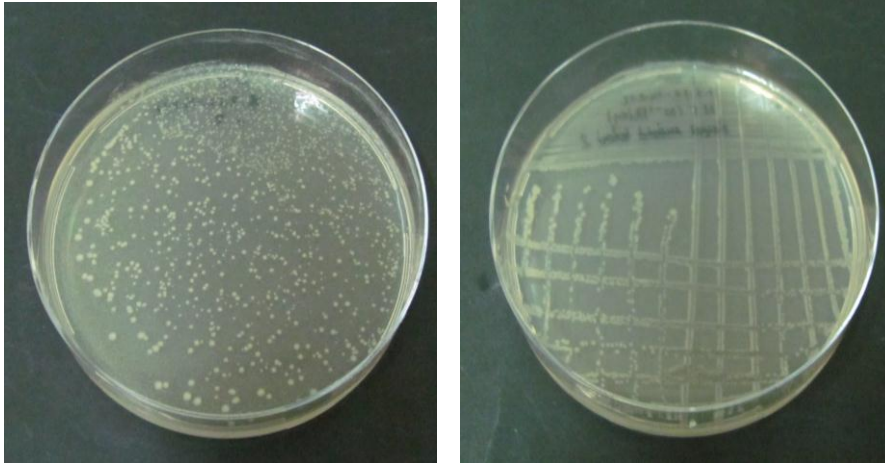
Şekil 4.3 İzmir Kuş Cenneti tuzlu su örneklerinin SW-25'ten MH katı besiyerine ilk çizgi ekimleri



Şekil 4.4 İzmir Kuş Cenneti tuzlu su örneklerinden izole edilen izolatların MH katı besiyerine çizgi ekimleri



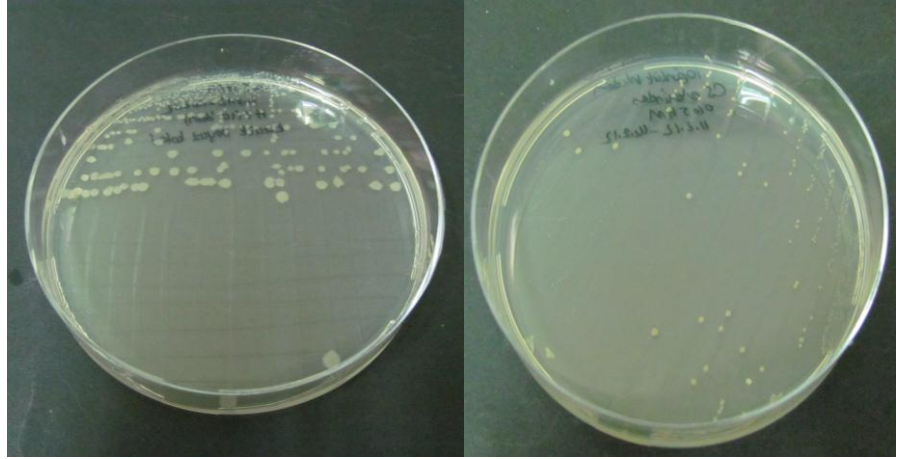
Şekil 4.5 İzmir Kuş Cenneti tuzlu su örneklerinden izole edilen izolatların MH katı besiyerine çizgi ekimleri



(a)

(b)

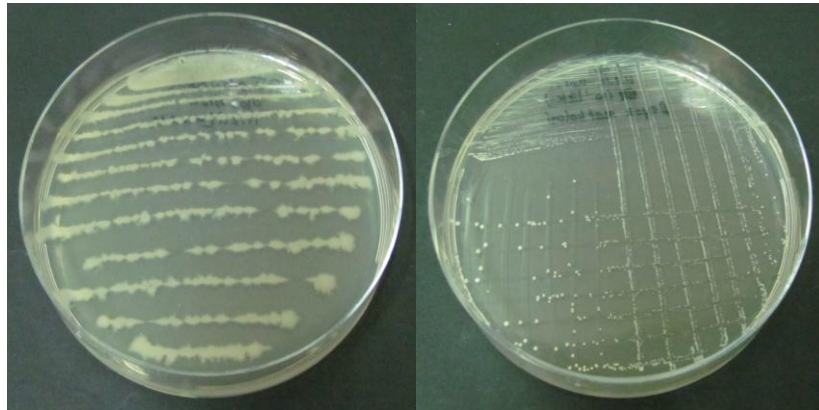
Şekil 4.6 Hilamaya Tuzundan (HT) sırasıyla 10^{-2} 'lik petride koloni görünümü ve % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C'de 6 gün inkübasyon sonucu



Şekil 4.7 Hılamaya Tuzu (HT) seyreltme petrilerinden çizgi ekimi örnekleri ve % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C'de 3 gün inkübasyon sonucu



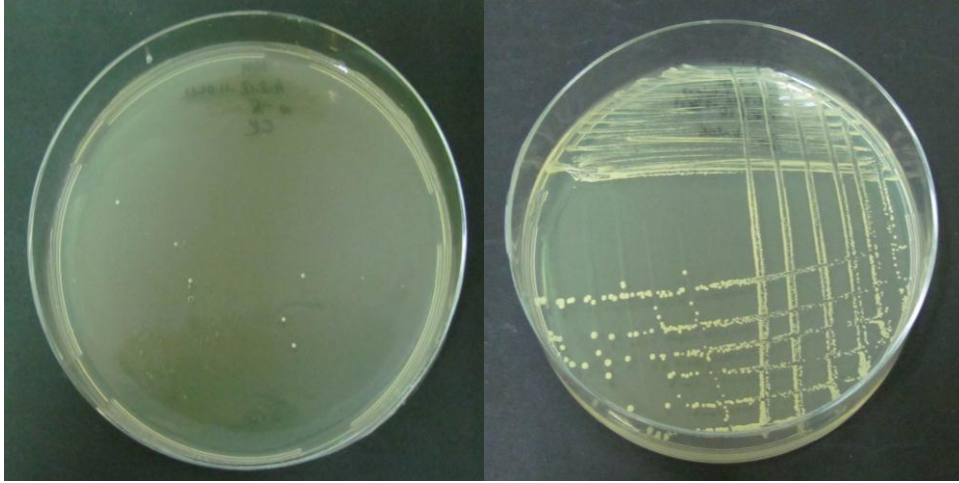
Şekil 4.8 Çamaltı Tuzlası tuz yığınınından (CT) 10^{-4} 'lük petriden koloni görünümü ve % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C'de 6 gün inkübasyon sonucu



Şekil 4.9 Çamaltı Tuzlası tuz yığınınından (CT) % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C'de, 3 gün seyreltme petrilerinden çizgi ekimi sonucu



Şekil 4.10 Çamaltı Tuzlasından tuzlu su örneğinden (CS) 10^{-3} 'lük petride koloni görünümü % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C'de 6 gün inkübasyon sonucu



(a)

(b)

Şekil 4.11 Cihanbeyli-Konya (CK) ticari salamura tuz örneğinden (a) 10^{-5} 'lik petride koloni görünümü, % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerinde 30 °C'de 7 gün inkübasyon sonucu (b) % 5 (w/v) total tuz içeren HM besiyerine çizgi ekimi 30 °C, 3 gün inkübasyon sonucu

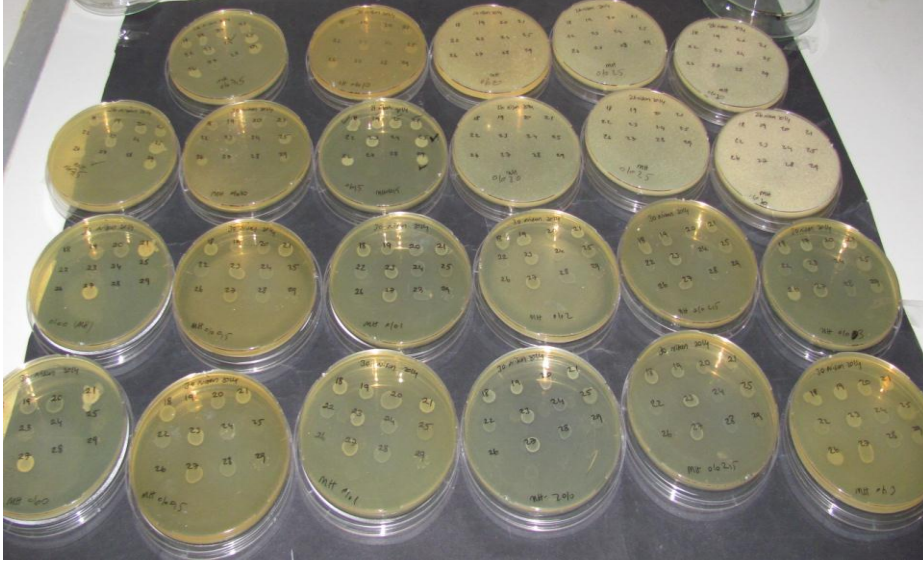
Çizelge 4.1 Farklı tuz örneklerinden seyreltme plaka tekniği ile sayım sonuçları

3. GÜN	
CS	$2,3 \times 10^7$ kob/ml
CT	$3,0 \times 10^2$ kob/ml
HT	$1,8 \times 10^3$ kob/ml
CK	9×10^5 kob/ml

Billur Tuz (BT), Meke Gölü (MG), Meke Gölü su örneği (MS), Denizli Acıgöl (DA) tuz örneklerinde büyüme görülmemiştir. Çizelge 4.1’de sayım sonucunda izole edilen koloniler rastgele seçilerek yatık kültürle transferi yapılmıştır.

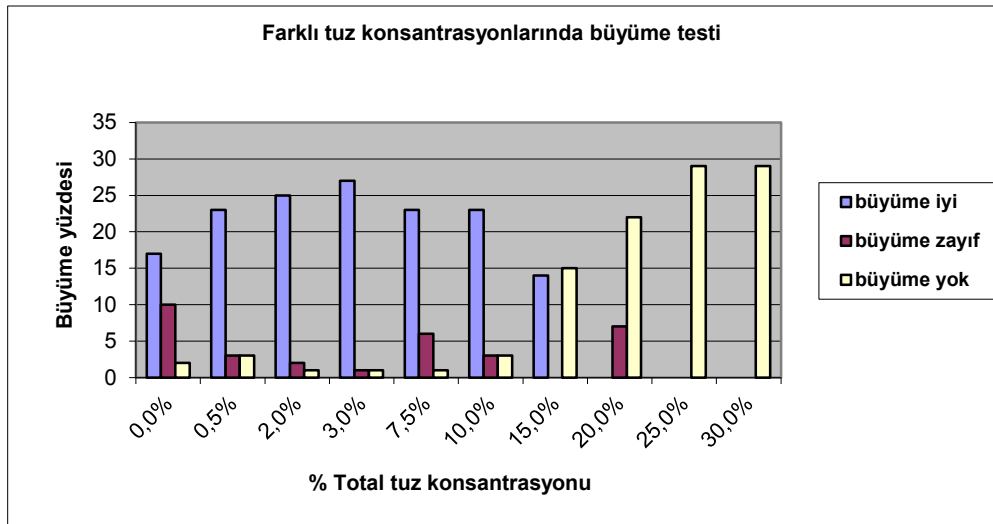
4.2 Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Büyüme Durumuna Göre İzolatların Seçilmesi

**Şekil 4.12** Farklı tuz konsantrasyonu içeren MH besiyerlerinde 29 izolatın farklı olanların seçilmesi



Şekil 4.13 Farklı tuz konsantrasyonu içeren MH besiyerlerinde 29 izolattan farklı olanların seçilmesi

Çizelge 4.2 Seçilen 29 izolatın MH % total tuz konsantrasyonlarında büyüme testi sonuçları

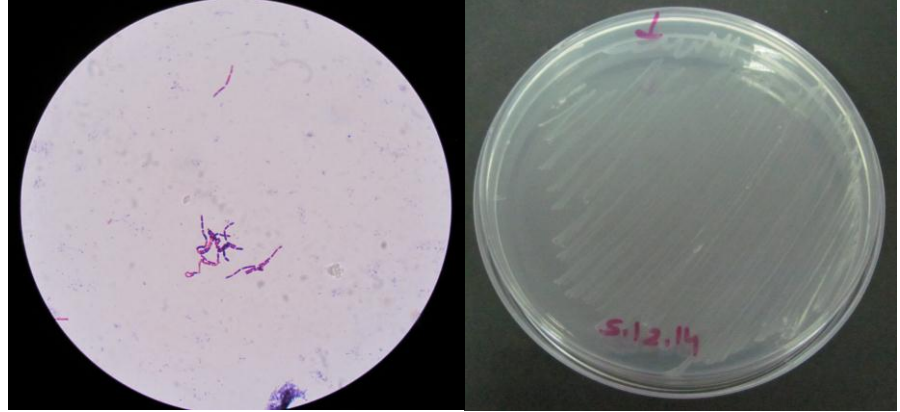


29 izolat içerisinde 10 tane organizma %10 (w/v) ve üstünde büyüyenler olması bakımından seçilmiştir.

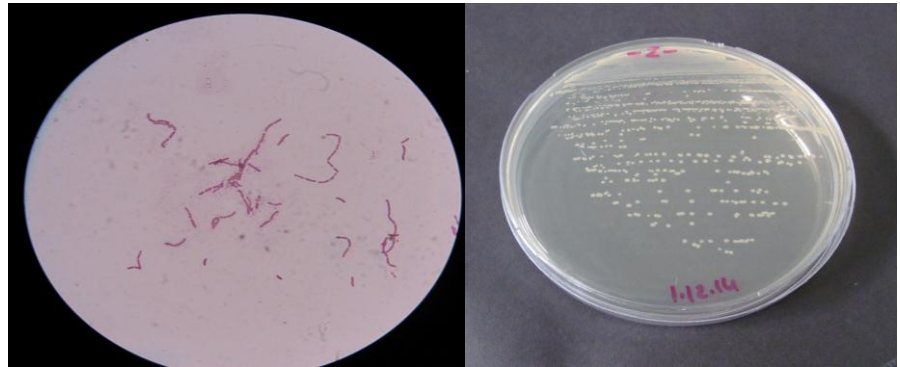
Çizelge 4.3 Seçilen 10 izolata ve toplandıkları bölge alındıkları tarih ve kodlarına ilişkin verilerin listesi

Tuzun Kaynağı	Tuzun çeşidi	Alınma tarihi	Kodları	İzolat sayısı
İzmir Kuş Cenneti	Deniz suyu	3/3/2011	KC	2
Tuzlu su havuzu İzmir Çamaltı	Tuz yığını	2/11/2011	CT	5
Tuzlası İzmir Çamaltı	Tuzlu su	2/11/2011	CS	2
Tuzlası Himalaya tuzu	havuzu Salamura tuz	2/11/2011	HT	1

4.3 Seçilen izolatların gram boyama görüntüleri ve petrideki görünüşleri



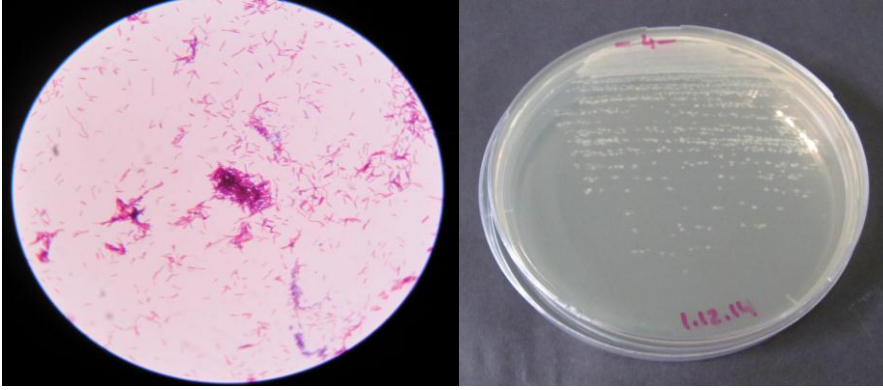
Şekil 4.14 CT-2 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi



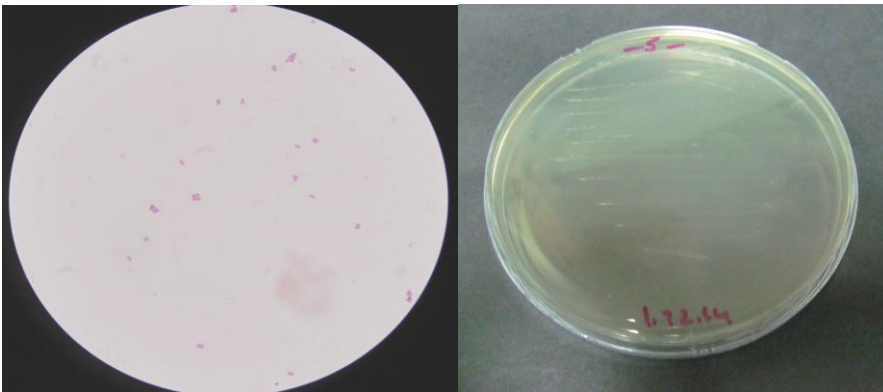
Şekil 4.15 CT-3 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi



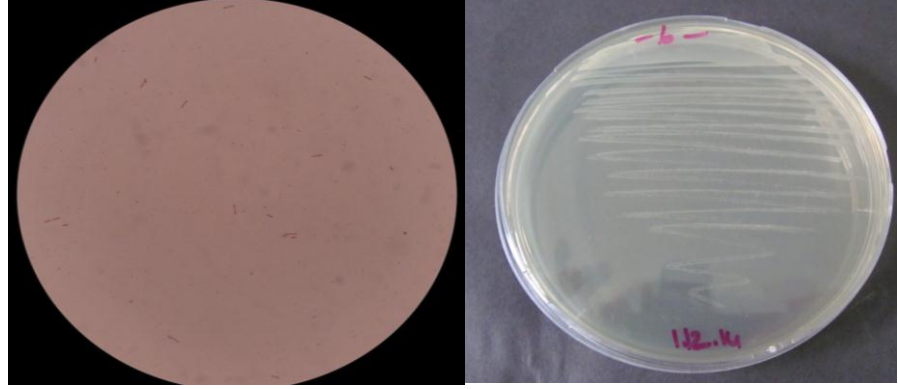
Şekil 4.16 CT-4 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi



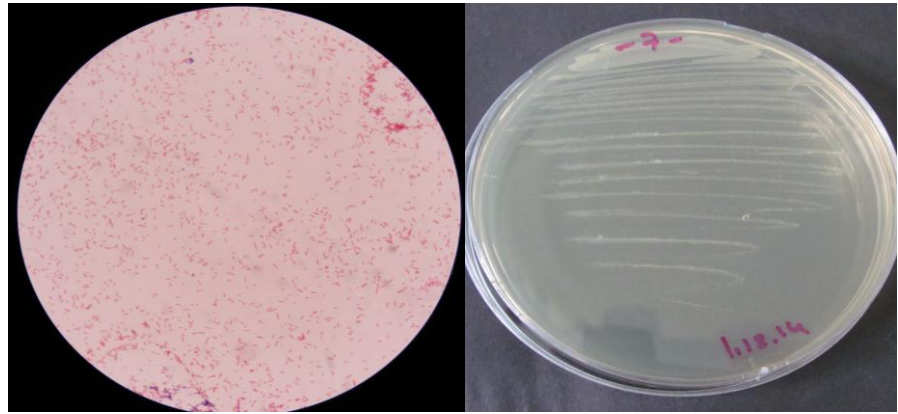
Şekil 4.17 CT-5 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi



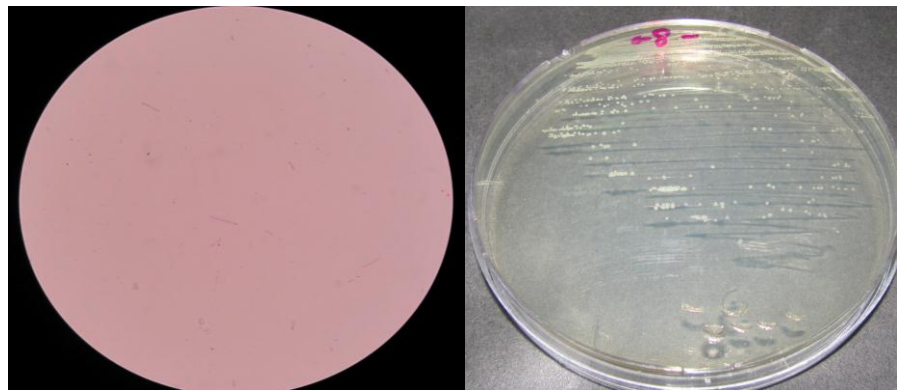
Şekil 4.18 CT-6 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi



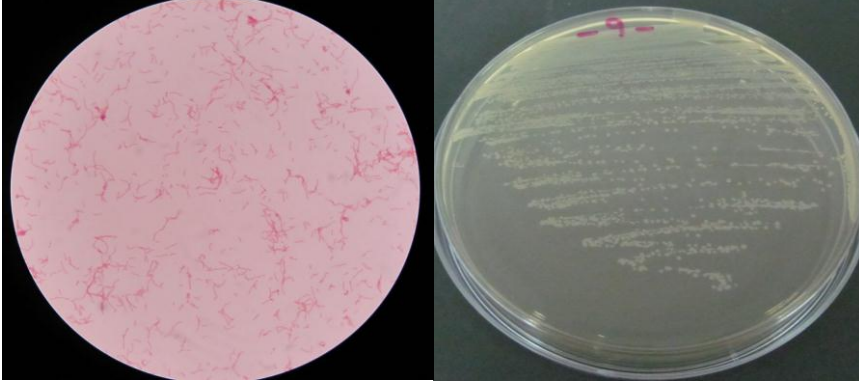
Şekil 4.19 CS-4 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi



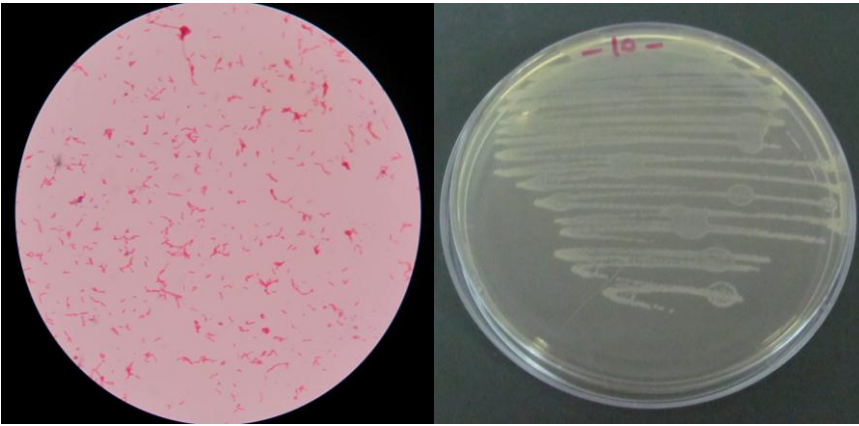
Şekil 4.20 CS-5 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi



Şekil 4.21 HT-9 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi



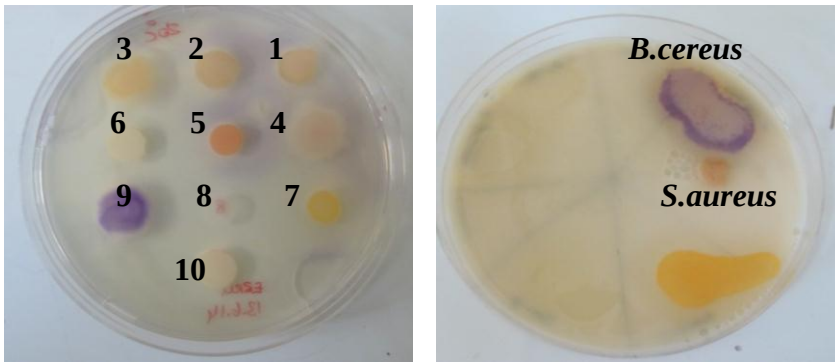
Şekil 4.22 KC-2 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi



Şekil 4.23 KC-101 izolatının gram boyama ve çizgi ekimi

4.4. Biyokimyasal Test Sonuçları

4.4.1. Oksidaz testi

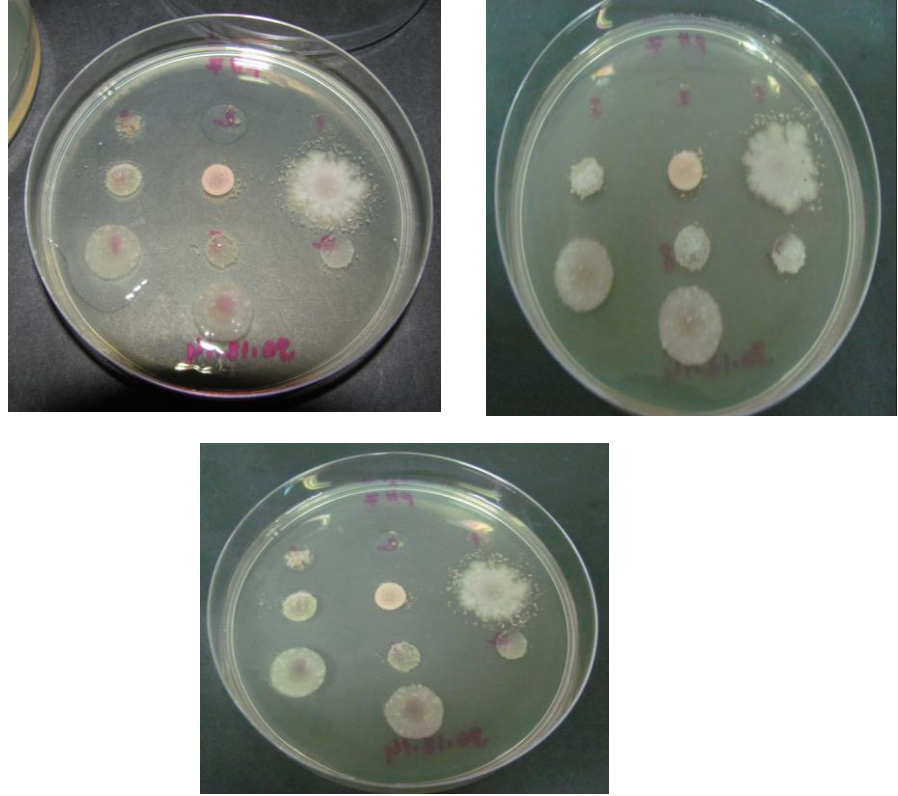


(a)

(b)

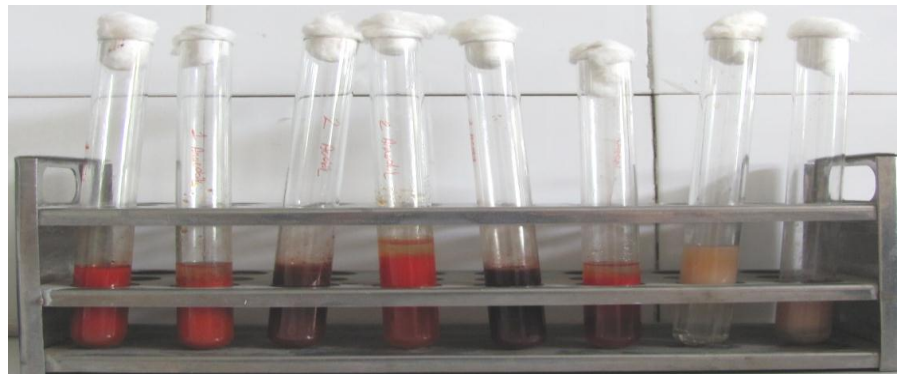
Şekil 4.24 Oksidaz test sonucu (a), (b) Pozitif kontrol *Bacillus cereus* ve negatif kontrol *Staphylococcus aureus*'un oksidaz test sonucu

4.4.2 Katalaz testi



Şekil 4.25 Katalaz testi, pH 7,0 denemesi testinin 37 °C’de 72 saat inkübasyonunun ardından H₂O₂ içeren oksijenli suyun koloni üstüne damlatılması

4.4.3 Nitrat indirgenmesi test sonuçları



Şekil 4.26 CT-2, CT-3, CT-4 izolatlarının ve negatif kontrol grubunun soldan sağa sırasıyla aerobik ve anaerobik tüplerinin nitrat indirgenmesi test sonuçları

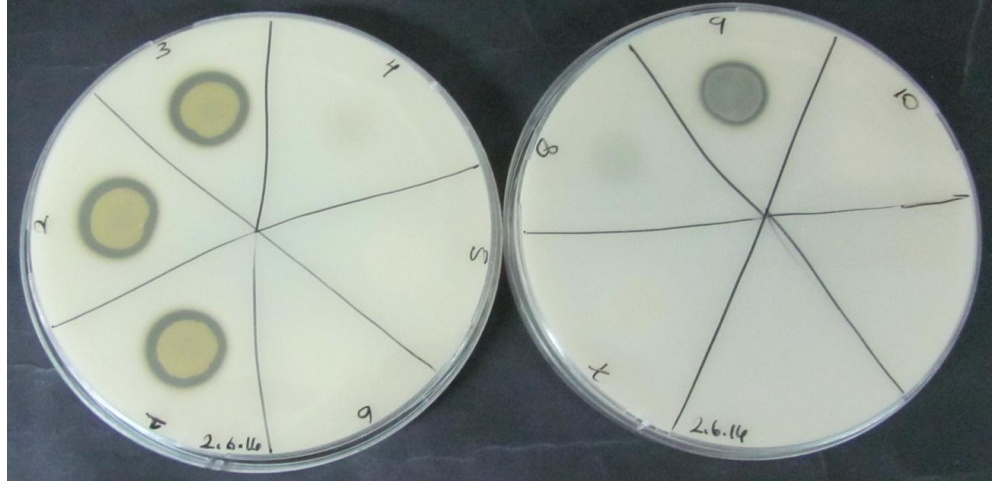


Şekil 4.27 CT-5, CT-6, CS-4 izolatlarının ve negatif kontrol grubunun soldan sağa sırasıyla aerobik ve anaerobik tüplerinin nitrat indirgenmesi test sonuçları

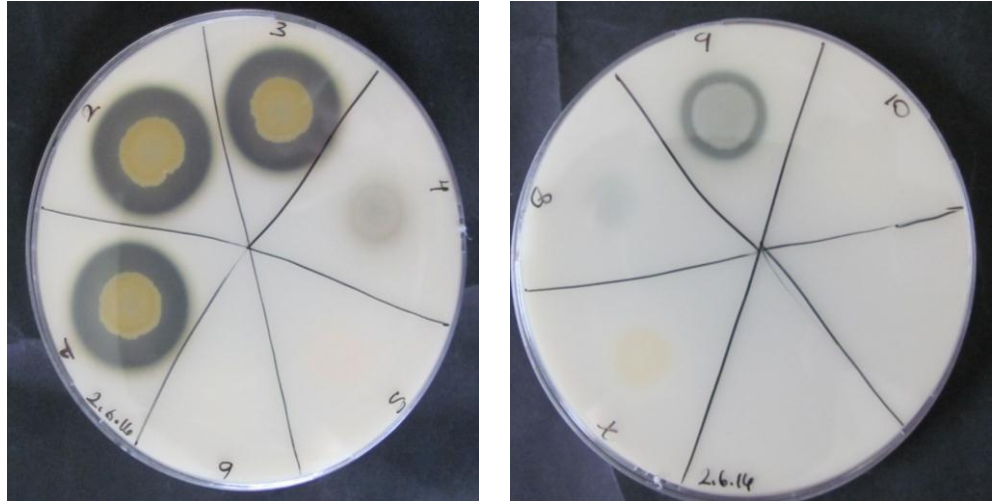


Şekil 4.28 CS-5, HT-9, KC-2, KC-101 izolatlarının ve negatif kontrol grubunun soldan sağa sırasıyla aerobik ve anaerobik tüplerinin nitrat indirgenmesi test sonuçları

4.4.4 Proteaz enzim taraması sonucu



(a)



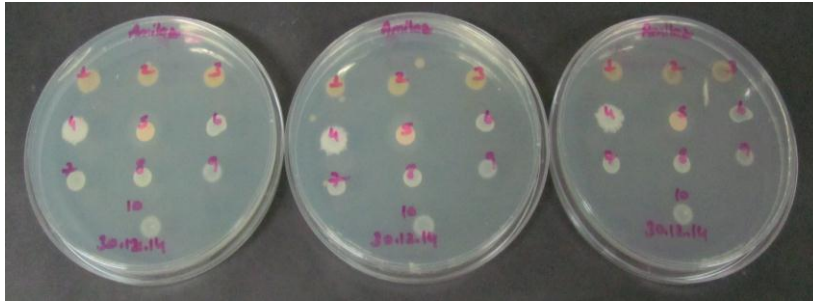
(b)

Şekil 4.29 Proteaz enzim taraması koloni etrafında oluşan zon çaplarının ölçülmesi (a) 24 saatlik ölçüm sonuçları (b) 48 saatlik ölçüm sonuçları

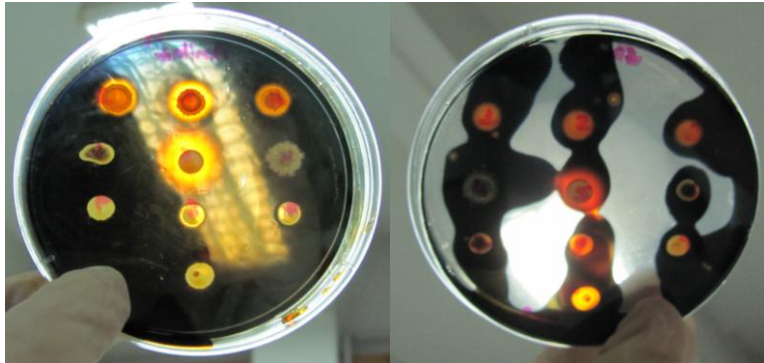
Çizelge 4.4 Günlük proteaz enzim zon çaplarının ölçülmesi

Proteaz	24 saatlik ölçümler		48 saatlik ölçümler	
	Zon çapı	Koloni Çapı	Zon	Koloni Çapı
1	15 mm	11 mm	23 mm	12 mm
2	15 mm	11 mm	24 mm	13 mm
3	15 mm	11 mm	24 mm	13 mm
4	11 mm	10 mm	14 mm	12 mm iç zon 9 mm
8	11 mm	1 mm 10 mm iç zon	12 mm	10 mm iç zon 9 mm
9	14 mm	11 mm	22 mm	12 mm

4.4.5. Nişasta hidroliz testi



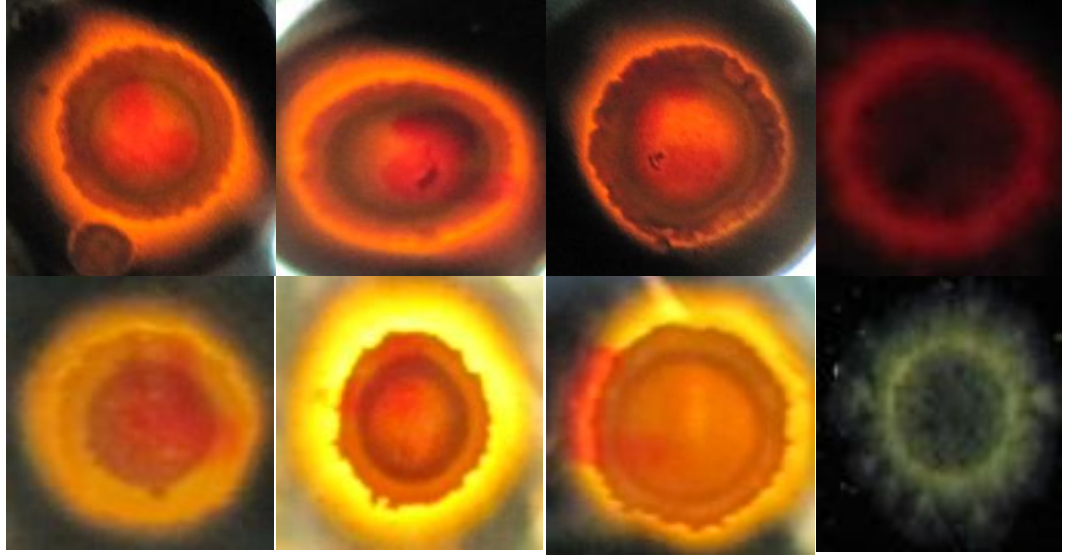
Şekil 4.30 Amilaz testi için % 5 (w/v) total tuz içeren Nişasta agar besiyerinde 37 °C’de 72 saat büyüme testi sonucu



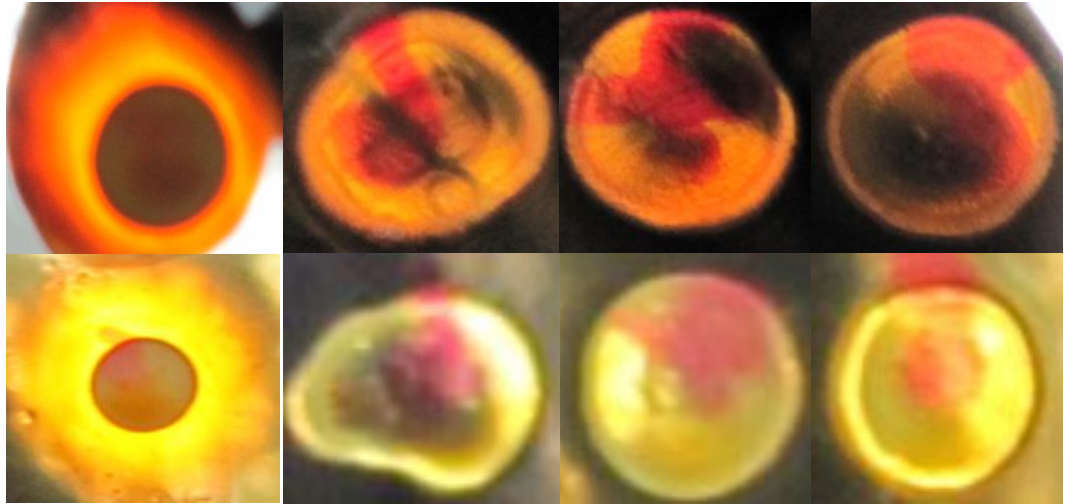
(a)

(b)

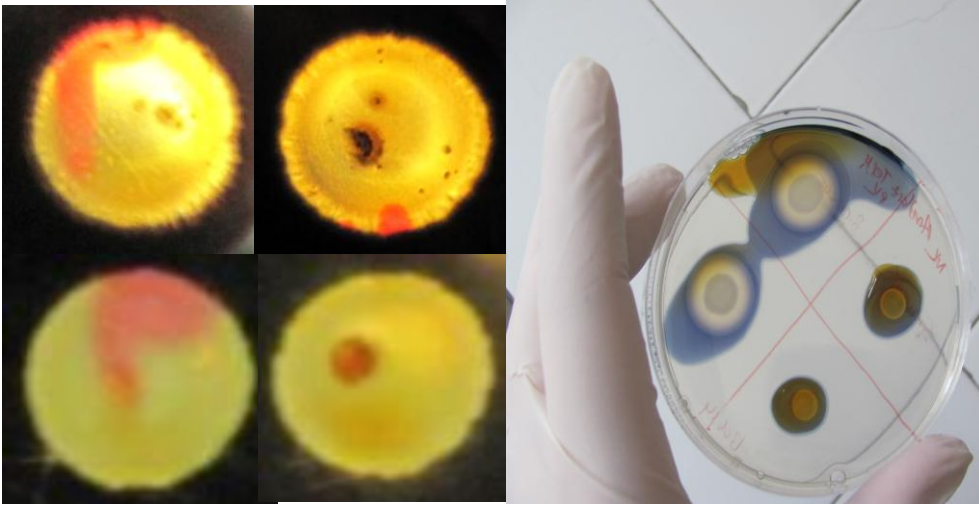
Şekil 4.31 (a) ve (b) Amilaz testi sonucu 37 °C’de 72 saat inkübasyonunun ardından 2 gün +4 °C’de bekletildikten sonra gram iyodür damlatılmış test sonucu



Şekil 4.32 Üst fotoğraflar 1, 2, 3, 4 nolu izolatların 37 °C’de 72 saat inkübasyonunun ardından amilaz testi sonuçları. Alt fotoğraflar aynı izolatların paralel petrilerinin 72 saatlik inkübasyonun ardından 48 saat +4 °C’de tutulduktan sonra amilaz testi sonuçları



Şekil 4.33 Üst fotoğraflar 5, 6, 7, 8 nolu izolatların 37 °C’de 72 saatlik inkübasyonunun ardından amilaz testi sonuçları. Alt fotoğraflar aynı izolatların paralel petrilerinin 72 saatlik inkübasyonun ardından 48 saat +4 °C’de tutulduktan sonra amilaz testi sonuçları

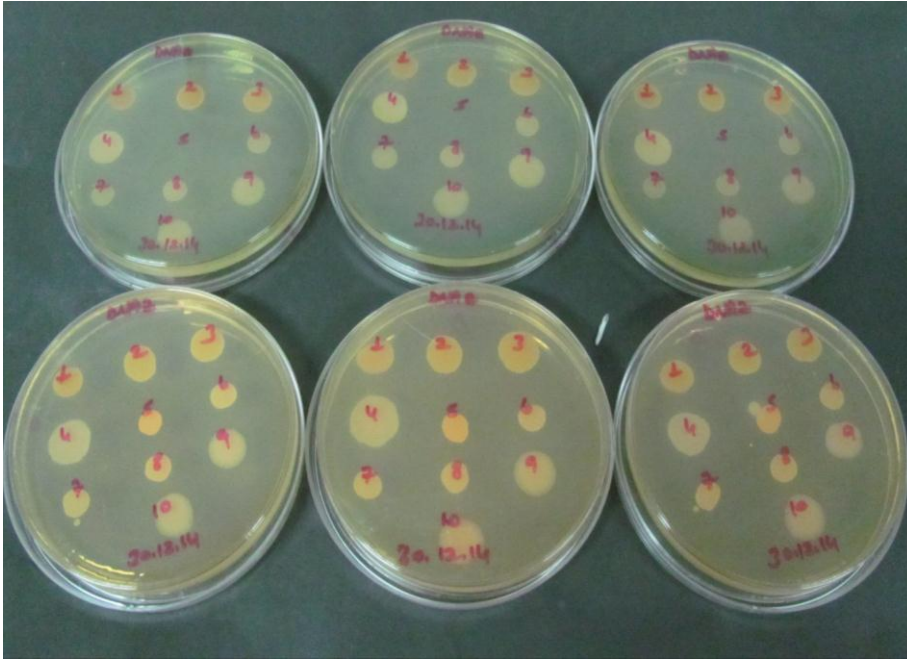


(a)

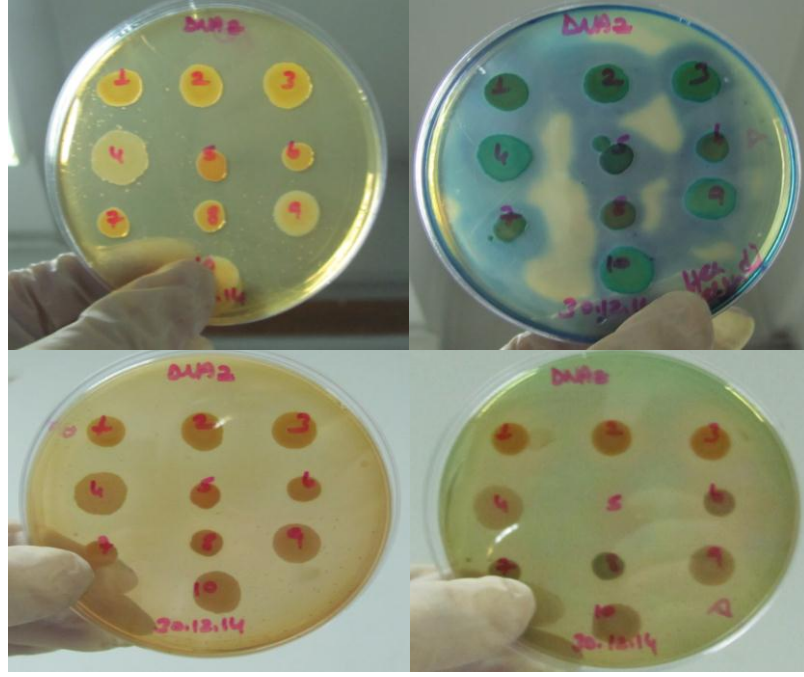
(b)

Şekil 4.34 (a) Üst fotoğraflar 9, 10 nolu izolatların 37 °C’de 72 saatlik inkübasyonunun ardından amilaz testi sonuçları. Alt fotoğraflar aynı izolatların paralel petrilerinin 72 saatlik inkübasyonunun ardından 48 saat +4 °C’de tutulduktan sonra amilaz testi sonuçları. (b) Amilaz testinin pozitif kontrolü *Bacillus cereus* ve negatif kontrolü *S. aureus*

4.4.6 DNaz Testi

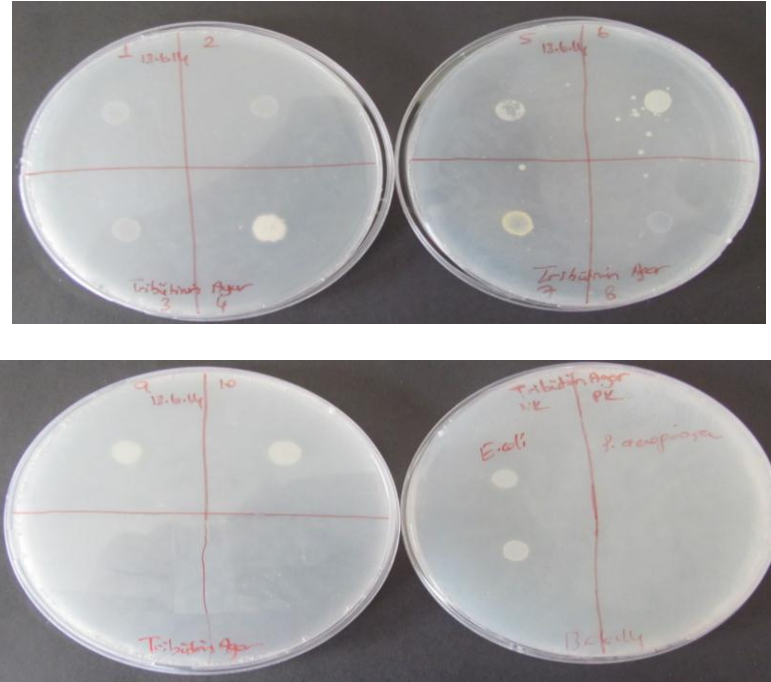


Şekil 4.35 MH % 5 (w/v) total tuz içeren DNaz agar test besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonucu petri görünümü



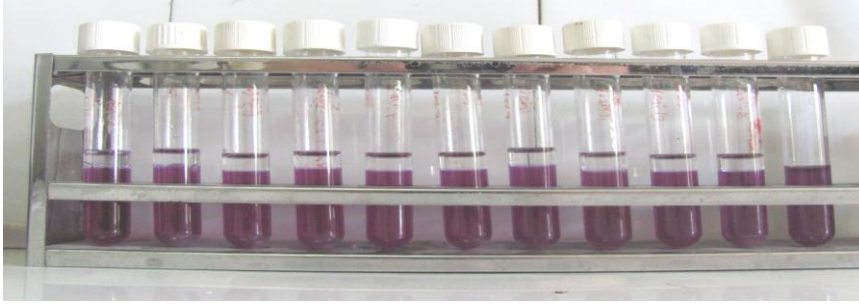
Şekil 4.36 Üst şekiller soldan sağa sırasıyla işlem görmemiş DNaz test ortamı; Toluidin Mavisi % 0,05 (w/v) damlatılmış DNaz test ortamı; Alt şekiller soldan sağa 1 N HCl damlatılmış ve 10 dakika bekletilmiş DNaz test ortamı; Metil yeşili içeren besiyerine 1 N HCl damlatılmış ve 10 dakika bekletilmiş test ortamı

4.4.7 Lipaz testi



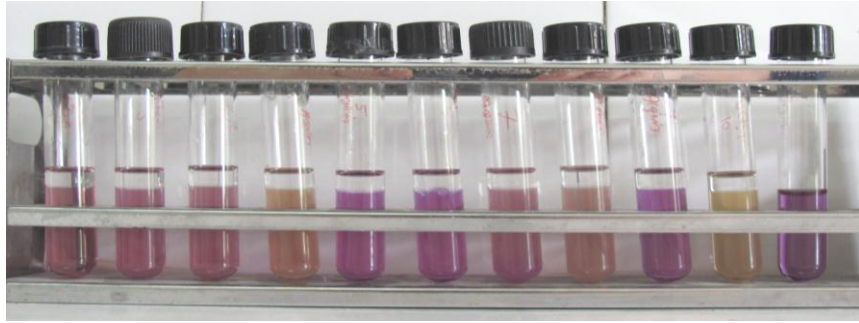
Şekil 4.37 Lipaz testi için % 5 (w/v) total tuz içeren Tribütirin Agar besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonuçları (Not: *P. aeruginosa*'da gelişme olmadı).

4.4.8 Lizin dekarboksilaz testi



Şekil 4.38 Lizin dekarboksilaz testi soldan sağa 10 izolat ve kontrol besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonuçları

4.4.9 Arginin dekarboksilaz testi sonuçları



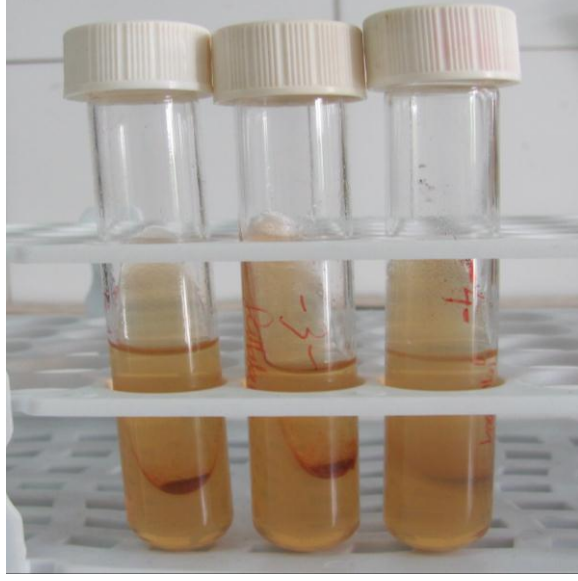
Şekil 4.39 Arginin dekarboksilaz testi soldan sağa 10 izolat ve kontrol besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonuçları

4.4.10 Ornitin dekarboksilaz testi sonuçları



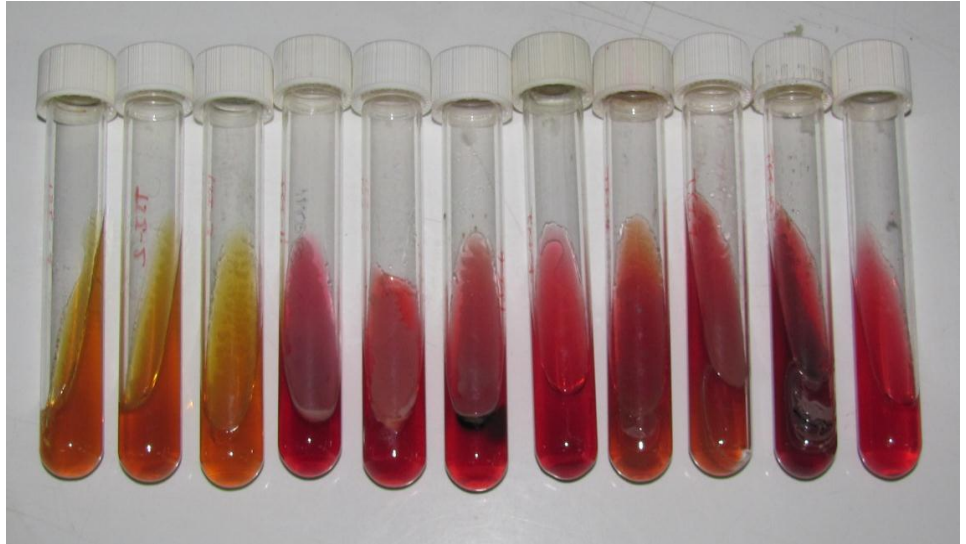
Şekil 4.40 Ornitin dekarboksilaz testi soldan sağa 10 izolat ve kontrol besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonuçları

4.4.11 Fenil alanin deaminasyon testi



Şekil 4.41 CT-4 ve CT-5 izolatlarının Fenilalanin deaminasyon testi 48 saatlik inkübasyon sonuçları

4.4.12 Triple sugar iron agar'da büyüme testi ve H₂S oluşumu



Şekil 4.42 Triple sugar iron agarda şeker fermentasyonu ve H₂S üretim testi 24 saatlik inkübasyon sonuçları



Şekil 4.43 Triple sugar iron agarda CS-5 izolatının ve kontrol besiyerinin şeker fermentasyonu ve H_2S üretim testi 24 saatlik inkübasyon sonuçları

4.4.13 Tek karbon kaynağı testinde asit, gaz ve büyüme testi

sonucu



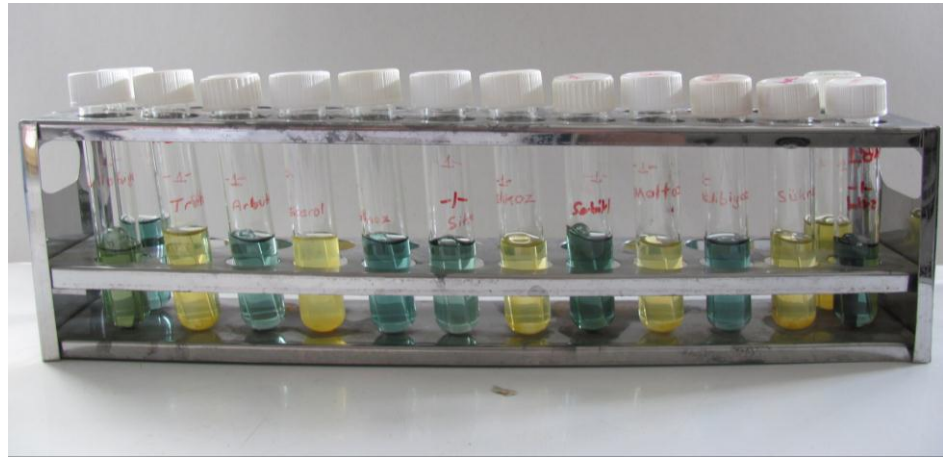
Şekil 4.44 Tek karbon kaynağında büyüme, asit ve gaz oluşum testi. Soldan sağa sırasıyla 1. tüp: Kontrol besiyeri, 2. tüp: L-arabinox'ta büyüme testi asit pozitif gaz negatif sonucu, 3. tüp: 9 nolu izolata ait D-fruktozda asit pozitif gaz negatif sonucu, 4.tüp: 10 nolu izolata ait D-fruktozda asit pozitif gaz negatif sonucu, 5. tüp: 10 nolu izolatın D-mannitolde asit ve gaz negatif büyüme pozitif sonucu 6.tüp: 9 nolu izolatın D-mannozda asit pozitifle negatif arası gaz pozitif büyüme sonucu



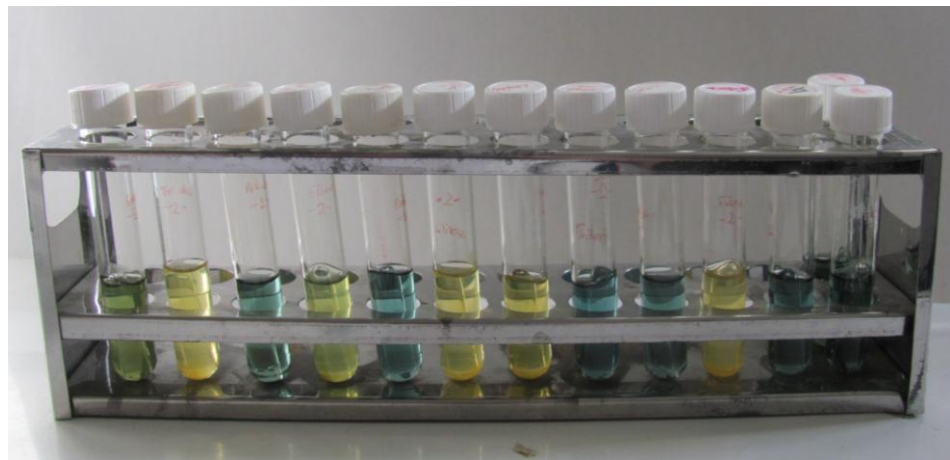
Şekil 4.45 Tek karbon kaynağı olarak D-ribozda büyüme, asit ve gaz oluşum testi. Soldan sağa sırasıyla; 1. tüp: kontrol besiyeri, diğer tüpler sırasıyla 6, 7, 8, 9, 10 nolu izolatların 5 günlük inkübasyonları sonucu büyüme durumları pozitif, asit oluşumu sadece 9 ve 10 nolu izolatlarda pozitif sonucu



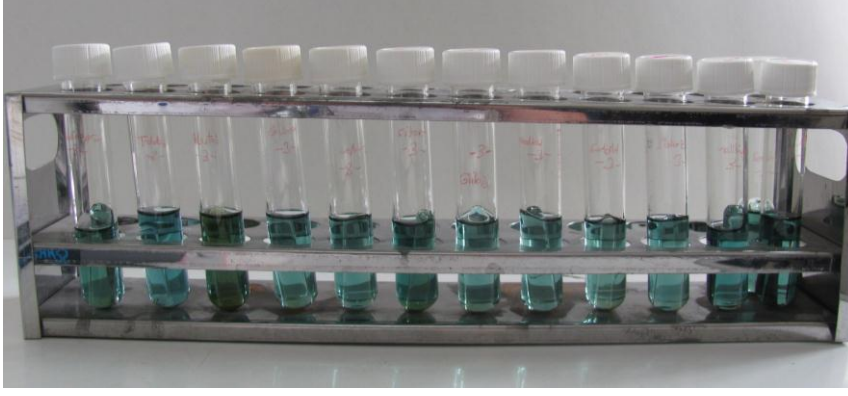
Şekil 4.46 D-mannozda sırasıyla 6, 7, 8, 9, 10 nolu izolatların büyüme, asit ve gaz oluşum testi sonuçları



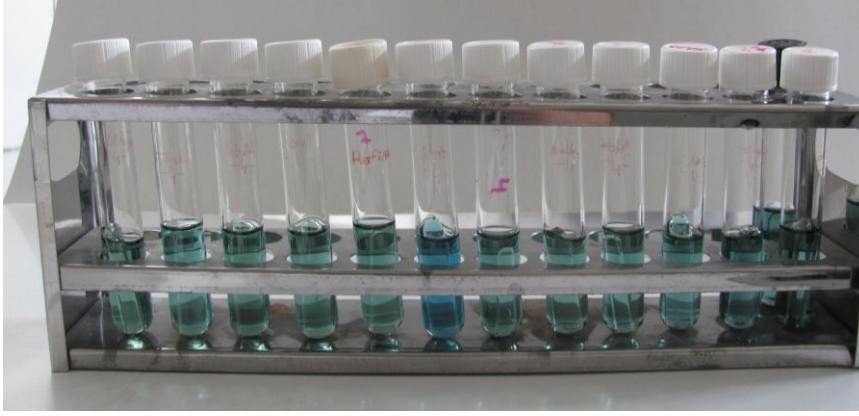
Şekil 4.47 CT-2 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları; sırasıyla arka sırada kontrol besiyeri, ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Sorbitol, Maltoz, Melibiyoz, Sükroz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.



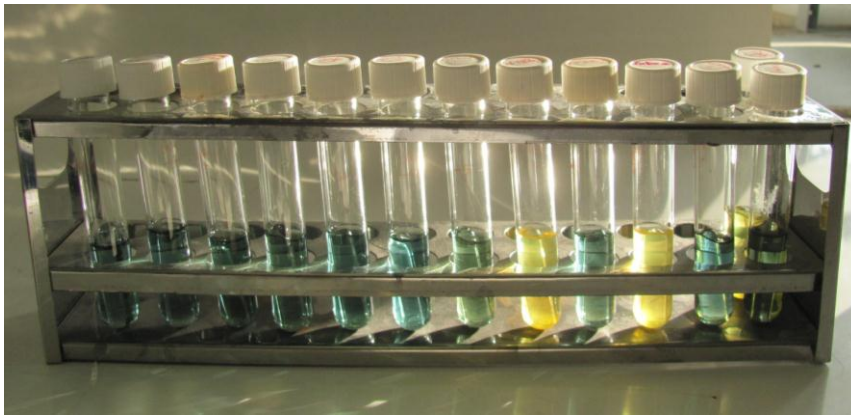
Şekil 4.48 CT-3 izolatına ait karbon kaynağı testi sonuçları; sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Glukoz, Sorbitol, Sitrat, Maltoz, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.



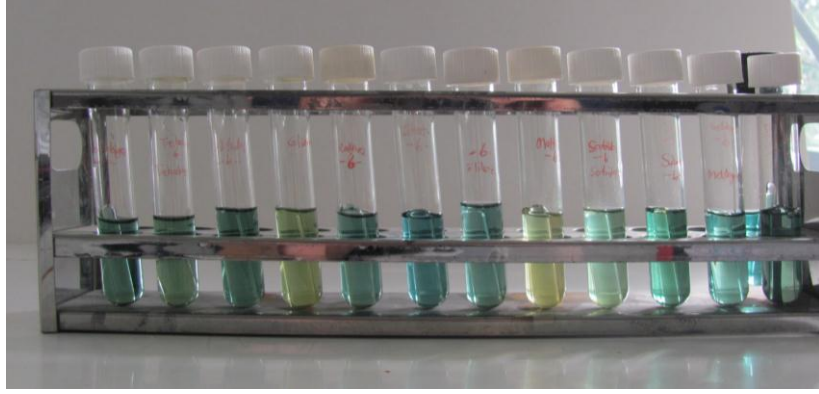
Şekil 4.49 CT-4 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları; sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltos, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.



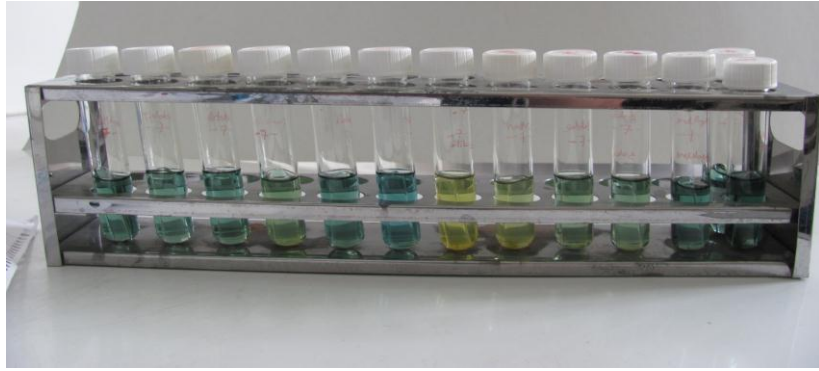
Şekil 4.50 CT-5 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları; sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltos, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.



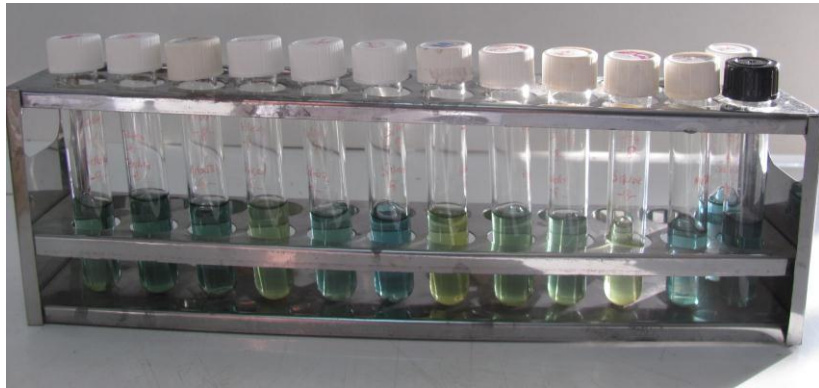
Şekil 4.51 CT-6 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları; sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltos, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.



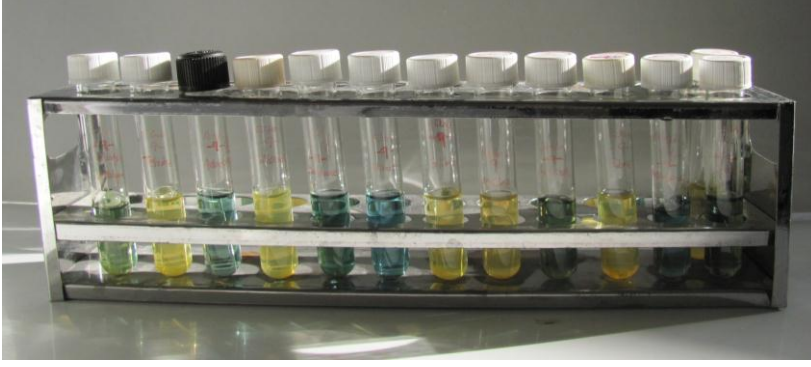
Şekil 4.52 CS-4 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.



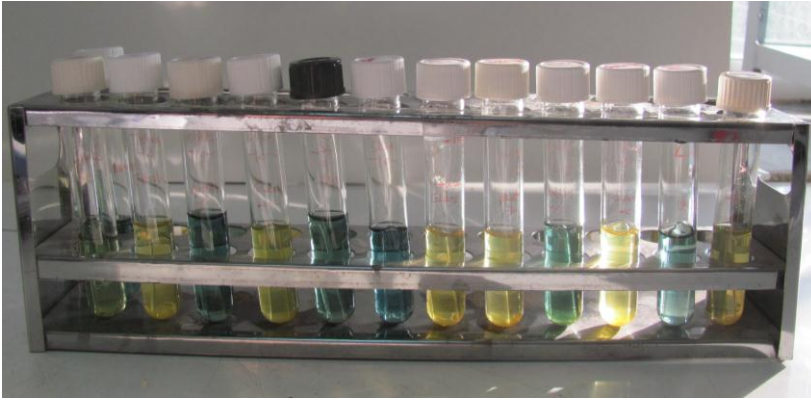
Şekil 4.53 CS-5 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.



Şekil 4.54 HT-9 izolatına ait karbon kaynakları testi sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.



Şekil 4.55 KC-2 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları sırasıyla ön sırada soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.



Şekil 4.56 KC-101 izolatına ait karbon kaynakları testi sonuçları sırasıyla arka sırada Laktoz, ön sırada sırasıyla soldan sağa Sellobiyoz, Trehaloz, Arbutin, Gliserol, Rafinoz, Sitrat, Glukoz, Maltoz, Sorbitol, Sükroz, Melibiyoz, Laktoz, arka sırada Salisin yer almaktadır.

4.4.14 Tek azot kaynağında büyüme testi sonuçları



Şekil 4.57 KC-101 izolatının azot kaynakları test besiyerinde soldan sağa sırasıyla kontrol besiyeri, Asparagin, Arginin, Metiyonin, Valin, İzolösin içeren test besiyerlerinde inkübasyon sonuçları

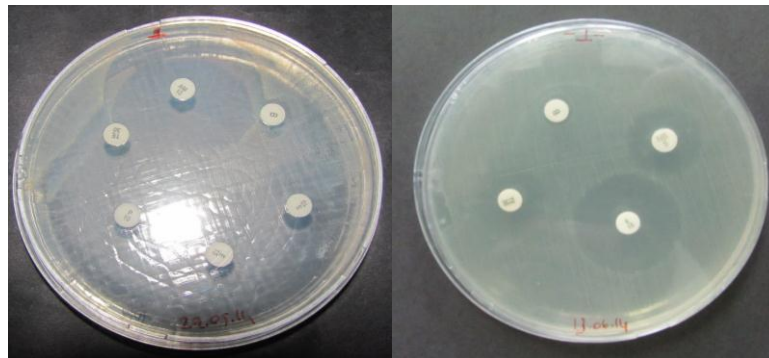


Şekil 4.58 KC-2 izolatının azot kaynakları test besiyerinde soldan sağa sırasıyla; kontrol besiyeri, Treonin, Asparagin, Lizin, Metiyonin, Serin içeren test besiyerlerinde inkübasyon sonuçları

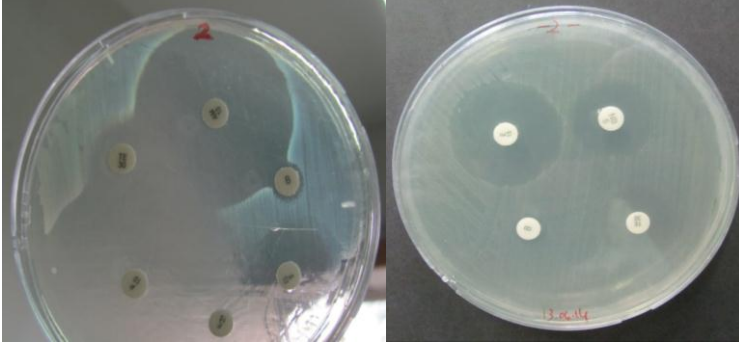
Çizelge 4.5 Azot kaynakları testi sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
L-Metiyonin	+	-	+	-	-	-	-	-	-	++
DL-Asparagin	+	+	++	-	-	++	-	+	++	++
L-Serin	+	+	+	-	+	+	-	++	++	++
L-İzolösin	+	+	+	-	-	++	++	++	-	-
L-Treonin	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
L-Sistein	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
L-Arginin	+	-	+	-	+	++	++	++	+	+
L-Valin	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
L-Lizin	+	+	+	+	+	++	-	+	-	++

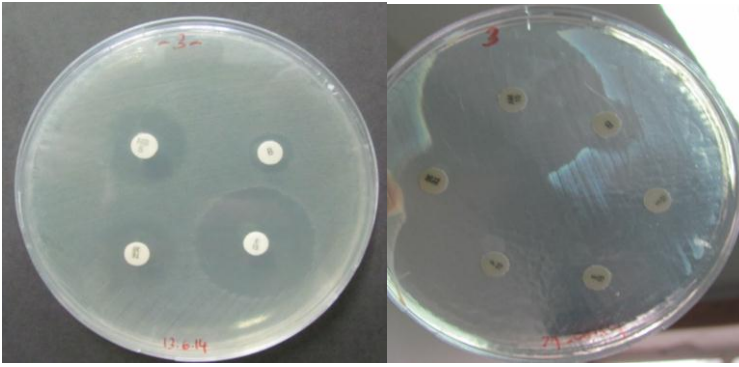
4.4.15 Antibiyotik duyarlılık test sonuçları



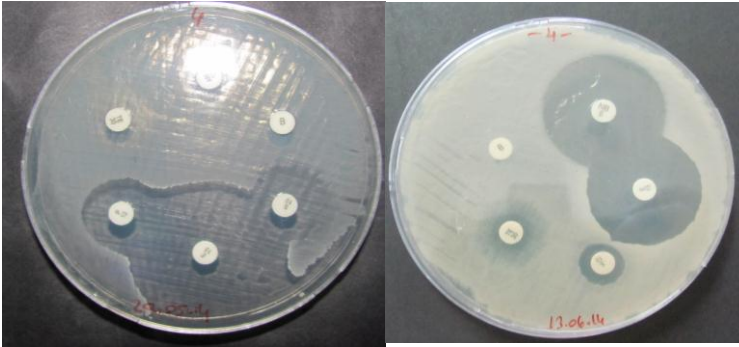
Şekil 4.59 CT-2 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları



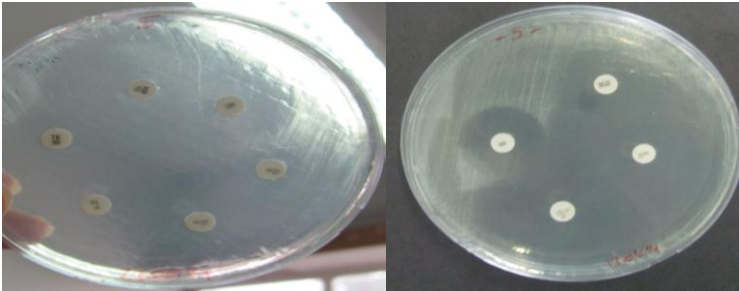
Şekil 4.60 CT-3 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları



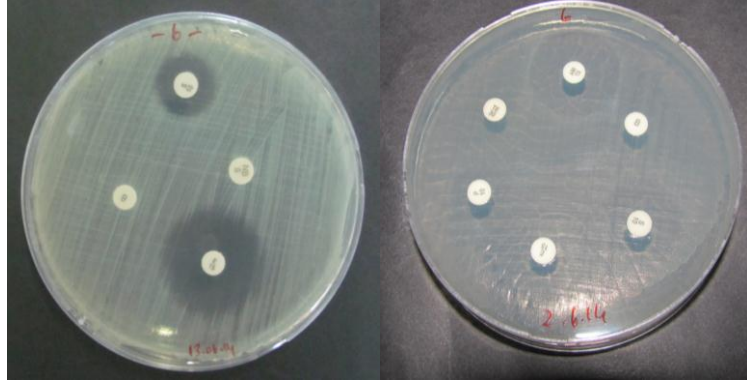
Şekil 4.61 CT-4 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları



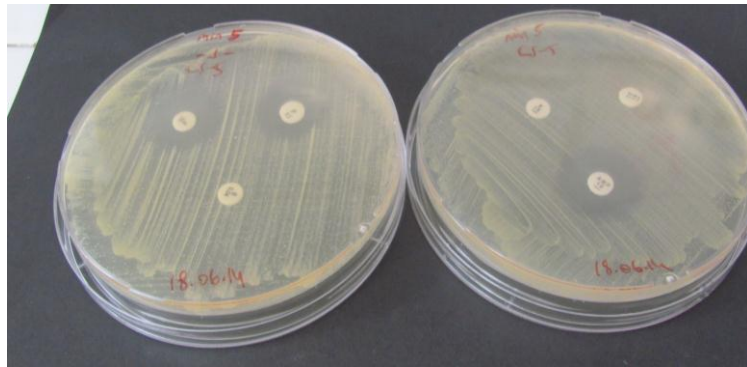
Şekil 4.62 CT-5 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları



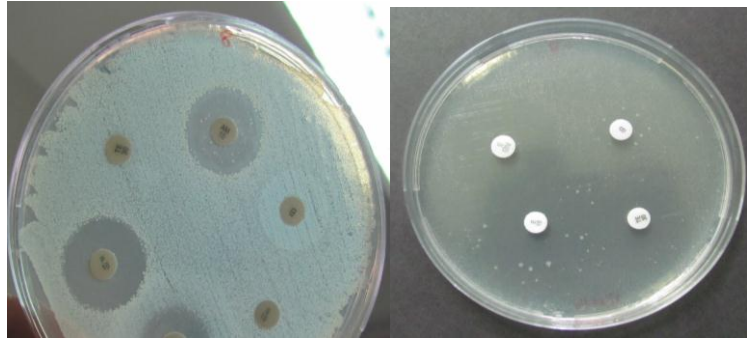
Şekil 4.63 CT-6 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları



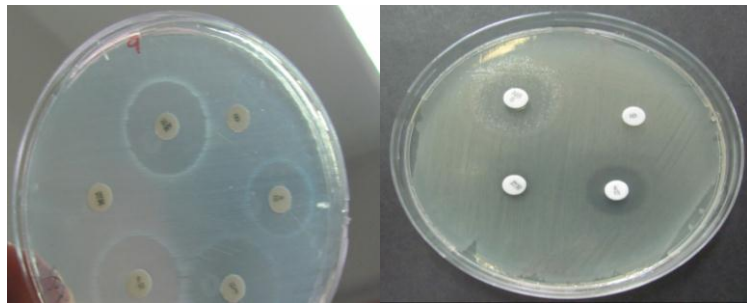
Şekil 4.64 CS-4 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları



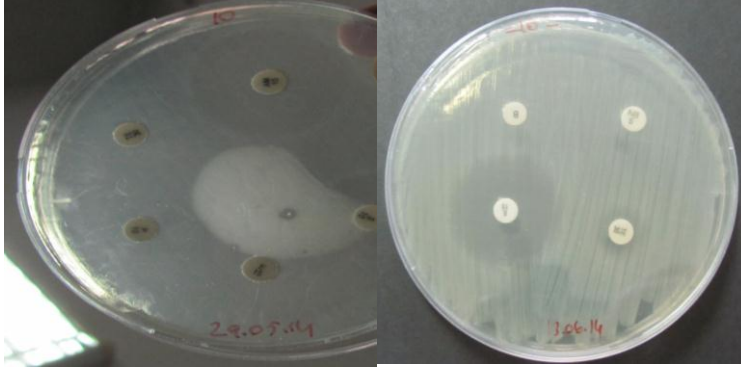
Şekil 4.65 CS-5 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları



Şekil 4.66 HT-9 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları



Şekil 4.67 KC-2 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları



Şekil 4.68 KC-101 izolatının % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde S10, B, E15, TE30, A10, P10, N5 antibiyotiklerine 24 saatlik duyarlılık testi sonuçları

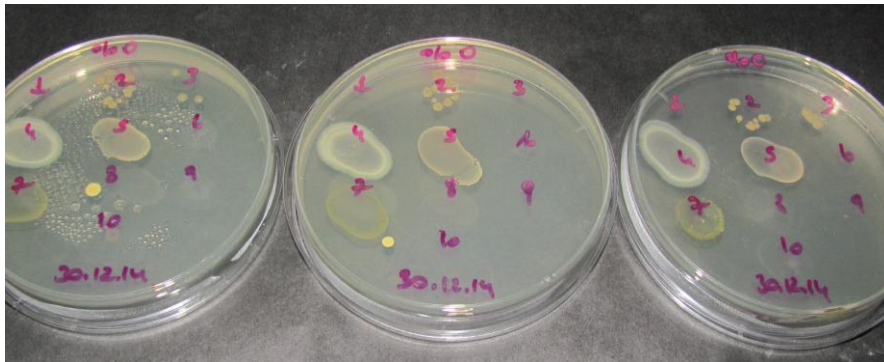
Çizelge 4.6 Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

	A10	B	TE30	S10	E15	P10	N5
CT-2	40 mm	8 mm	16 mm	28 mm	42 mm	46 mm	18 mm
CT-3	38 mm	8,5 mm	14 mm	26 mm	40 mm	44 mm	21 mm
CT-4	40 mm	18 mm	14 mm	26 mm	40 mm	44 mm	21 mm
CT-5	14 mm	7 mm	12 mm	24 mm	38 mm	19 mm	34 mm
CT-6	40 mm	28 mm	28 mm	17 mm	D	D	48 mm
CS-5	21 mm	0 mm	0 mm	10 mm	0 mm	15 mm	-
CS-4	25 mm	0 mm	0 mm	32 mm	34 mm	16 mm	0 mm
HT-9	29 mm	17 mm	0 mm	0 mm	18 mm	21 mm	30 mm
KC-2	22 mm	0 mm	0 mm	17 mm	22 mm	21 mm	24 mm
KC-	29 mm	0 mm	0 mm	21 mm	31 mm	10 mm	0 mm

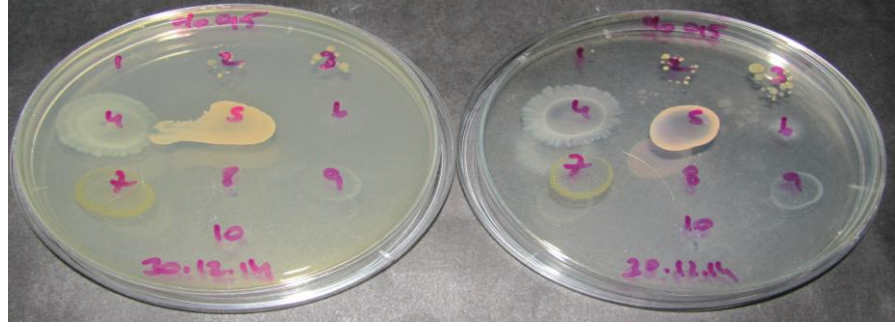
D; Duyarlı olduğu belirlenmiş ancak zon çapı ölçülememiştir. CS-5'e ait sonuçları ayrı bir zamanda test edildiği için N5 test edilememiştir.

4.4.16 Farklı NaCl konsantrasyonu testi

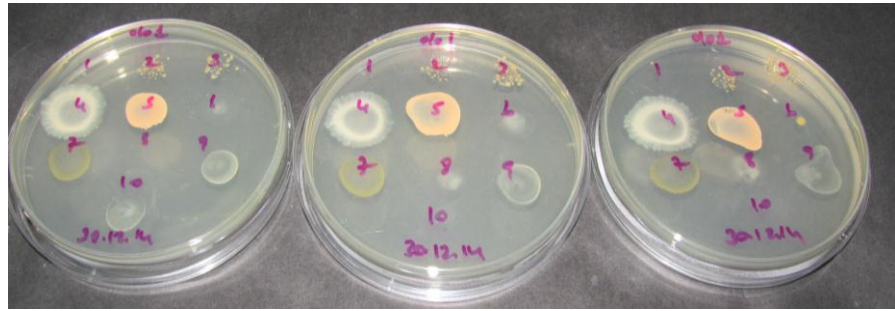
4.4.16.1 Katı kültürde spotlama tekniği ile farklı NaCl testi



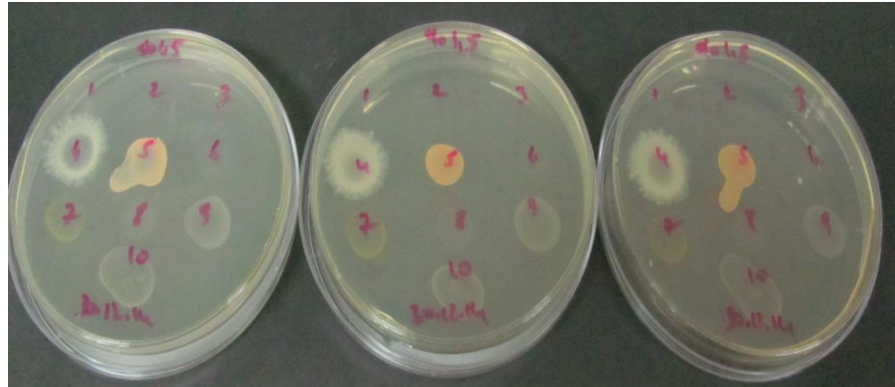
Şekil 4.69 % 0 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C'de 72 saatlik inkübasyon sonuçları



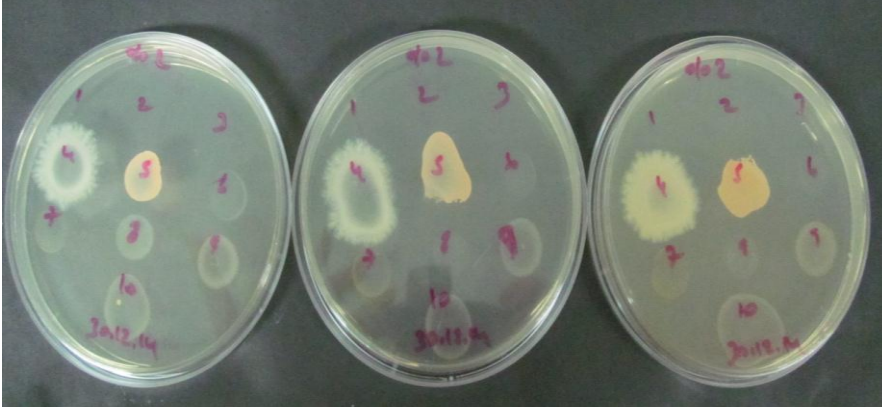
Şekil 4.70 % 0,5 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları



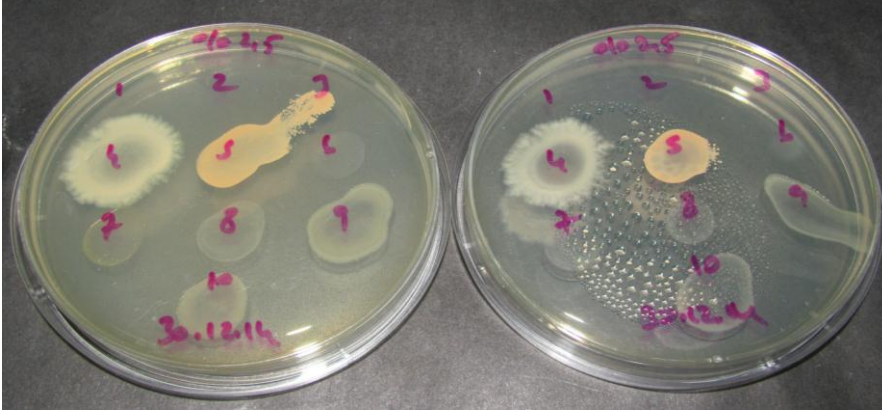
Şekil 4.71 % 1 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları



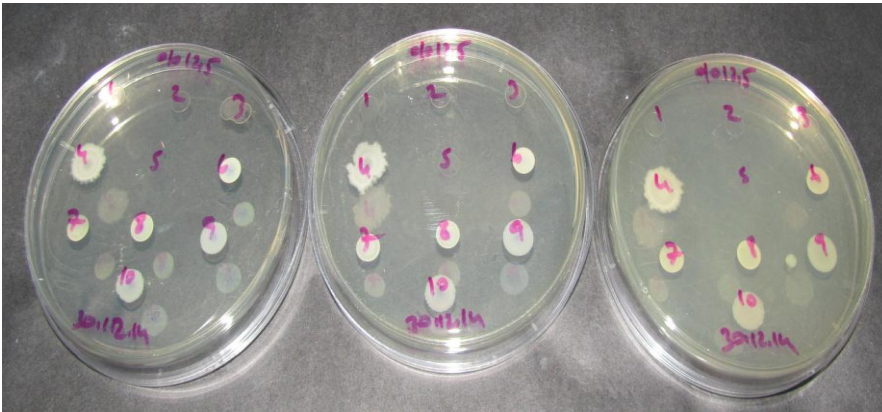
Şekil 4.72 % 1,5 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları



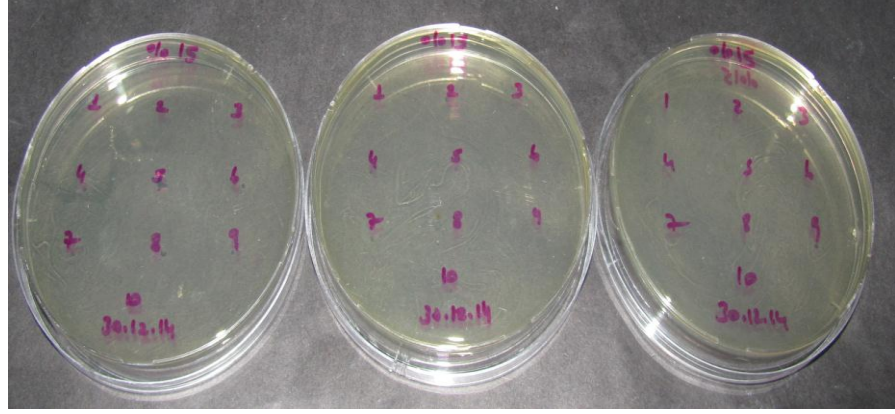
Şekil 4.73 % 2 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları



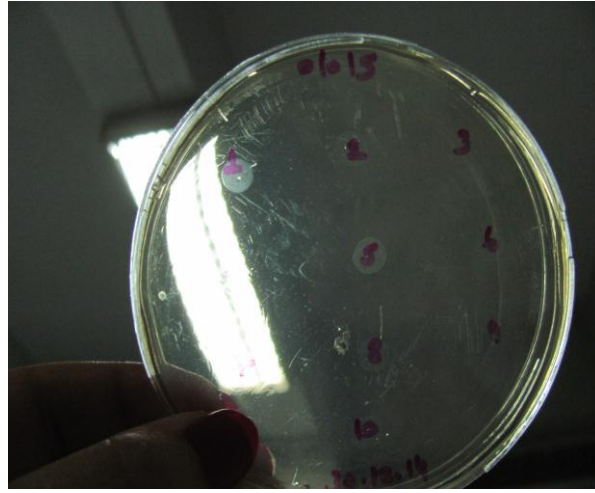
Şekil 4.74 % 2,5 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları



Şekil 4.75 % 12,5 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları

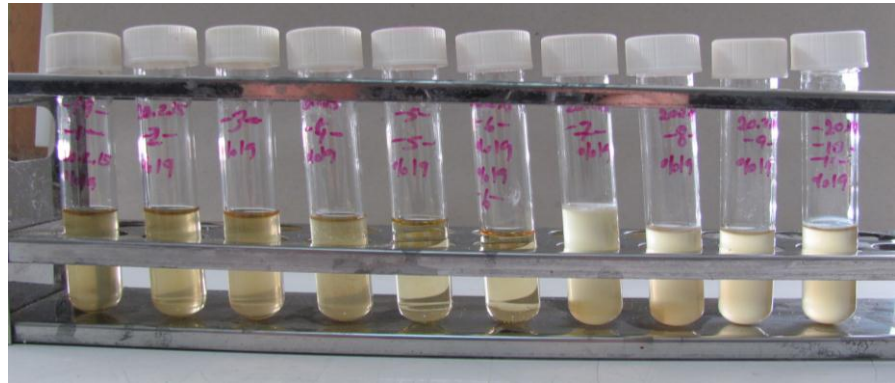


Şekil 4.76 % 15 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon sonuçları

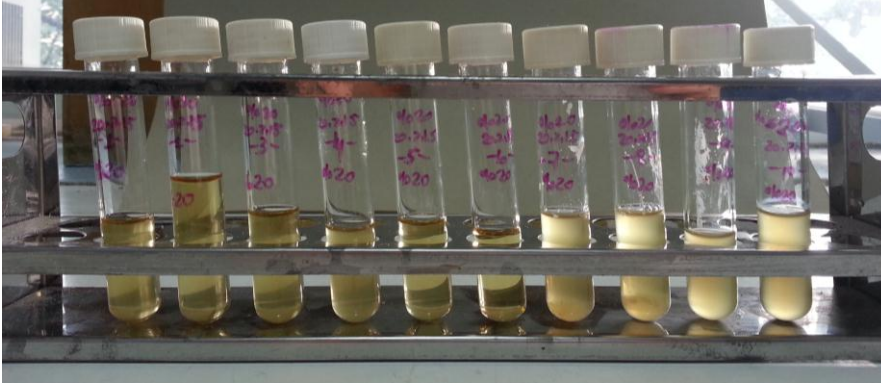


Şekil 4.77 % 15 (w/v) NaCl içeren Nutrient agar besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik inkübasyon ışıktaki görünümü

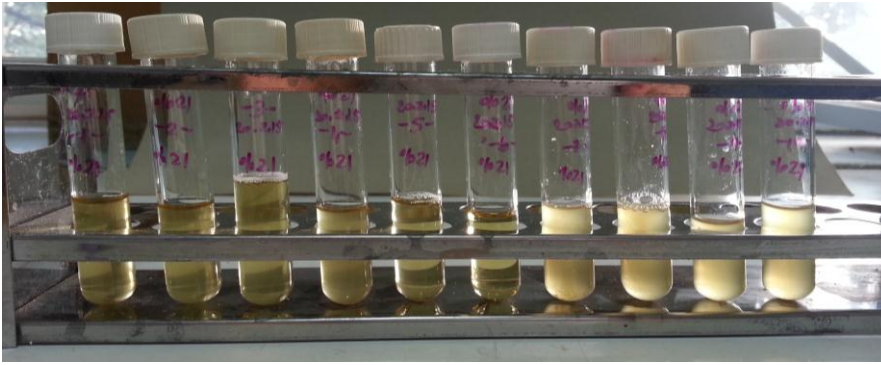
4.4.16.2 Sıvı kültürde farklı tuz konsantrasyonu testi



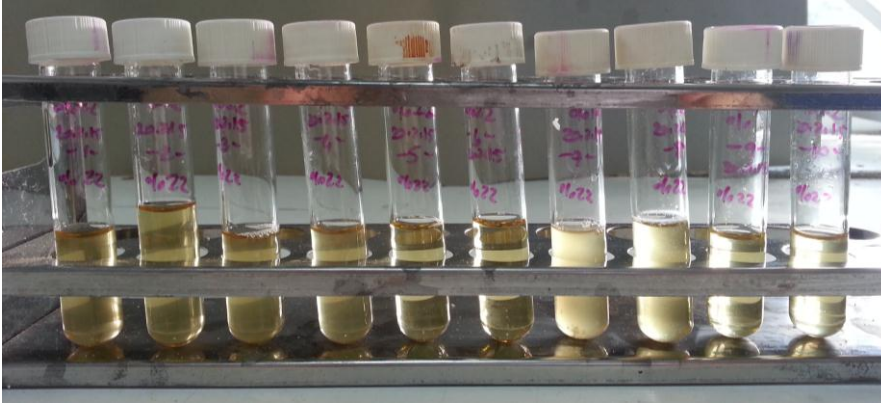
Şekil 4.78 % 19 (w/v) NaCl içeren Nutrient broth ortamında sıvı kültürde büyüme testi sonuçları



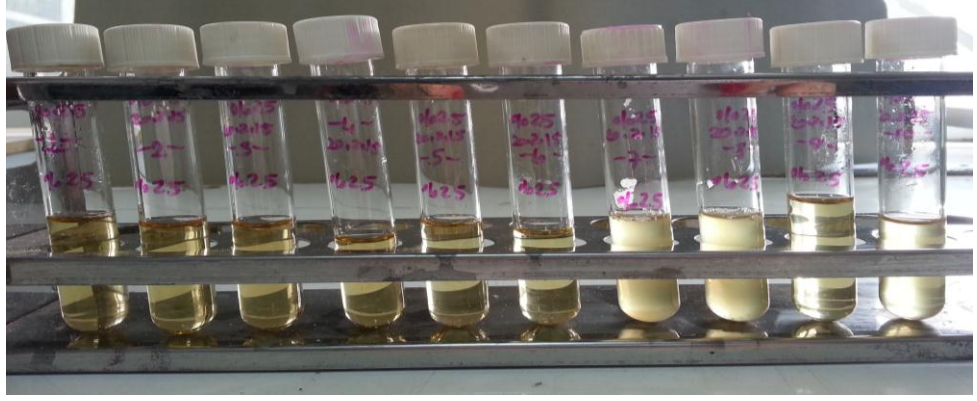
Şekil 4.79 % 20 (w/v) NaCl içeren Nutrient broth ortamında sıvı kültürde büyüme testi sonuçları



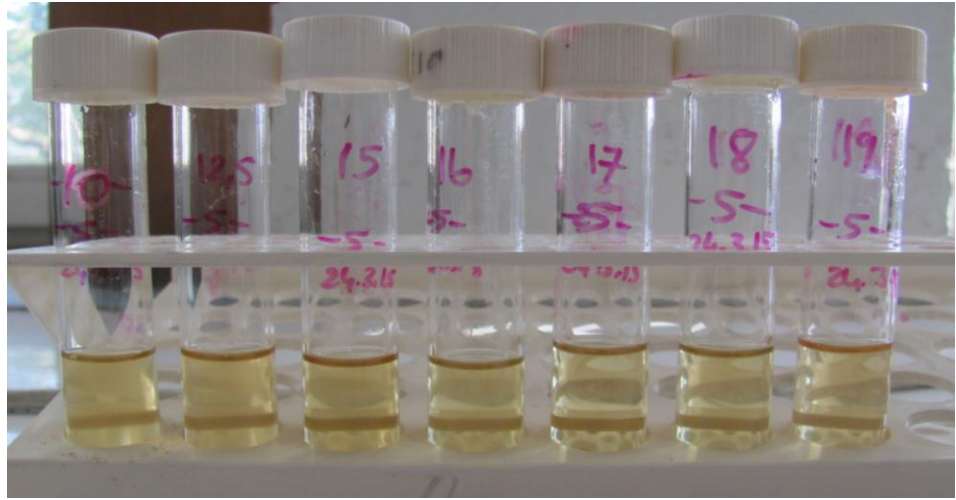
Şekil 4.80 % 21 (w/v) NaCl içeren Nutrient broth ortamında sıvı kültürde büyüme testi sonuçları



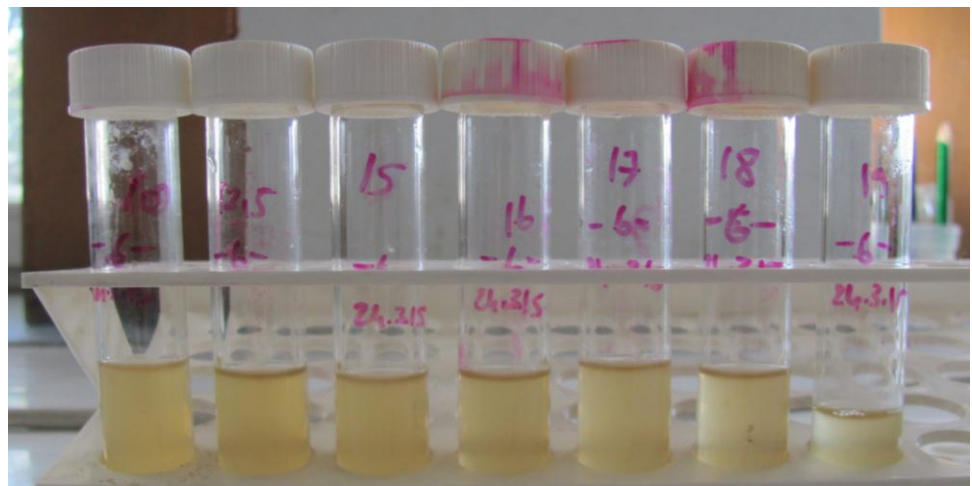
Şekil 4.81 % 22 (w/v) NaCl içeren Nutrient broth ortamında sıvı kültürde büyüme testi sonuçları



Şekil 4.82 % 25 (w/v) NaCl içeren Nutrient broth ortamında sıvı kültürde büyüme testi sonuçları



Şekil 4.83 % 10, 12,5, 15, 16, 17, 18, 19 (w/v) NaCl konsantrasyonlarında 5 nolu izolatin 5 günlük büyüme durumu (Büyümeyen izolatların tekrar edilmesi)



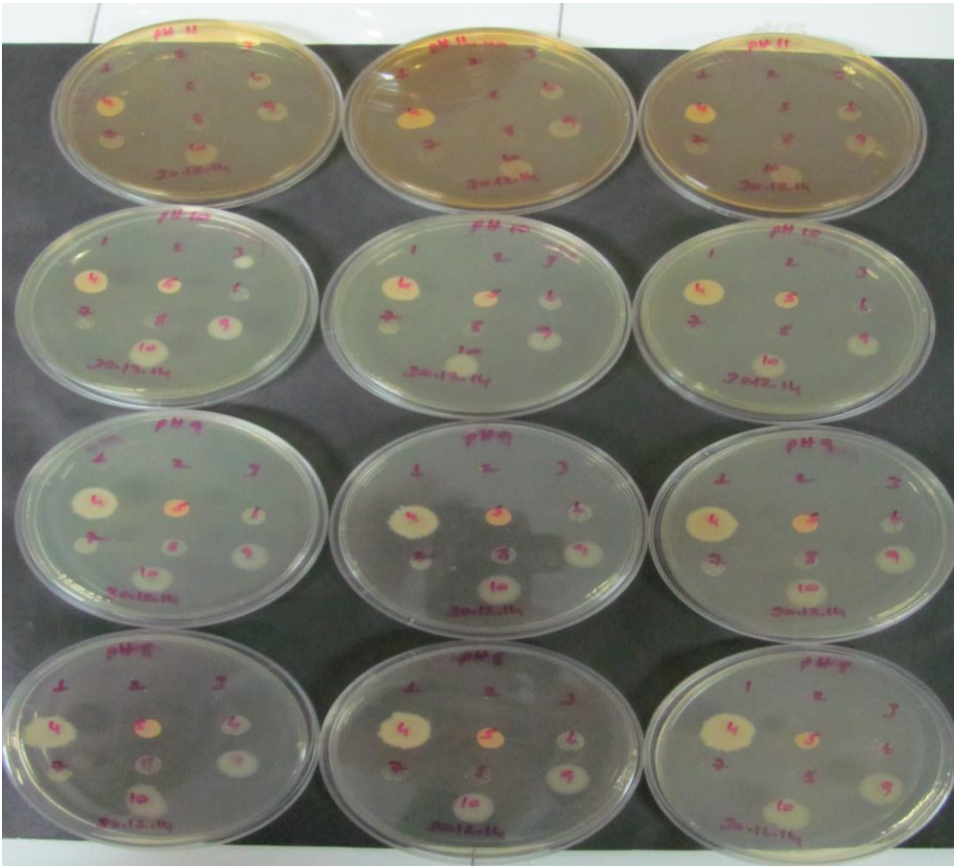
Şekil 4.84 % 10, 12,5, 15, 16, 17, 18, 19 (w/v) NaCl konsantrasyonlarında 6 nolu izolatin 5 günlük büyüme durumu (Büyümeyen izolatların tekrar edilmesi)

4.4.17. Yarı katı agarda Hareketlilik testi

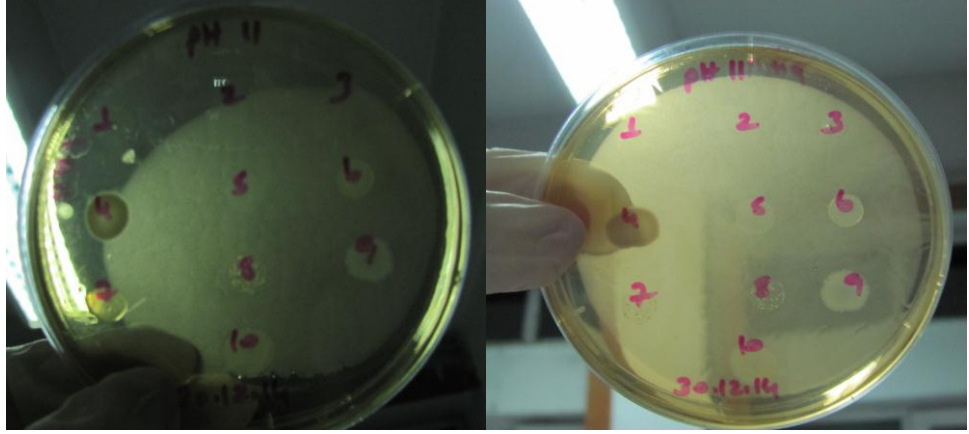


Şekil 4.85 Yarı katı agarda hareketlilik testi sonuçları

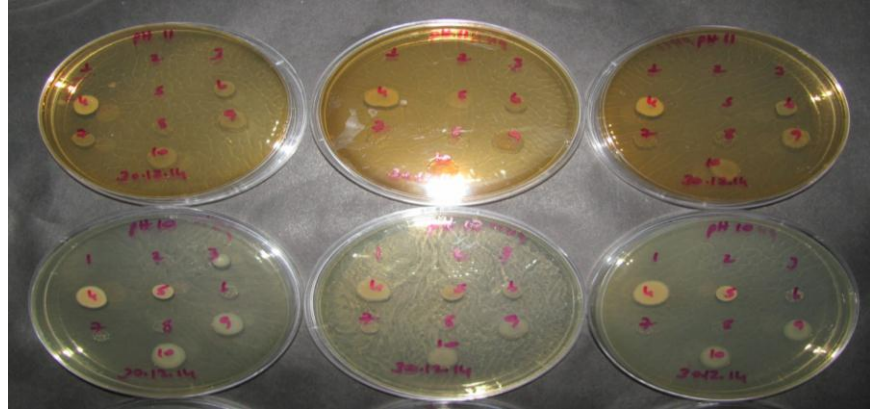
4.4.18 Farklı pH'larda büyüme testi



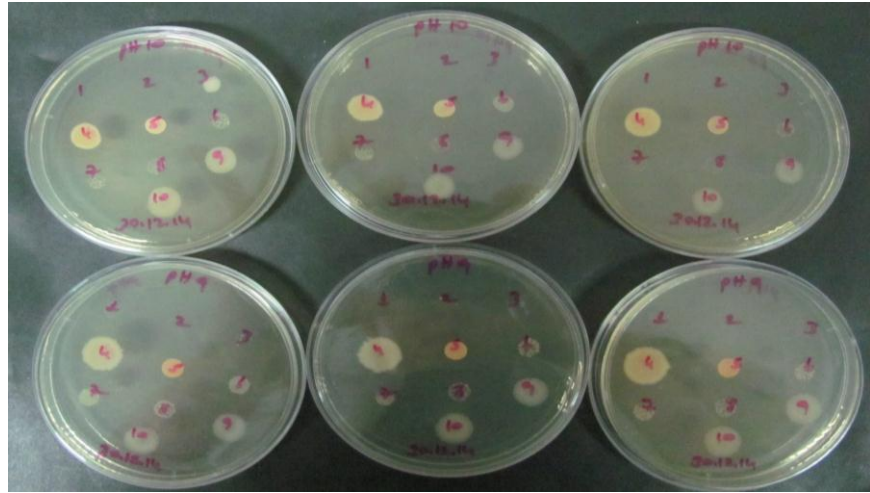
Şekil 4.86 pH 9-11 arasında 37 °C'de 72 saatlik büyüme testi sonuçları



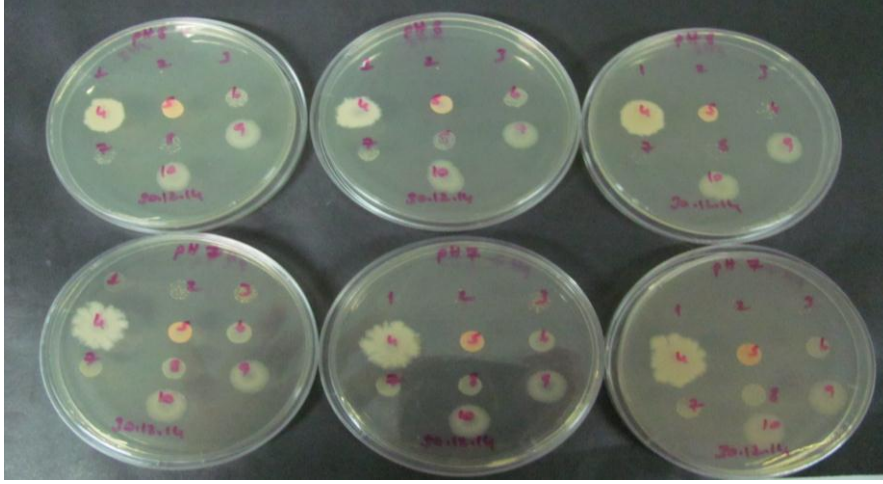
Şekil 4.87 pH 11’de 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonucunun ışık altında görünümü



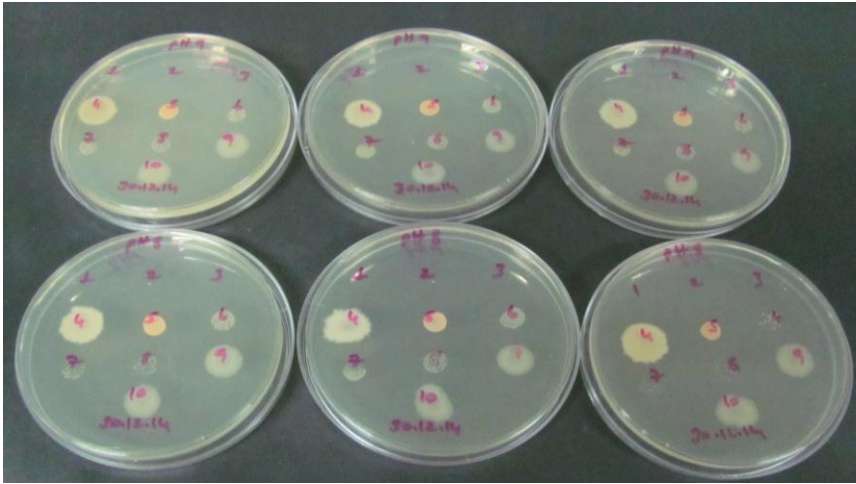
Şekil 4.88 pH 11 ve pH 10’da 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonuçları



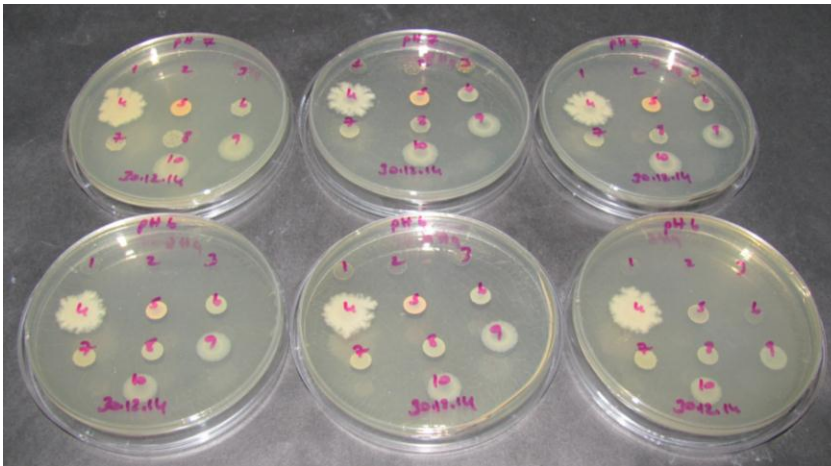
Şekil 4.89 pH 10 ve pH 9’da 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonuçları



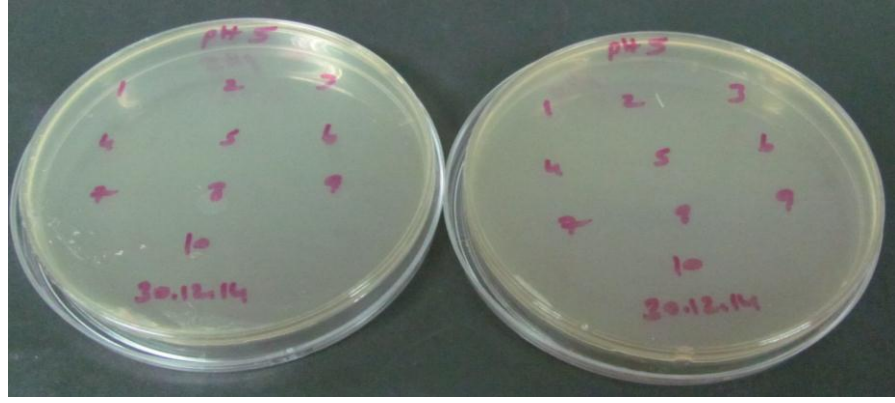
Şekil 4.90 pH 9 ve pH 8’de 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonuçları



Şekil 4.91 pH 8 ve pH 7’de 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonuçları

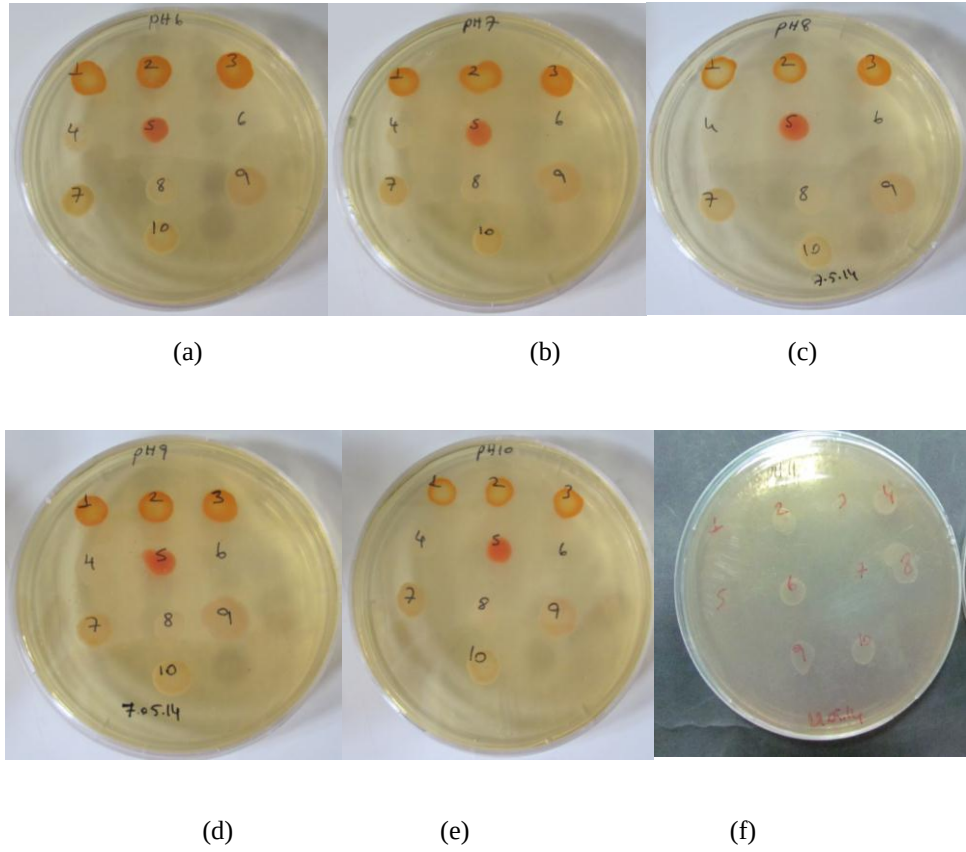


Şekil 4.92 pH 7 ve pH 6’de 37 °C’de 72 saatlik büyüme testi sonuçları



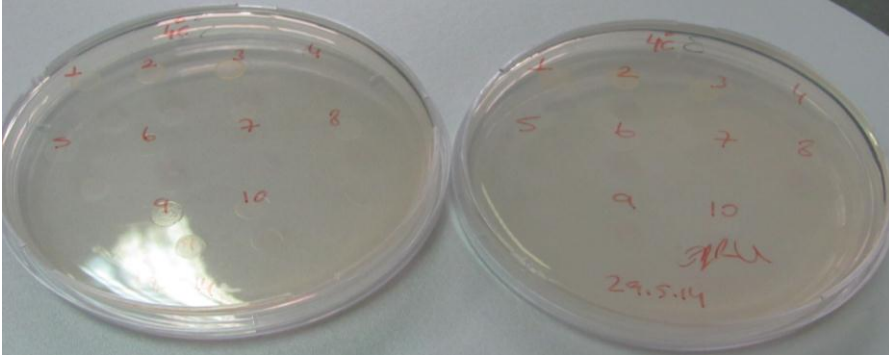
Şekil 4.93 pH 5'te 37 °C'de 72 saatlik büyüme testi sonuçları

4.4.19 Farklı pH'da büyüme testi sonuçları

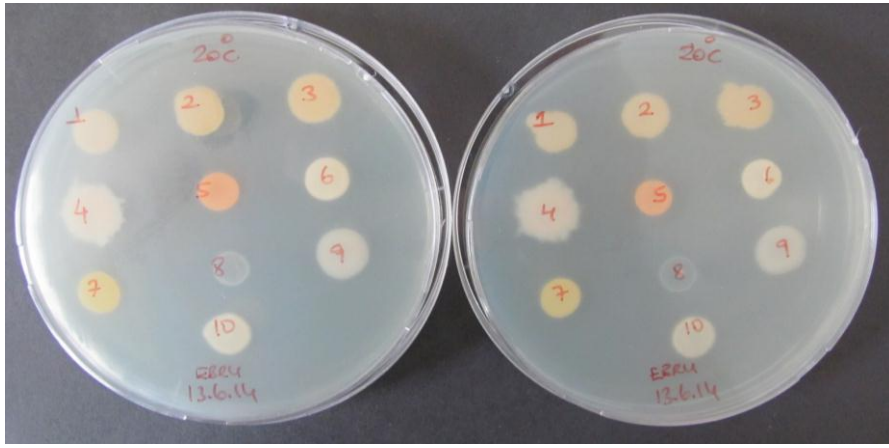


Şekil 4.94 (a), (b), (c), (d), (e), (f)'de sırasıyla pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10 ve pH 11'de büyüme testi sonuçları verilmiştir. (a), (b), (c), (d), (e), (f)'de gösterilen petriler buzdolabında bekletildikten sonra fotoğrafı çekilmiş ve soğukta pigment oluşturdıkları görülmüştür. F'nin analizi daha sonra yapılmış olup soğukta bekletilmemiştir ve pigment oluşumu gözlenmemiştir. % 5 (w/v) total tuz içeren MH broth 37 °C'de 2 gün inkübe edilmiştir

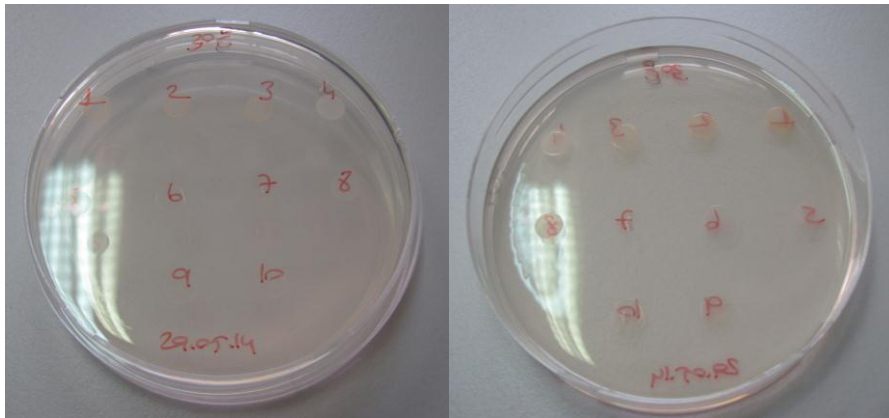
4.4.20 Farklı sıcaklıklarda büyüme testi sonuçları



Şekil 4.95 4 °C'de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 24 saatlik büyüme testi sonuçları



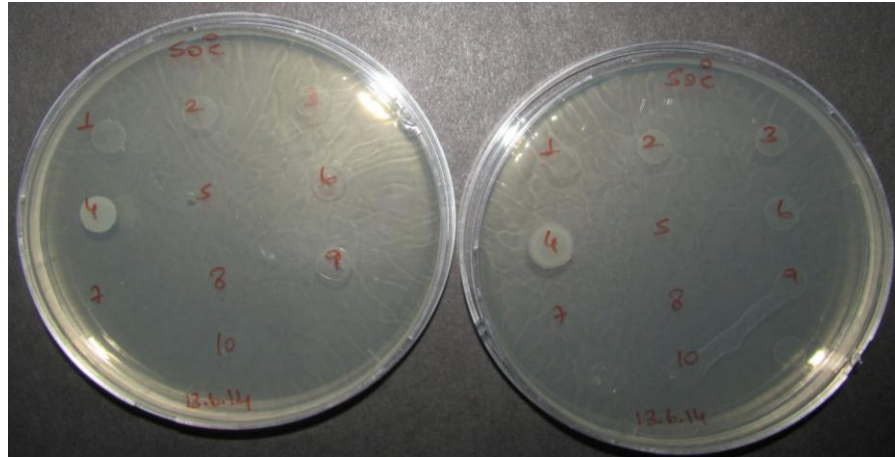
Şekil 4.96 20 °C'de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 72 saatlik büyüme testi sonuçları



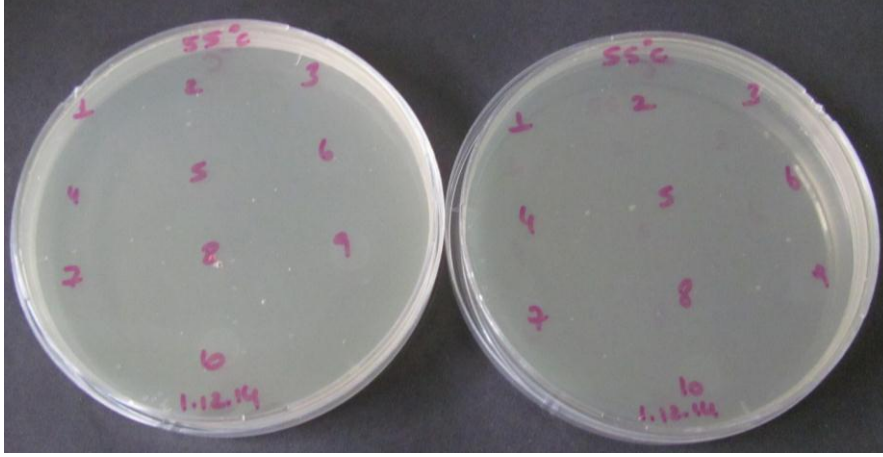
Şekil 4.97 30 °C'de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 24 saatlik büyüme testi sonuçları



Şekil 4.98 45 °C’de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 24 saatlik büyüme testi sonuçları

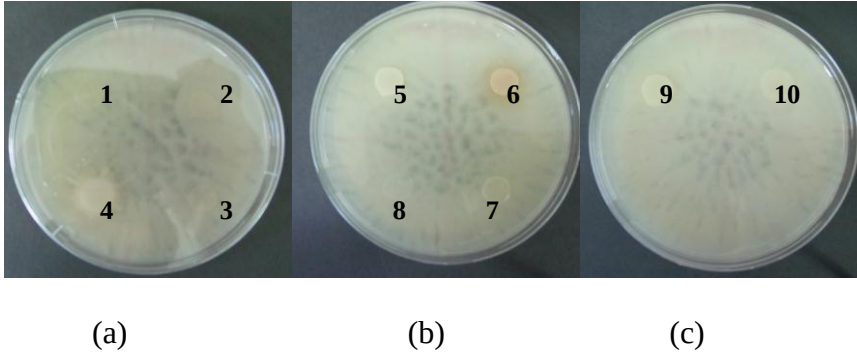


Şekil 4.99 50 °C’de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 24 saatlik büyüme testi sonuçları



Şekil 4.100 55 °C’de % 5 (w/v) total tuz içeren MH besiyerinde 24 saatlik büyüme testi sonuçları

4.4.21 Tirozin hidrolizi



Şekil 4.101 (a)-1, 2, 3, 4 nolu izolatlar (b)-5, 6, 7, 8 nolu izolatlar (c)-9, 10 nolu izolatların tirozin hidroliz test sonuçları

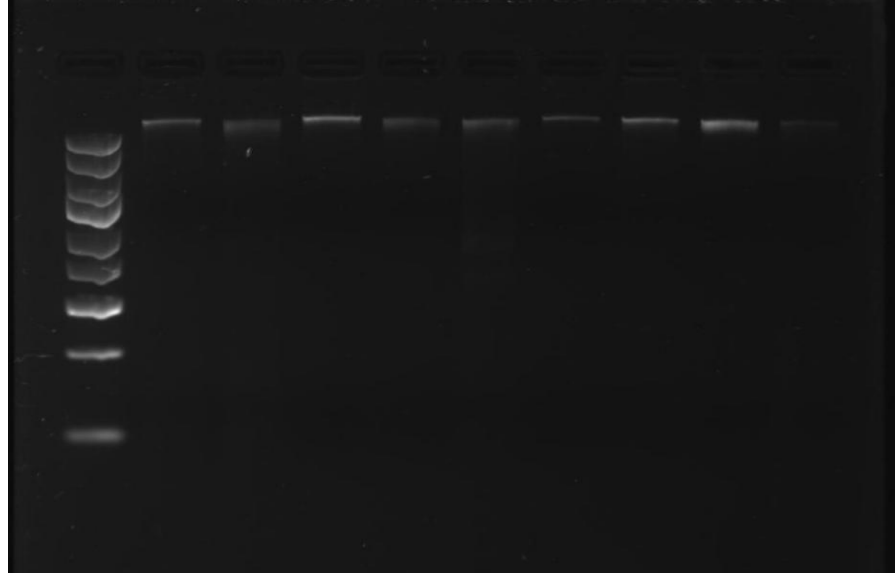
4.5 Genetik Tamı Sonuçları

4.5.1 Genomik DNA saflığının belirlenmesi

Çizelge 4.7 16S için Nanodrop değerleri

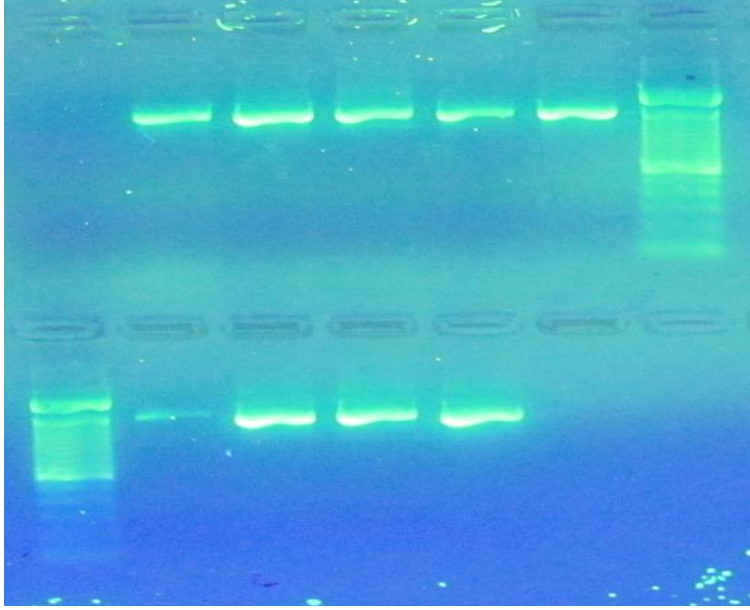
Kod	DNA konsantrasyo ng/μl	260/280	260/230	DNA hacmi	Kullanılan miktarı	20 μl su+ 12,5 μl rxn karışımı
CT-2	13,7	1,35	0,55	7 μl	10,5 μl	32,5 μl
CT-3	11,9	1,71	1,72	8 μl	9,5 μl	32,5 μl
CT-4	21,9	1,51	0,81	5 μl	12,5 μl	32,5 μl
CT-5	20,2	1,74	1,66	5 μl	12,5 μl	32,5 μl
CT-6	17,8	1,88	1,24	6 μl	11,5 μl	32,5 μl
CS-4	13,6	1,57	0,88	7 μl	10,5 μl	32,5 μl
CS-5	7,7	1,44	0,65	12 μl	5,5 μl	32,5 μl
HT-9	14,7	1,50	0,95	7 μl	10,5 μl	32,5 μl
KC-2	21,5	1,17	0,37	6 μl	11,5 μl	32,5 μl
KC-101	8,1	1,57	0,83	12 μl	5,5 μl	32,5 μl
Kontrol	İlk apirojen su	-	-	10 μl	7,5 μl	32,5 μl
Kontrol	İkinci apirojensu	-	-	10 μl	7,5 μl	32,5 μl

4.5.2 Genomik DNA ekstraksiyonunun agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi



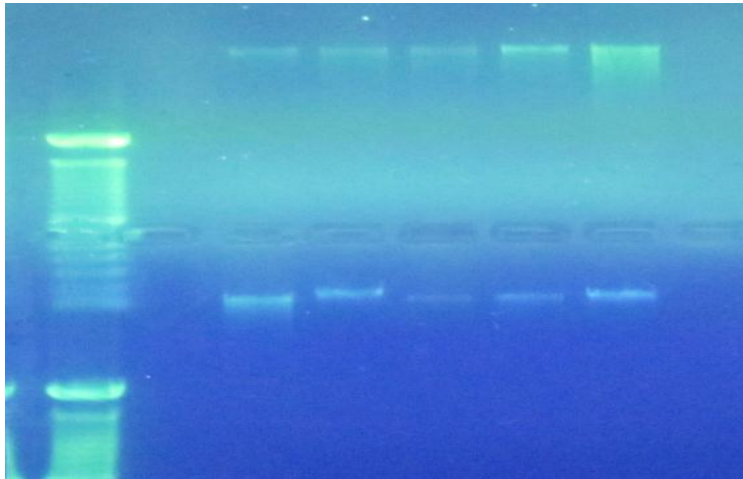
Şekil 4.102 % 1'lik (w/v) agaroz jelde (1X TBE pH 8,0) genomik DNA'ların yürütülmesi. 1. kuyucuk: Fermentas Markır (5000 bp), 2. CT-2, 3. CT-3, 4. CT-4, 5. CT-5, 6. CT-6, 7. CS-4, 8. CS-5, 9. HT-9, 10. KC-2. Not: KC-101 yüklenmemiştir

4.5.3 16S rRNA gen bölgesinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi



Şekil 4.103 % 1,8 (w/v) agaroz jelde (1X TBE pH 8,0) 16S rRNA geni PCR ürünlerinin yürütülmesi. Markır: Invitrogen (100 bp DNA ladder 100-2072 bp arası) Üst jel soldan sağa sırasıyla 1. kuyucuk CT-2, CT-3, CT-4, CT-5, CT-6, CS-4, 7. kuyucuk markır. Alt Jel: 1. kuyucuk markır, CS-5, HT-9, KC-2, KC-101, son kuyucuk negatif kontrol

4.5.4 Ektoin sentaz gen bölgesi tayini için genomik DNA izolasyonu



Şekil 4.104 Genomik DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi. Sırasıyla ilk kuyucuklar markır (100 bp Invitrogen 100-2072 bp arası). İkinci kuyucuklar boş, sonraki kuyucuklar sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5 nolu izolatlar üst jelde, alt jelde ise 6, 7, 8, 9, 10 nolu izolatlar yüklenmiştir

4.5.5 Ektoin gen bölgesi taraması için genomik DNA izolasyonu nanodrop değerleri

Çizelge 4.8 Nanodrop değerleri

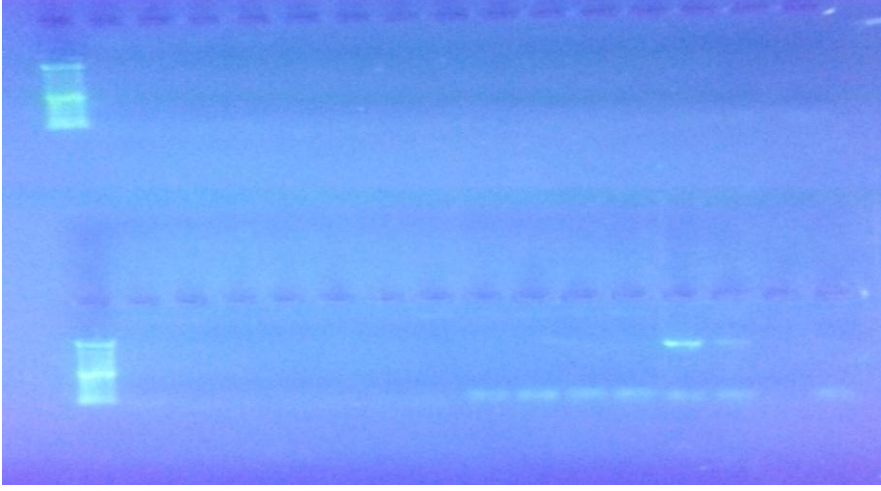
Kod	DNA	260/280	260/230	DNA (μl)	50 μl ³ ye
CT-2	29	2,06	1,37	2	35,5
CT-3	10,2	1,96	1,06	2	35,5
CT-4	10,6	1,92	1,15	2	35,5
CT-5	13,2	1,90	0,96	2	35,5
CT-6	48,1	1,77	1,08	2	35,5
CS-4	81,6	2,01	1,97	2	35,5
CS-5	24,8	1,99	1,46	2	35,5
HT-9	62,2	2,07	1,55	2	35,5
KC-2	27,8	1,93	1,52	2	35,5
KC-101	15,6	1,85	0,93	2	35,5

4.5.6 Ektoin gen bölgesi taraması için gradient PCR Planı

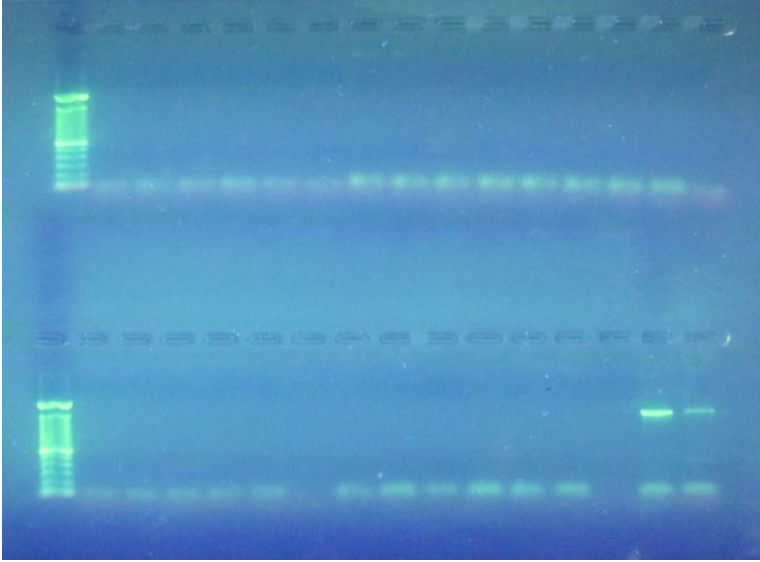
Çizelge 4.9 Ektoin gen bölgesi taraması için gradient PCR Planı

[illegible]

4.5.7 Ektoin gen bölgesi taraması için gradient PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi



Şekil 4.105 Yükleme sırası ilk 32; 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder (Invitrogen) (100-2072 bp arası) 2. kuyucuk 5-1, 40 °C, 42 °C, 44 °C, 46 °C; 6. kuyucuk 6-1 40 °C, 42 °C, 44 °C, 46 °C, 10. kuyucuk 7-1 40 °C, 42 °C, 44 °C, 46 °C; 4-40 °C, 42 °C, 44 °C, Alt jel 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder (Invitrogen) 2. kuyucuk 4-46 °C; 10-1 40 °C, 42 °C, 44 °C, 46 °C, 48 °C, 7-1 48 °C, 7-2 50 °C, 7-2 52 °C, 7-2 54 °C, 7-2 56 °C, 1-16S 58 °C, 9-16S 58 °C, Negatif kontrol 58 °C, 7-2 62 °C



Şekil 4.106 İkinci 32 yükleme sırası: 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder (Invitrogen) (100-2072 bp arası) 2. kuyucuk, 2- 48 °C, 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C; 8. kuyucuk 7-2-58 °C, 60 °C, 10. kuyucuk 10-2 50 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C; 16. kuyucuk 8- 50 °C, Alt Jel ise 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder (Invitrogen), 2. kuyucuk 8- 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C, 7. kuyucuk 9- 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C, 14. kuyucuk negatif kontrol, 15. kuyucuk CT-2 (16S) 58 °C, 16. kuyucuk KC-2 (16S) Pozitif kontrol 58 °C

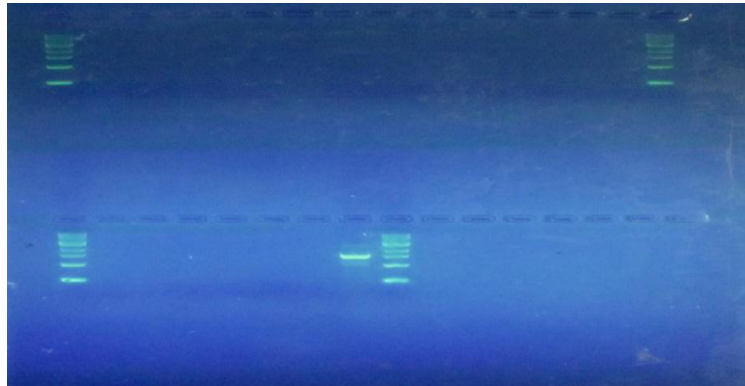
4.5.8 Ektoin gen bölgesi taraması için gradient PCR sonucu

Çizelge 4.10 Ektoin gen bölgesi taraması için gradient PCR sonucu

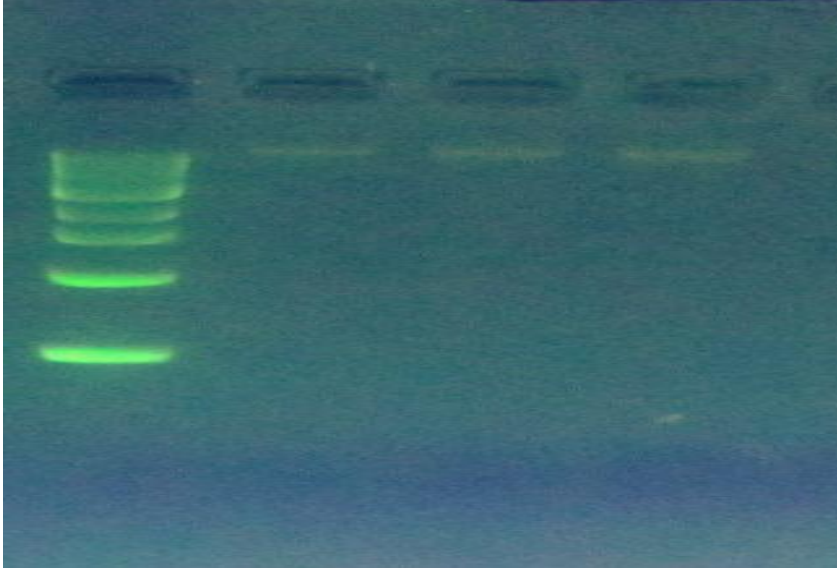
	40°C	42°C	44°C	46°C	48°C	50°C	52°C	54°C	56°C	58°C	60°C	62°C
2-F2R2					-	-	-	-	-	-		
4-F3R3	-	-	-	-								
5-1-F5R5	+	+	+	+								
6-1-F5R5	-	-	-	-								
7-1-F5R5	+	+	+	+	+							
8-F4R4						+	+	+	+	+	+	
9-F1R1						-	-	-	-	-	-	-
10-1-F5R5	-	-	-	-	-							
7-2-F6R6						+	+	+	+	+	+	+
10-2-F6R6						-	-	-	-	-	-	-
Negatif Kontrol										-		
1-16S (Pozitif Kontrol)										+		
9-16S (Pozitif Kontrol)										+		

Not: Çizelgedeki Negatif K. Negatif kontrol anlamına gelmektedir. Reaksiyonda kullanılan steril apirojen su kullanılarak yapılan reaksiyonu temsil etmektedir. 1-16S ve 9-16S ise 1 ve 9 nolu izolatların genomik DNA'sı kullanılarak 16S rRNA gen primerleri ile Taq polimeraz enzimi için pozitif kontrollerdir. Bantlar büyük boyutlu olmaları nedeniyle oldukça silik çıkmıştır.

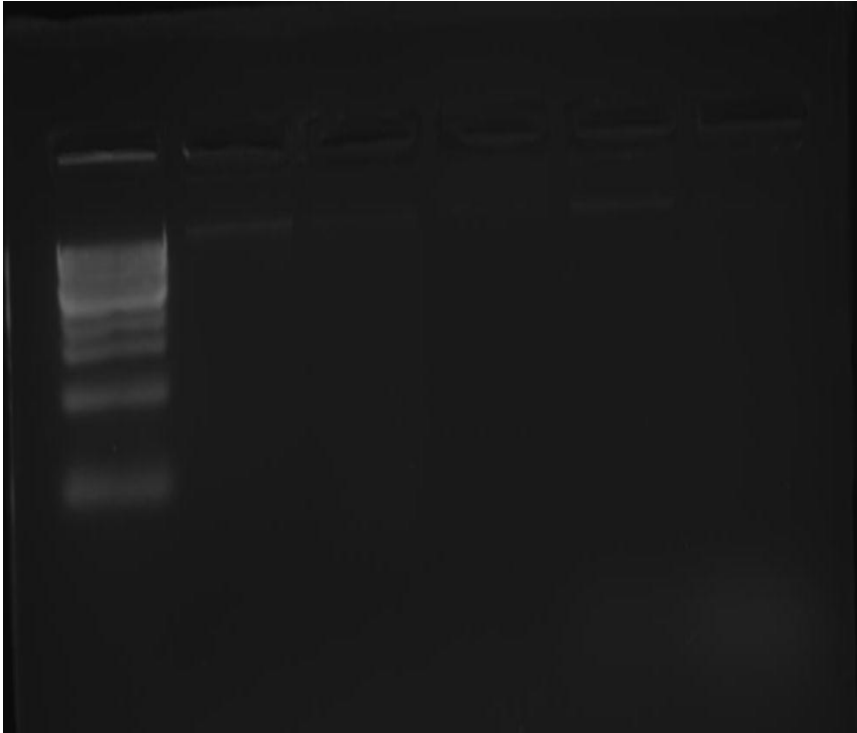
4.5.9. Ektoin sentaz gen bölgesi için gradient PCR sonucunun tekrarlanması



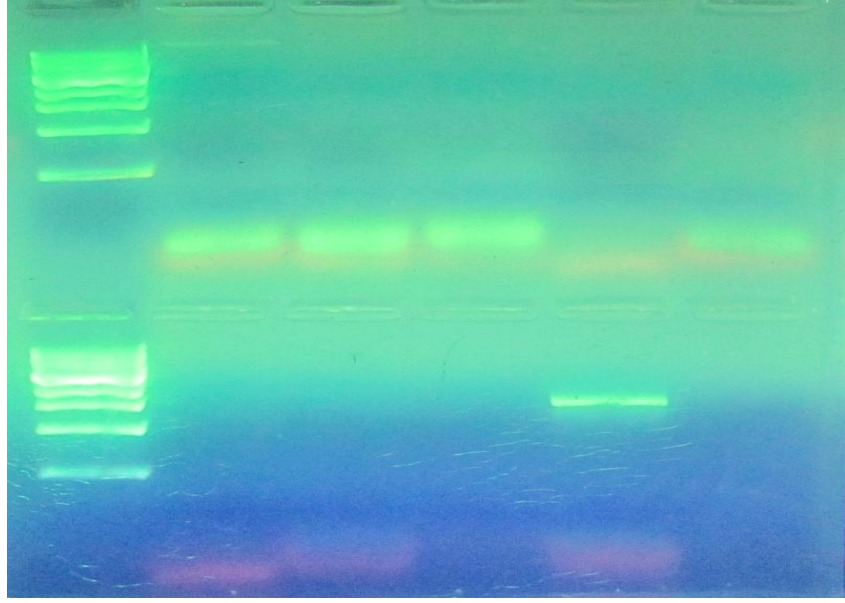
Şekil 4.107 Üst jelde 1 ve 16. kuyucuklarda 100 bp DNA ladder (Invitrogen) 7. 8. 9. kuyucuklarda 5 numaralı örneğe ait bant zayıf pozitif, alt jelde 1 ve 9. kuyucuklar markır 8. kuyucuk (16S rRNA geni) enzim için pozitif kontroldür. 7 (52 °C), 7 (56 °C), 7 (60 °C), 8 (52 °C), 8 (56 °C), 8 (60 °C), 9 (52 °C), markır, 10-2 (52 °C), 10-2 (60 °C), 10-2 (52 °C), 10-2 (56 °C), 10-2 (60 °C), 1 (52 °C), 2 (44 °C), 2 (48 °C), 2 (52 °C), 2 (56 °C) sonuç negatif çıkmıştır.



Şekil 4.108 % 2 (w/v) agaroz jelde gradient PCR tekrarının yürütülmesi. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder (Invitrogen) 5- (44 °C) 5- (48 °C) 5- (52 °C), 12 µl yüklenmiştir



Şekil 4.109 % 1,8 (w/v) agaroz jelde gradient PCR pozitif sonuçlarının tekrar yürütülmesi. Markır (1 kb NEB), sırasıyla 2. kuyucuk: 5-1, 3. kuyucuk: 7-2 4. kuyucuk 7-1, 5. kuyucuk: 8, 6. kuyucuk: 9 nolu izolatlar 50'şer µl yüklenmiştir



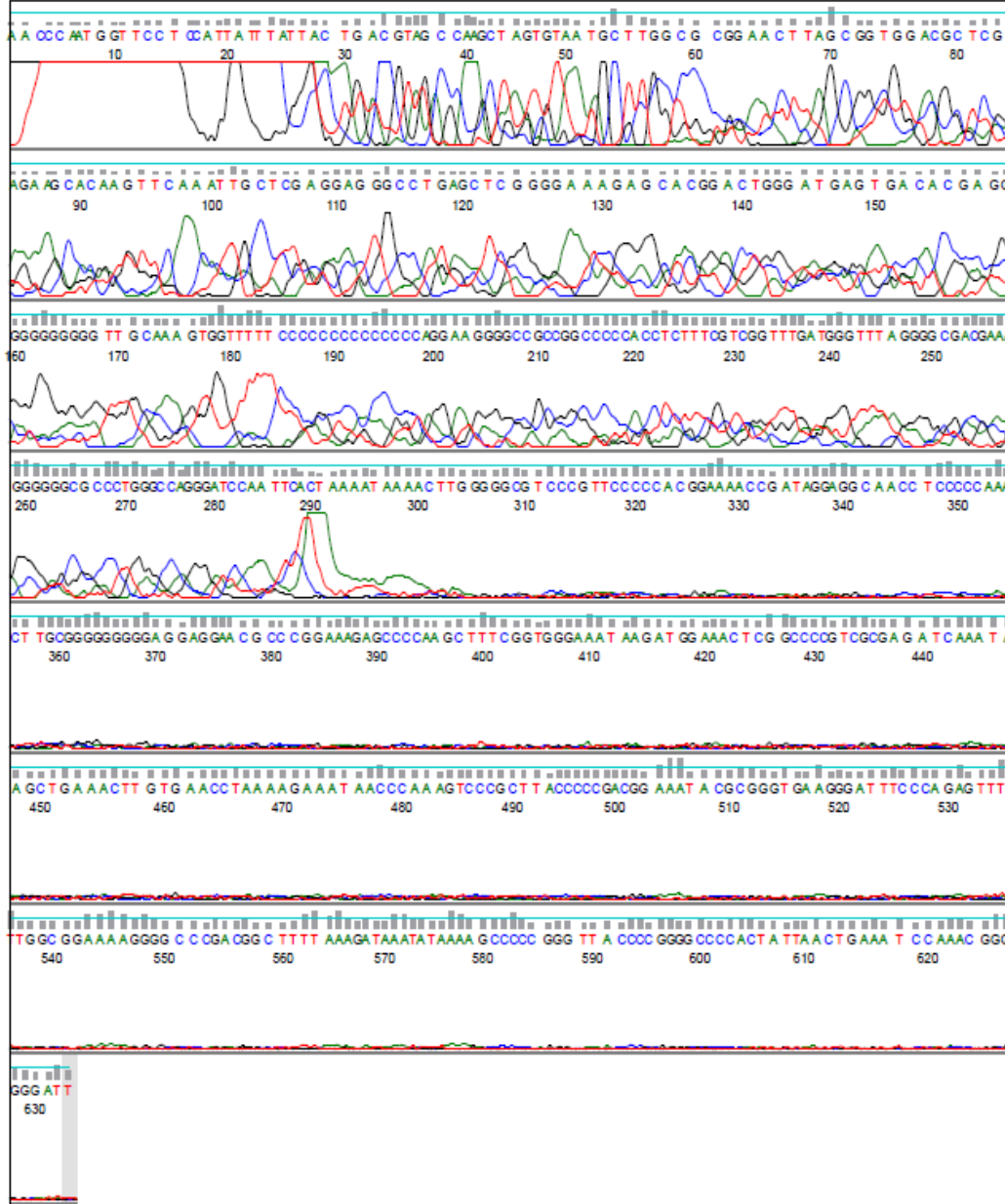
Şekil 4.110 % 1,5 (w/v) agaroz jelde gradient PCR sonuçlarının tekrar yürütülmesi. 1. kuyucuk: 100 bp DNA ladder (Invitrogen), 2. kuyucuk: 7-2, 3. kuyucuk: 9, 4. kuyucuk: 10-2, 5. kuyucuk: 10-1, 6. kuyucuk: 2, Alt jel 1. kuyucuk: markır, 2. kuyucuk: 6-1, 3. kuyucuk: 4, 4.kuyucuk: 2, 5. kuyucuk: 16S rRNA geni (1 nolu izolata ait pozitif kontrol). Pozitif kontrol haricinde örnekler 50'şer µl yüklenmiştir

4.5.10 DNA dizi analizi sonuçları

File: sequencing_2F_001_A05_sequencing.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 2F
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: -13.4036
Comment: n/a
Signal Strengths: A = 39, C = 38, G = 26, T = 24
Lane/Cap#: 1
Matrix: n/a
Direction: Native



Printed: Tem 2, 2014 5:19PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.111 CT-2'nin F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

File: sequencing_2R_003_B05_sequencing.ab1


 www.geospiza.com

Sample Name: 2R

Signal Strengths: A = 43, C = 40, G = 27, T = 27

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

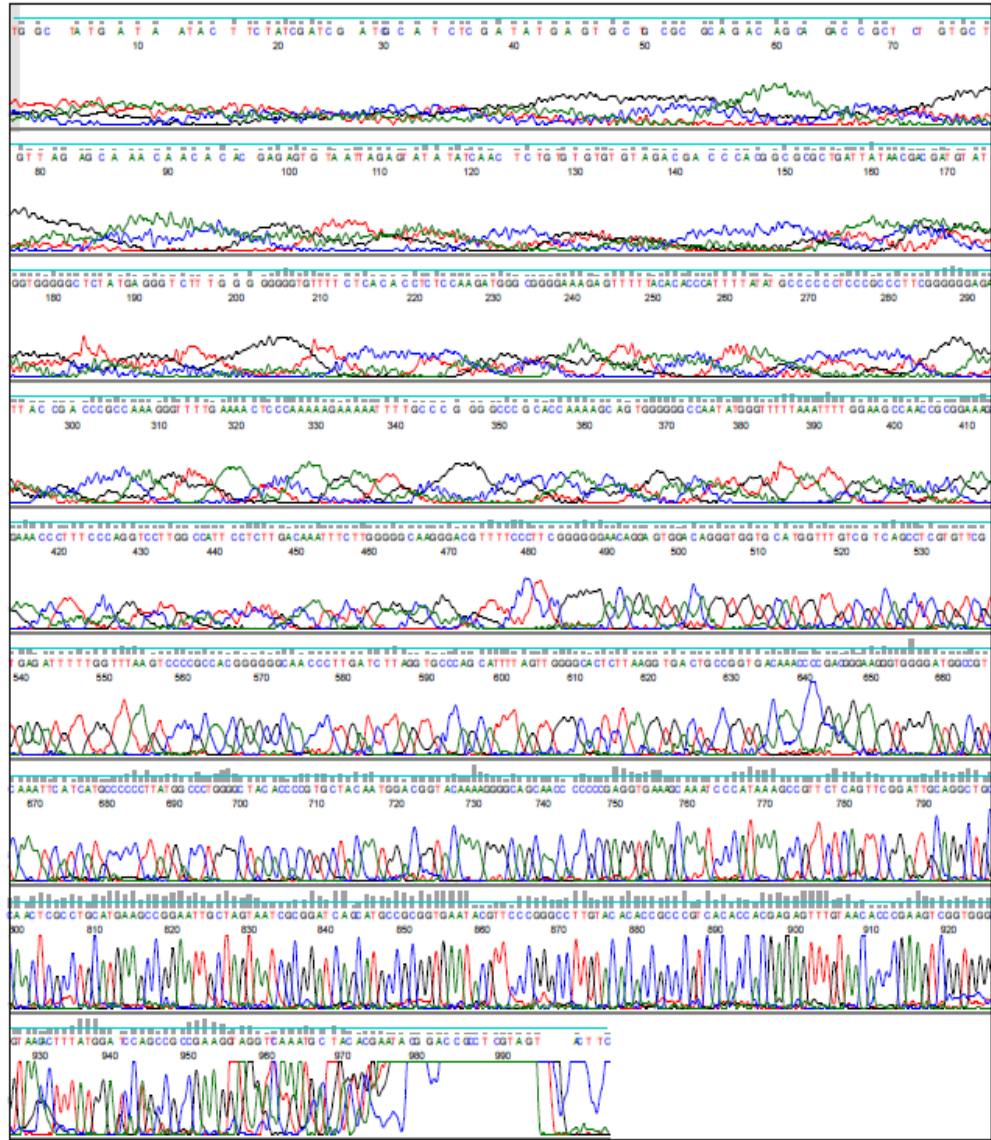
Lane/Cap#: 3

Spacing: 13.8973

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Reverse Complement



Printed: Tem 2, 2014 5:17PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.112 CT-2'nin R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

File: sequencing_3F_005_C05_sequencing.ab1


 www.geospiza.com

Sample Name: 3F

Signal Strengths: A = 255, C = 375, G = 123, T = 225

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

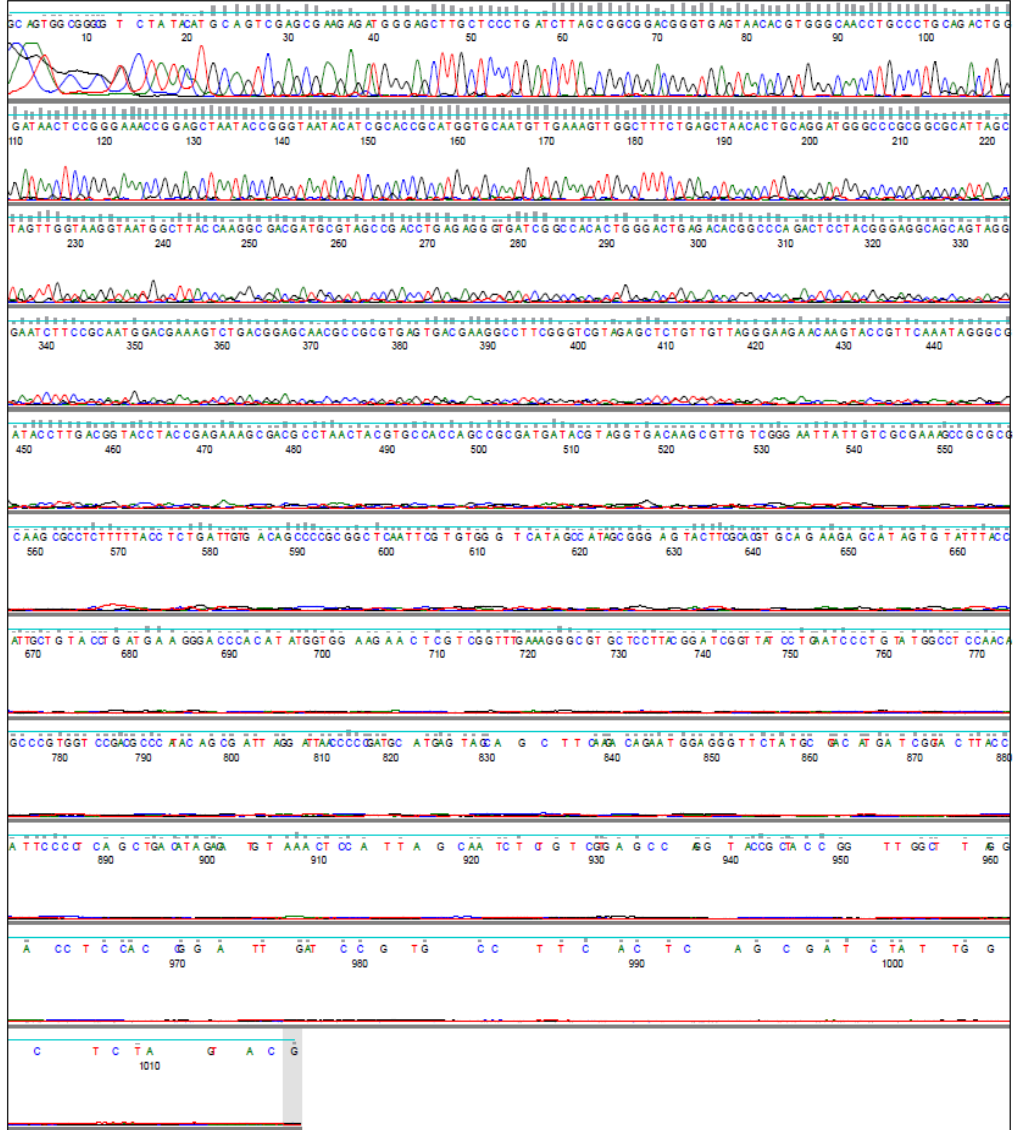
Lane/Cap#: 5

Spacing: 13.6661

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



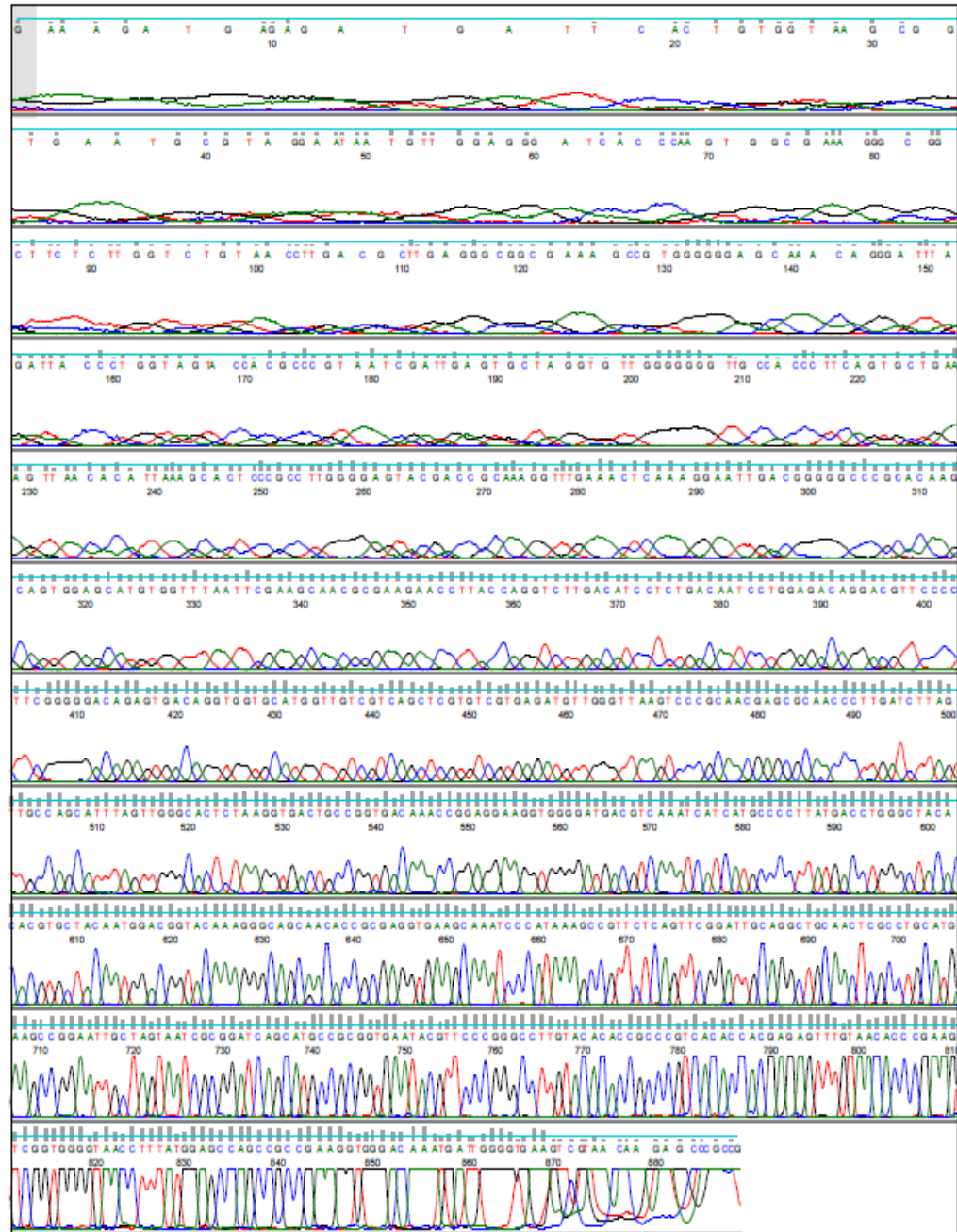
Printed: Tem 2, 2014 5:24PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.113 CT-3'nin F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

Signal Strengths: A = 154, C = 322, G = 122, T = 211
Lane/Cap#: 7
Matrix: n/a
Direction: Reverse Complement



Page 1 of 1

Şekil 4.114 CT-3'nin R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

File: sequencing_4F_009_E05_sequencing.ab1


 www.geospiza.com

Sample Name: 4F

Signal Strengths: A = 247, C = 345, G = 128, T = 257

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

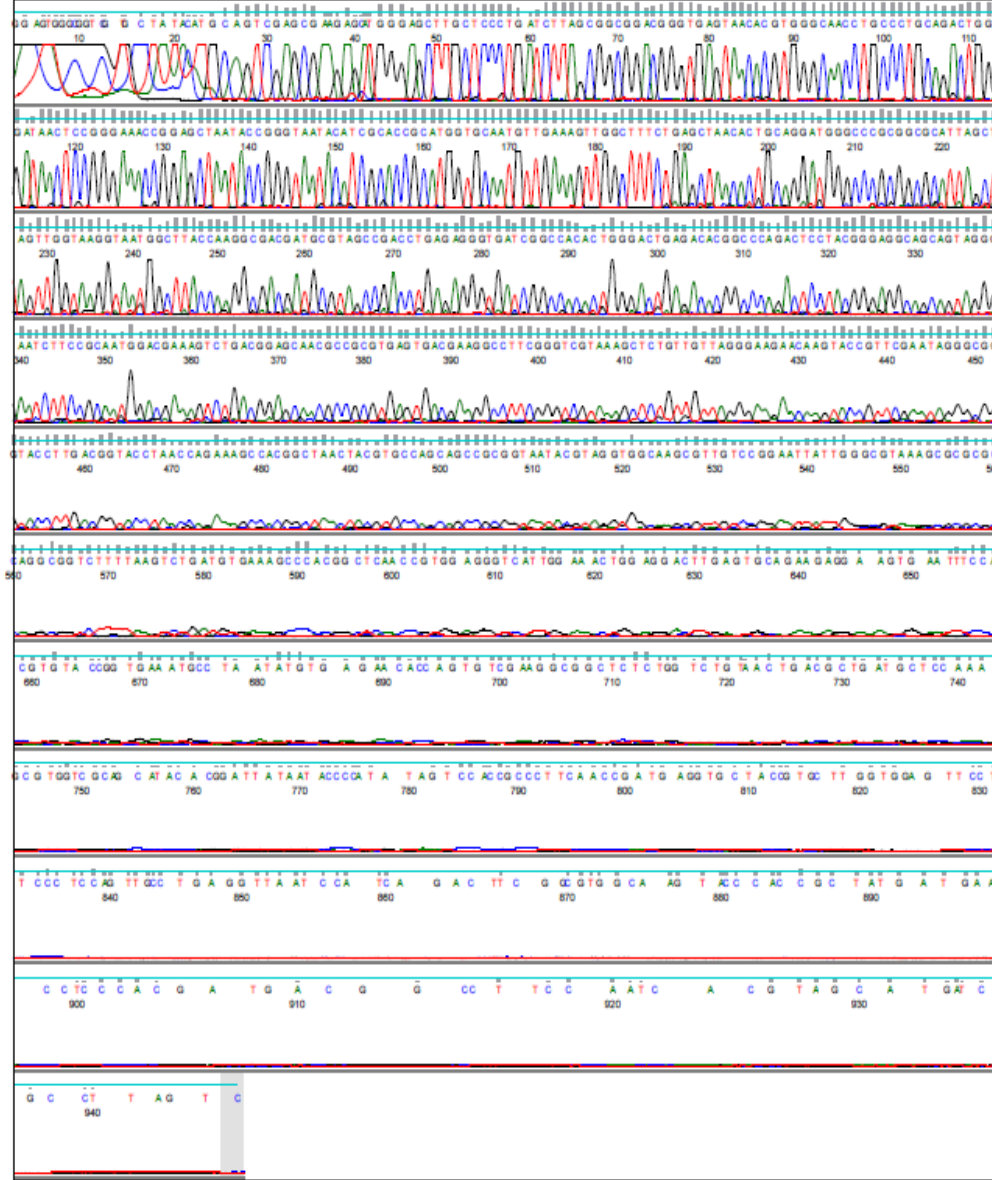
Lane/Cap#: 9

Spacing: 13.8161

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



Printed: Tem 2, 2014 5:31PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.115 CT-4'nin F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

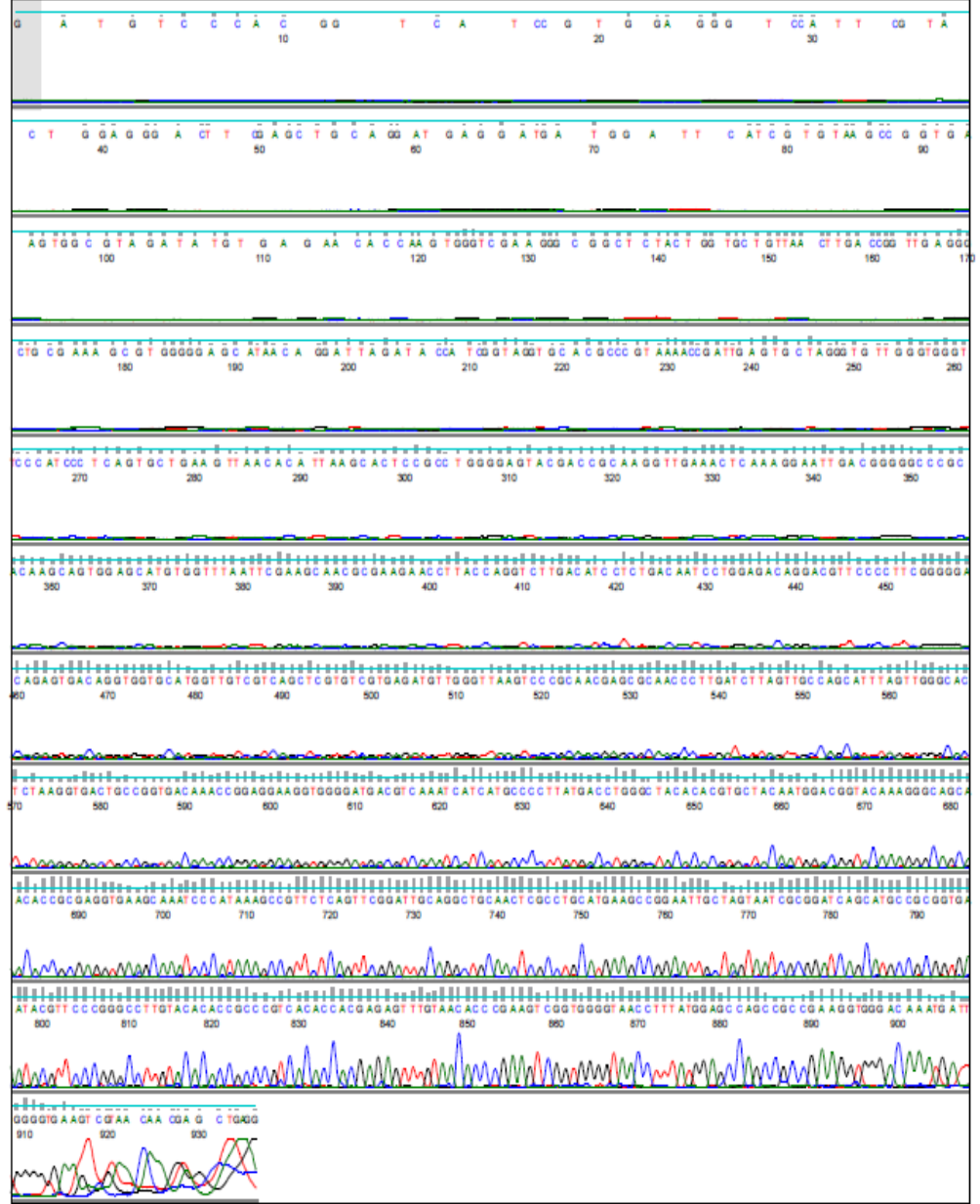
File: sequencing_4R_011_F05_sequencing.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: 4R
 Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.8703
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 210, C = 440, G = 159, T = 363
 Lane/Cap#: 11
 Matrix: n/a
 Direction: Reverse Complement



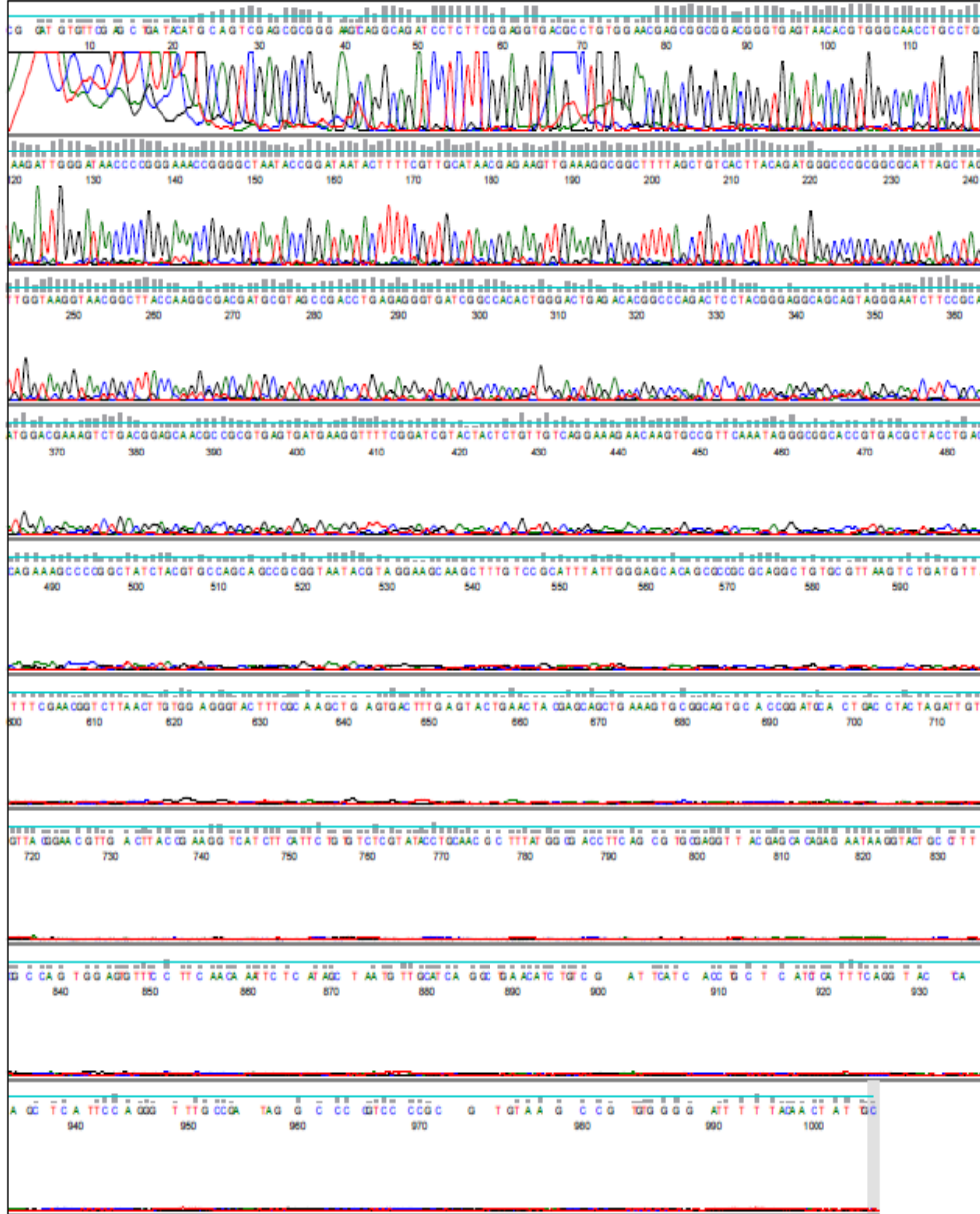
Printed: Tem 2, 2014 5:35PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.116 CT-4'nin R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

Signal Strengths: A = 52, C = 54, G = 72, T = 47
Lane/Cap#: 13
Matrix: n/a
Direction: Native



Şekil 4.117 CT-5'in F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

File: sequencing_5R_015_H05_sequencing.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: 5R

Signal Strengths: A = 149, C = 269, G = 119, T = 237

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

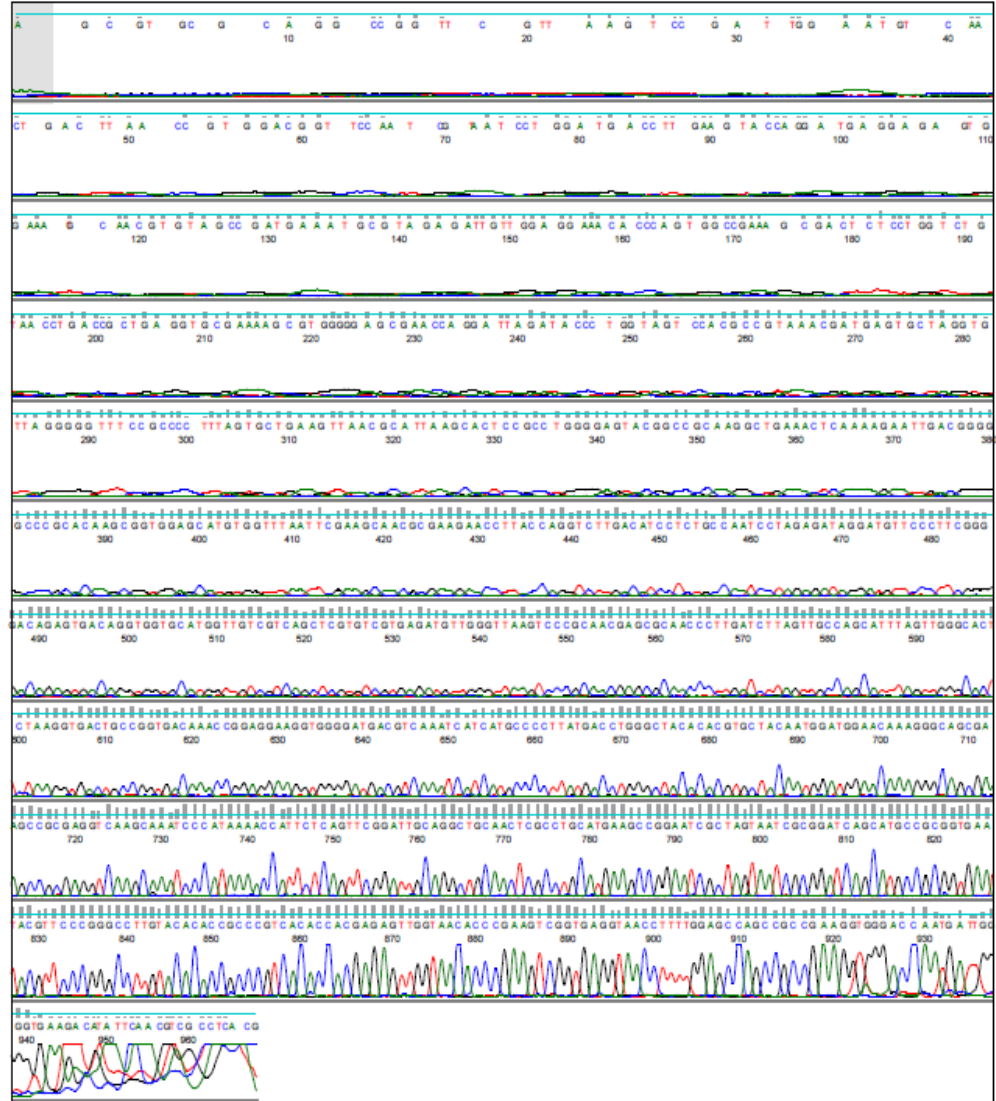
Lane/Cap#: 15

Spacing: 14.0325

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Reverse Complement



Printed: Tem 2, 2014 5:41PM

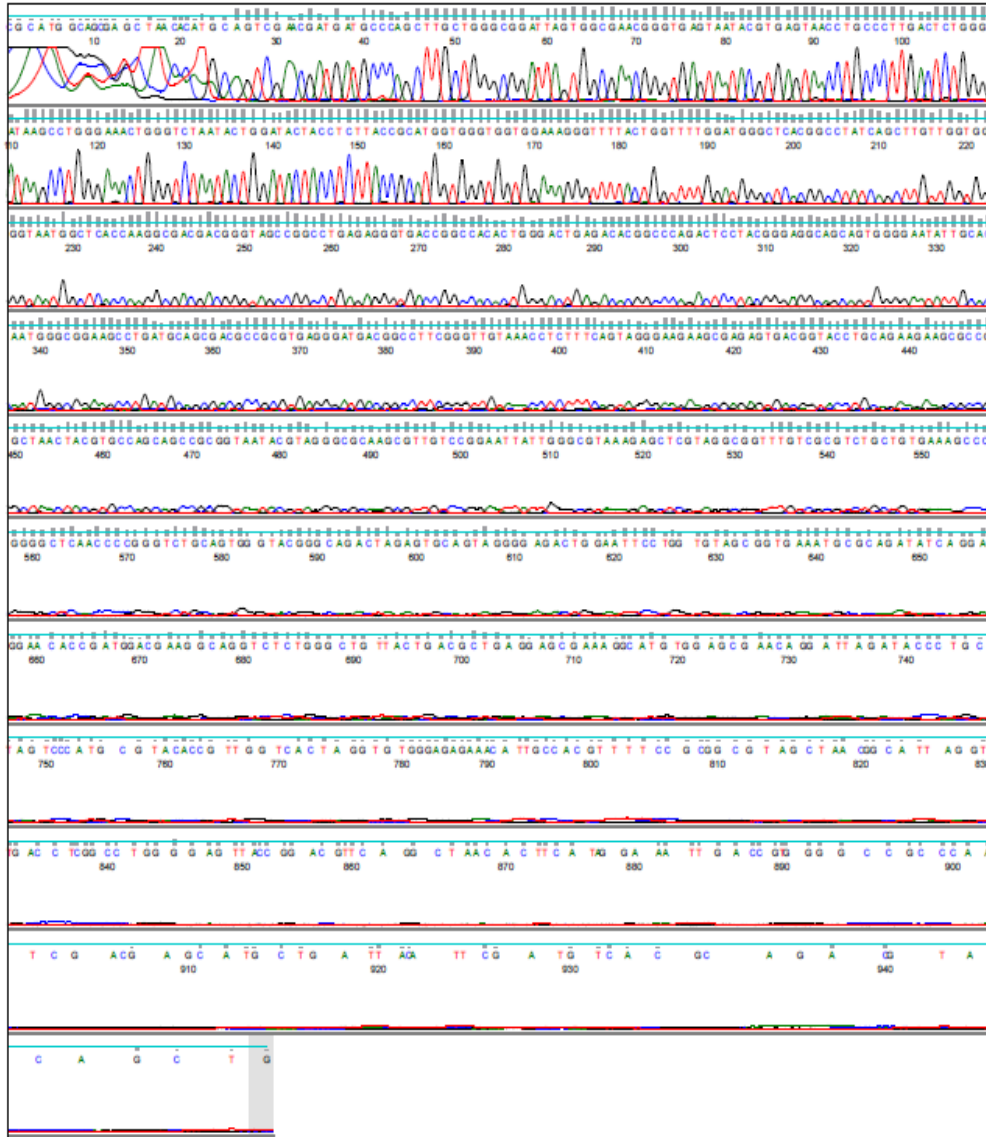
 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.118 CT-5'in R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

Sample Name: 6F
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13.817
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 189, C = 209, G = 153, T = 215
Lane/Cap#: 2
Matrix: n/a
Direction: Native



Şekil 4.119 CT-6'in R primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

File: sequencing_6R_004_B06_sequencing.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: 6R

Signal Strengths: A = 146, C = 246, G = 113, T = 189

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

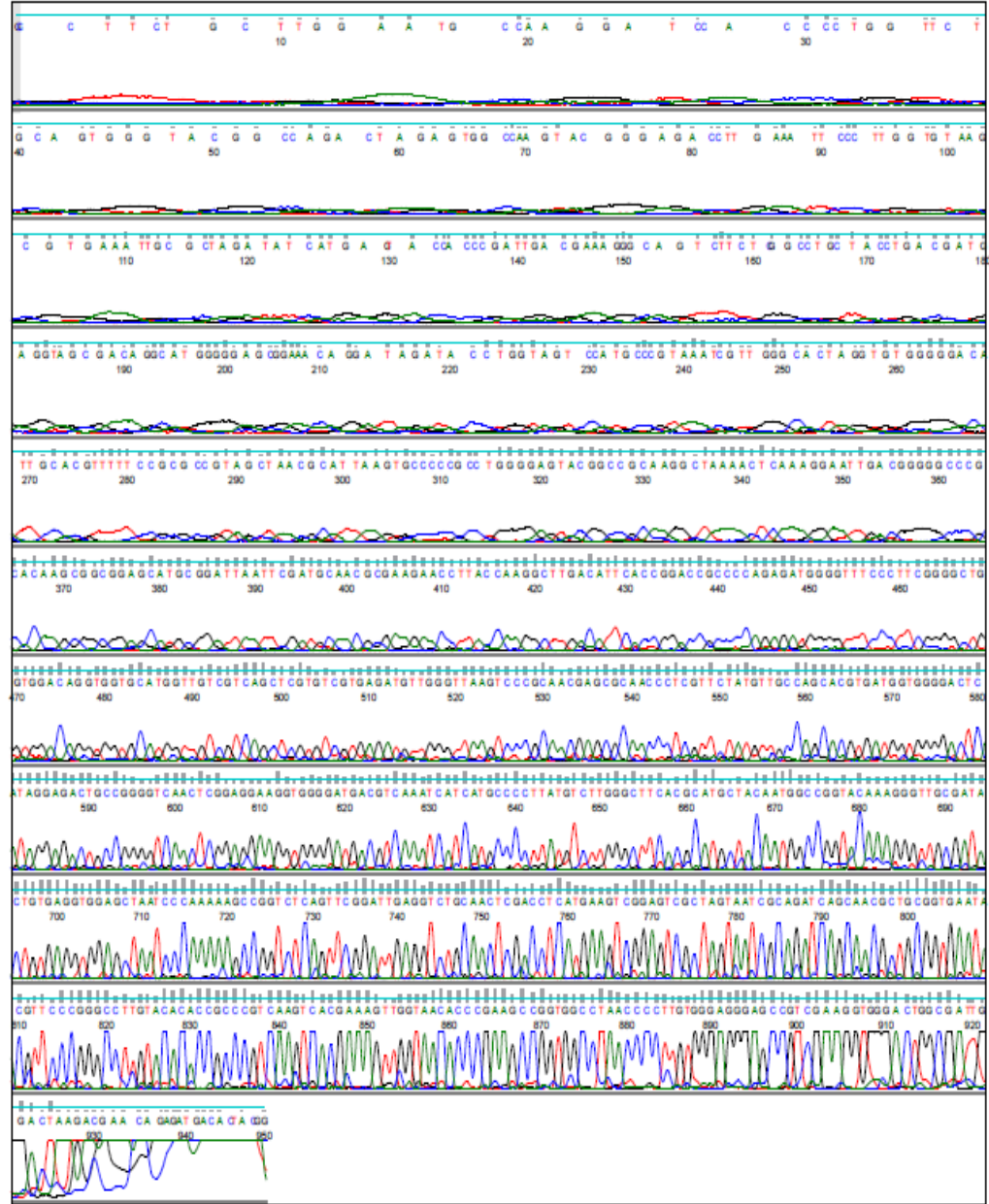
Lane/Cap#: 4

Spacing: 13.8163

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Reverse Complement



Printed: Tem 2, 2014 5:48PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.120 CT-6'in R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

File: sequencing_7F_006_C06_sequencing.ab1


 www.geospiza.com

Sample Name: 7F

Signal Strengths: A = 273, C = 326, G = 144, T = 250

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

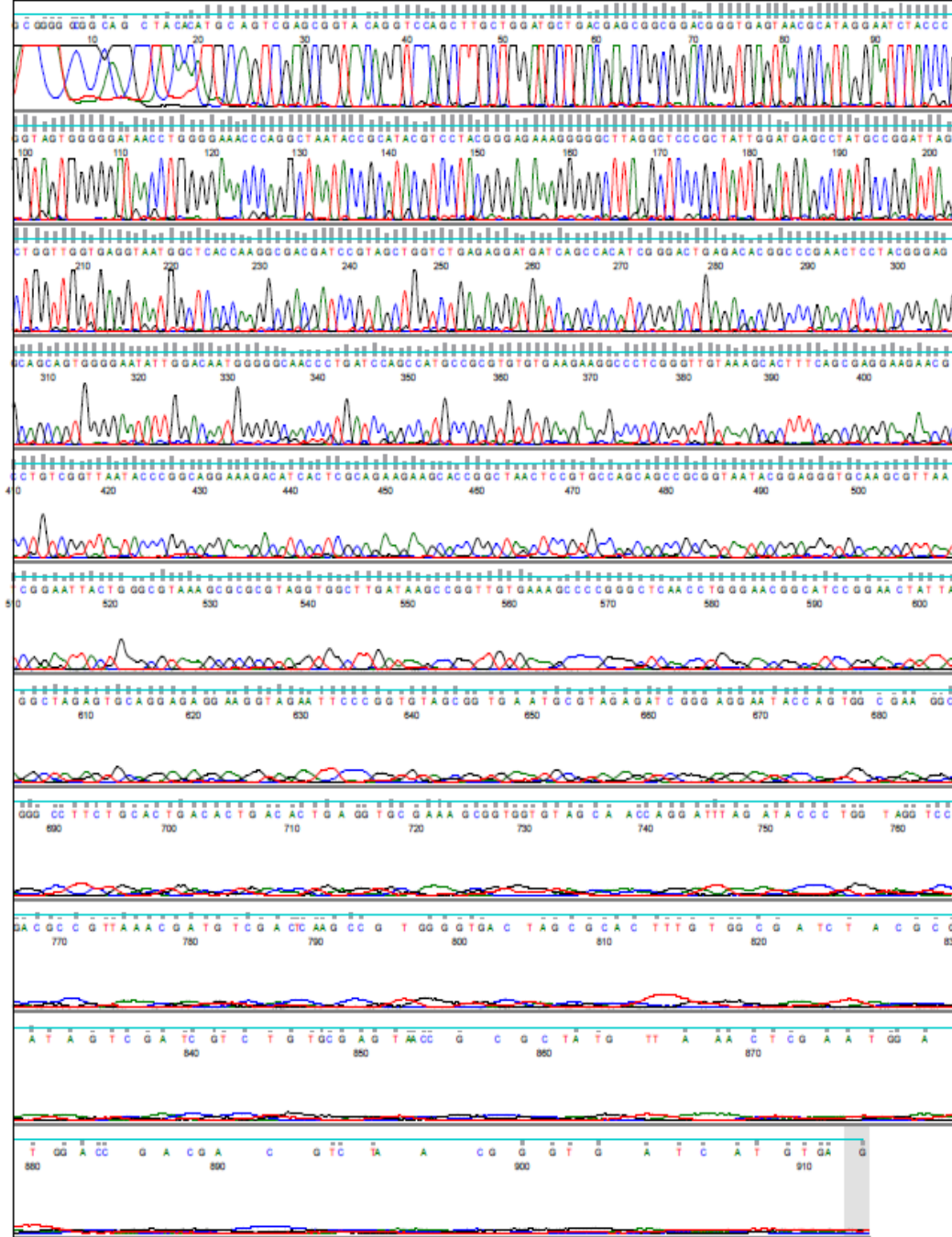
Lane/Cap#: 6

Spacing: 13.7432

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



Printed: Tem 2, 2014 5:51PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.121 CS-5'in F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

File: sequencing_7R_008_D06_sequencing.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: 7R

Signal Strengths: A = 168, C = 326, G = 115, T = 214

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

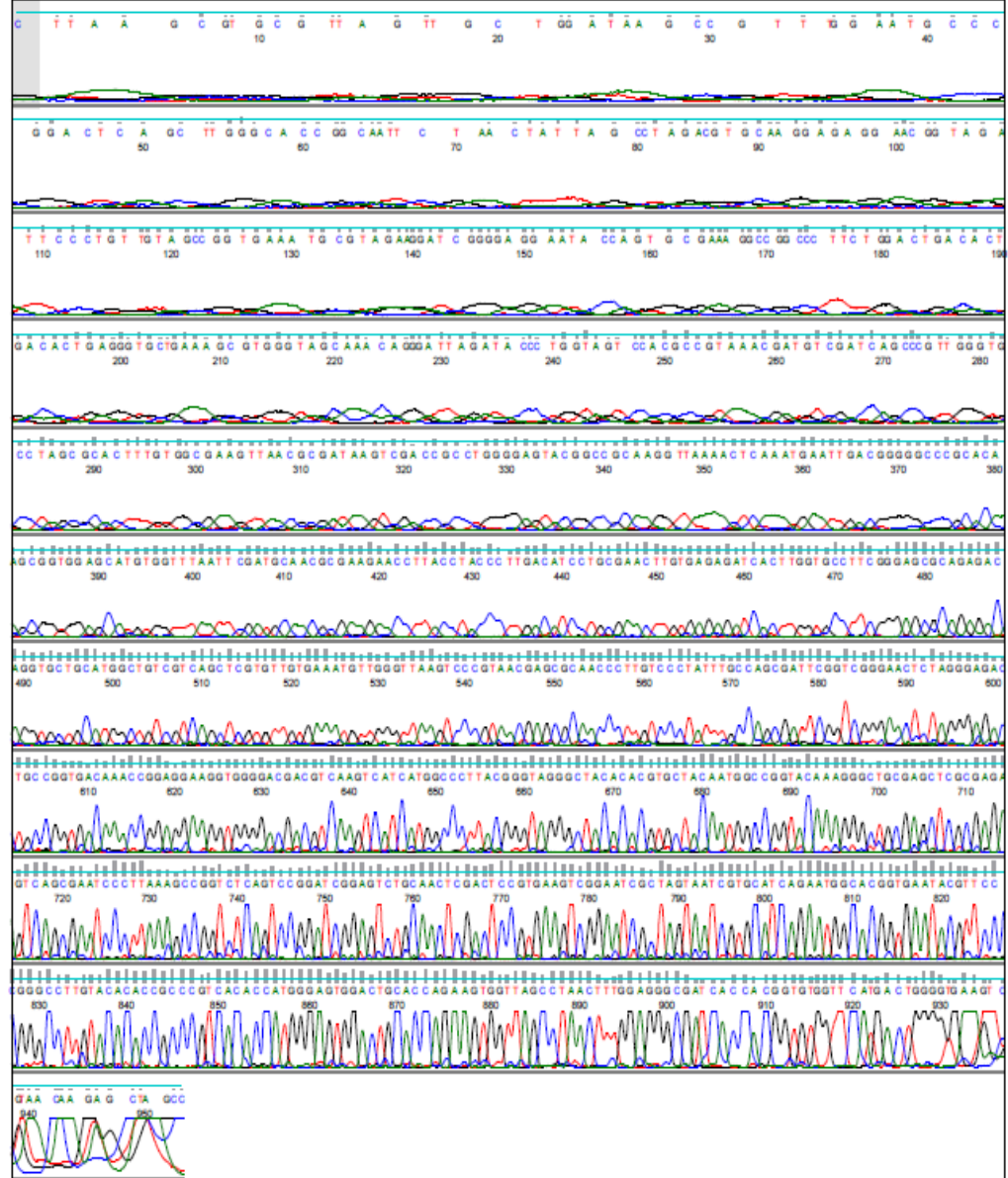
Lane/Cap#: 8

Spacing: 13.8146

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Reverse Complement



Printed: Tem 2, 2014 5:55PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.122 CS-5'in R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

File: sequencing_8R_012_F06_sequencing.abl



www.geospiza.com

Sample Name: 8R

Signal Strengths: A = 151, C = 210, G = 126, T = 147

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

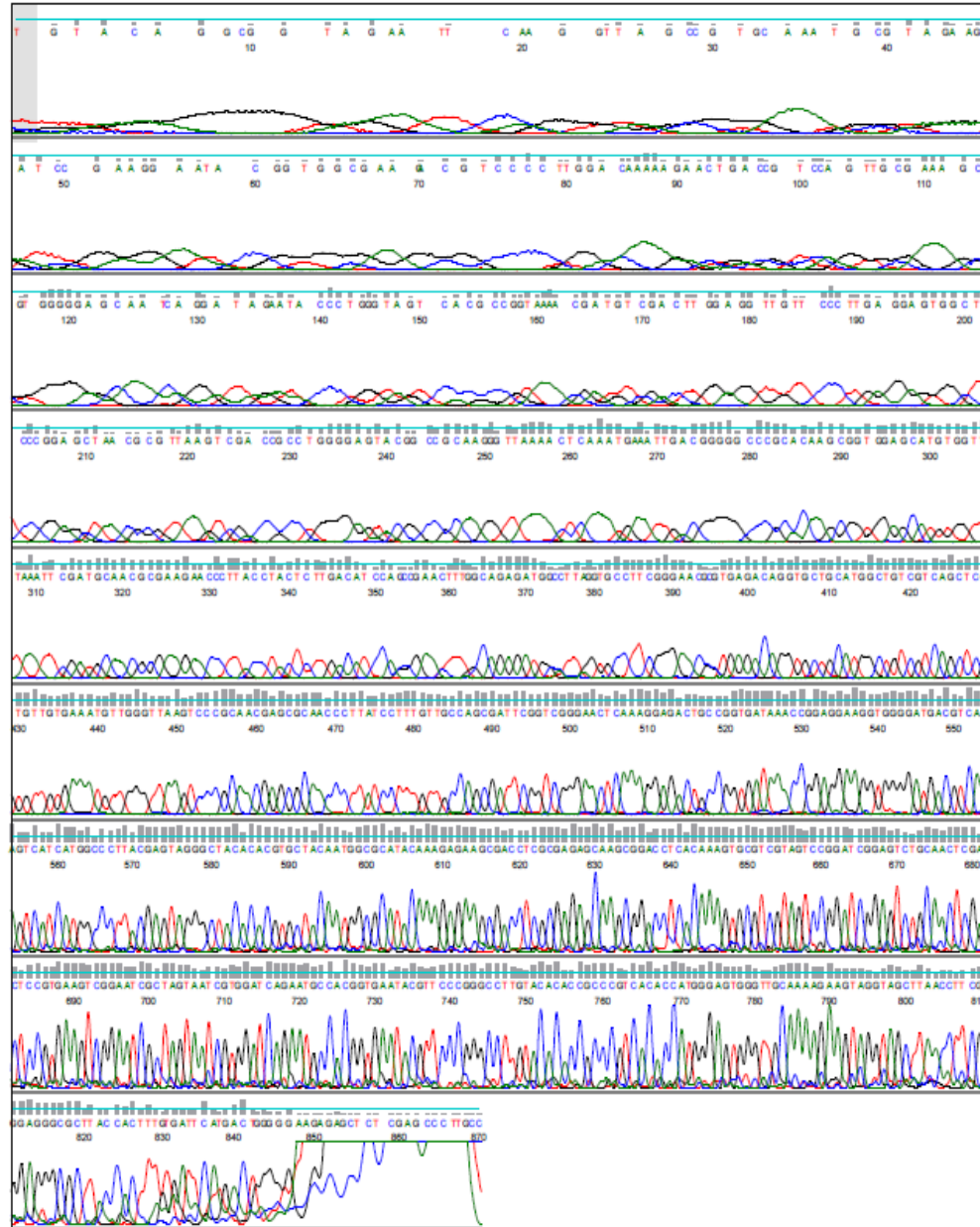
Lane/Cap#: 12

Spacing: 13.9266

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Reverse Complement



Printed: Tem 2, 2014 6:07PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.124 CS-4'ün R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

File: sequencing_9F_014_G06_sequencing.ab1


 www.geospiza.com

Sample Name: 9F

Signal Strengths: A = 480, C = 549, G = 225, T = 565

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

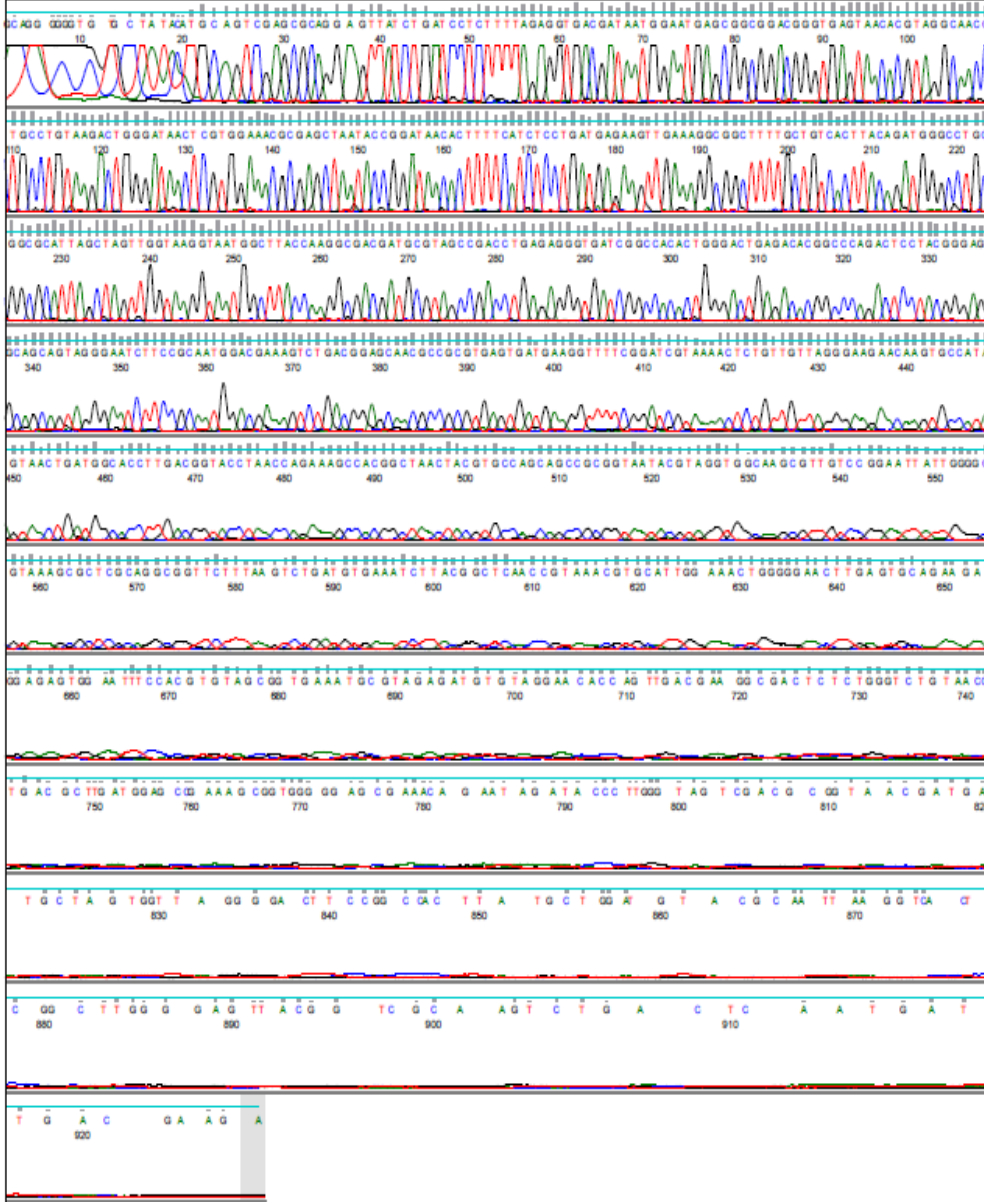
Lane/Cap#: 14

Spacing: 13.9615

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



Printed: Tem 2, 2014 6:15PM

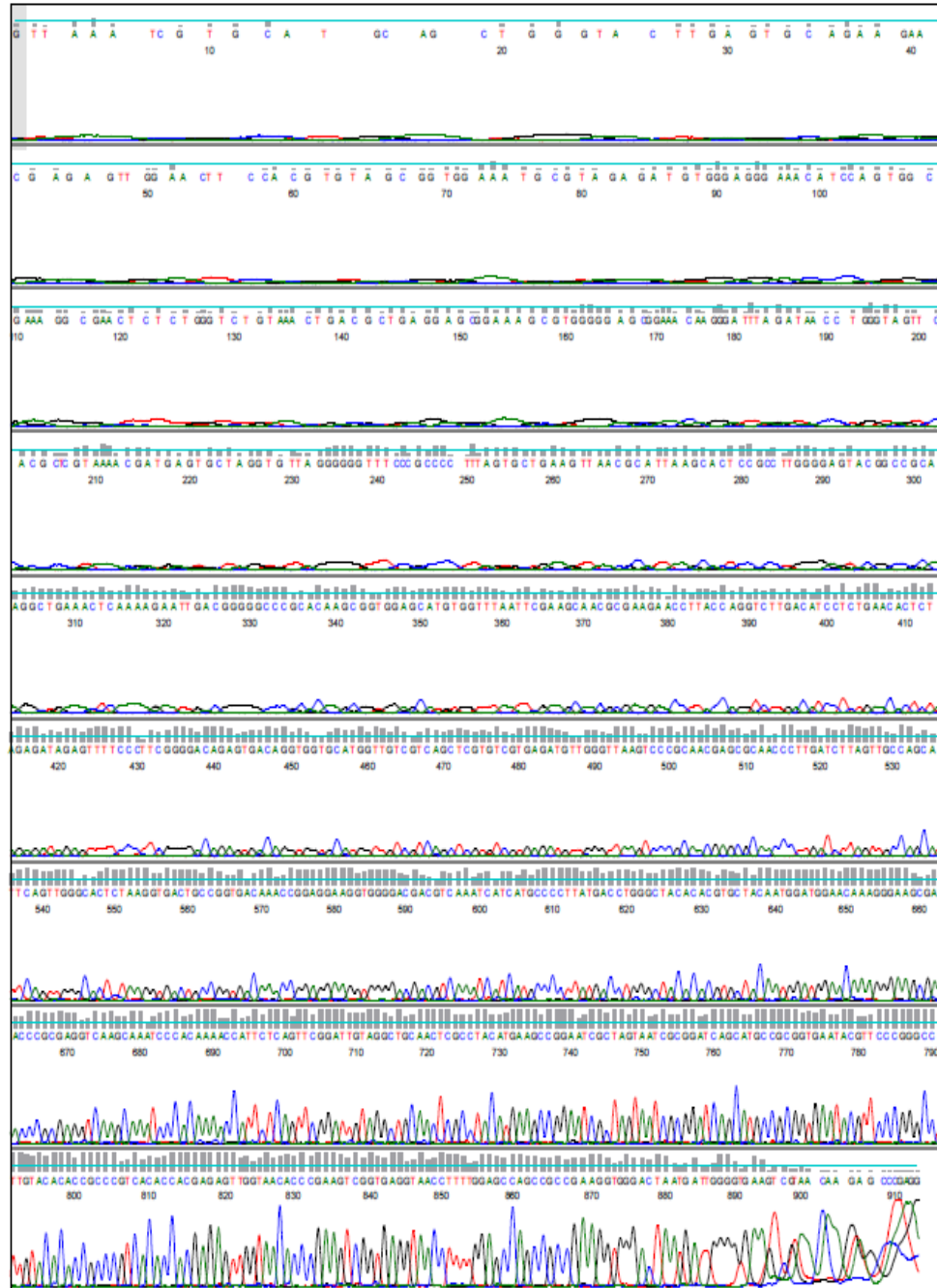
 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.125 HT-9'un F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

Sample Name: 9R
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.0616
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 293, C = 582, G = 238, T = 514
Lane/Cap#: 16
Matrix: n/a
Direction: Reverse Complement



Printed: Tem 2, 2014 6:20PM

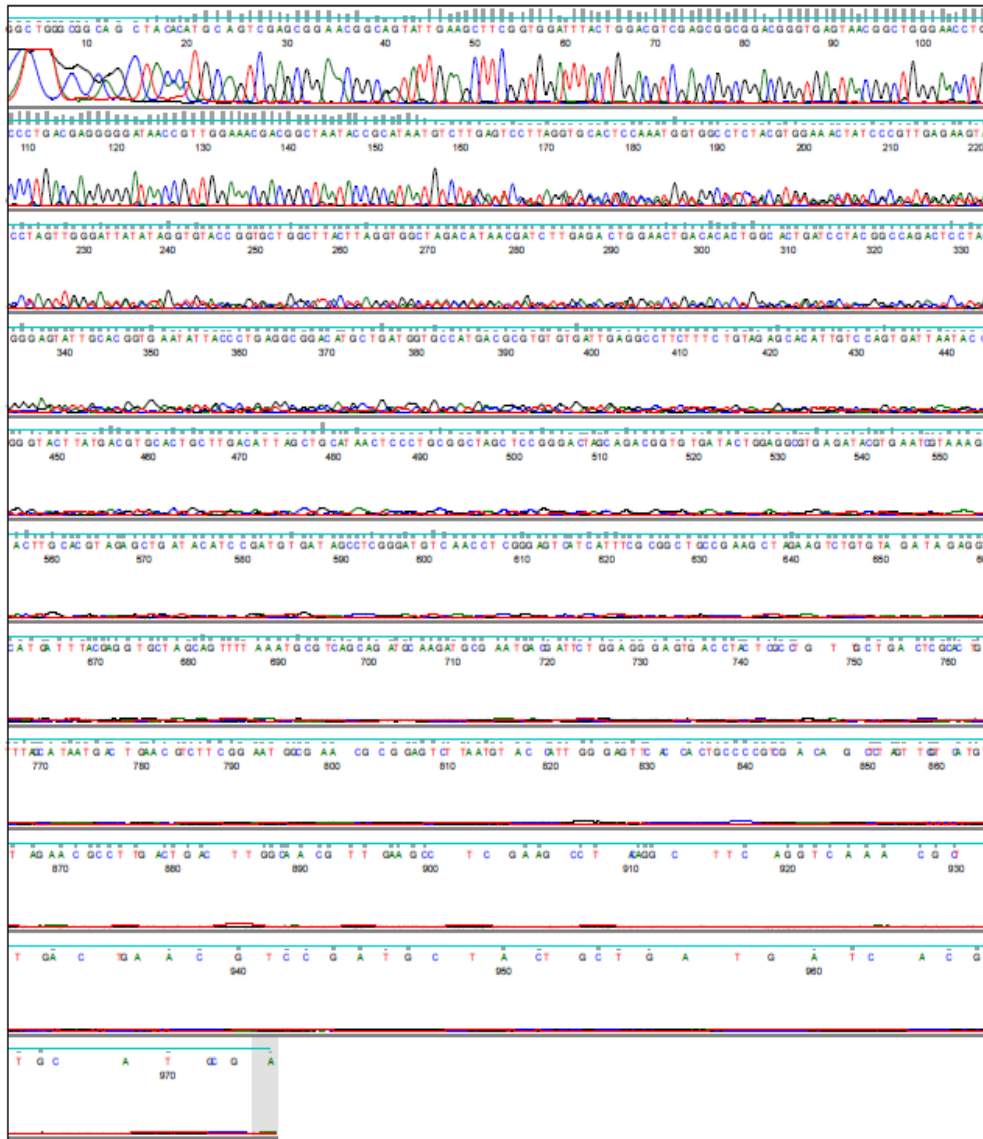
 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.126 HT-9'un R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

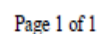
Sample Name: 11F
Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13.4319
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 200, C = 228, G = 100, T = 202
Lane/Cap#: 1
Matrix: n/a
Direction: Native



Şekil 4.127 KC-2'nin F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

Direction: Reverse Complement



Şekil 4.128 KC-2'nin R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

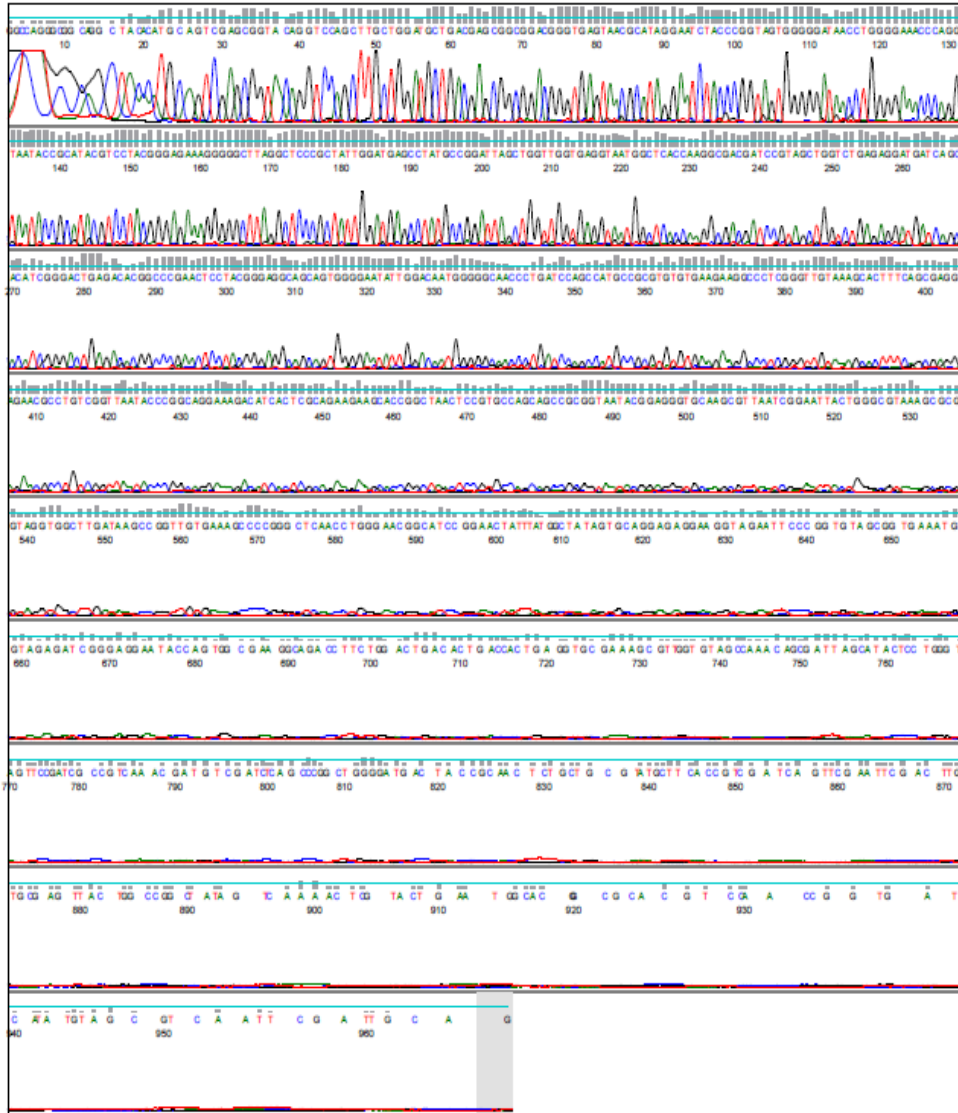
File: sequencing_13F_005_C07_sequencing.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: 13F
 Mobility: KB 3130_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 13.5372
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 244, C = 295, G = 134, T = 227
 Lane/Cap#: 5
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Printed: Tem 2, 2014 6:35PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.129 KC-101'in F primer (27F) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

File: sequencing_13R_007_D07_sequencing.ab1



www.geospiza.com

Sample Name: 13R

Signal Strengths: A = 150, C = 274, G = 120, T = 208

Mobility: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

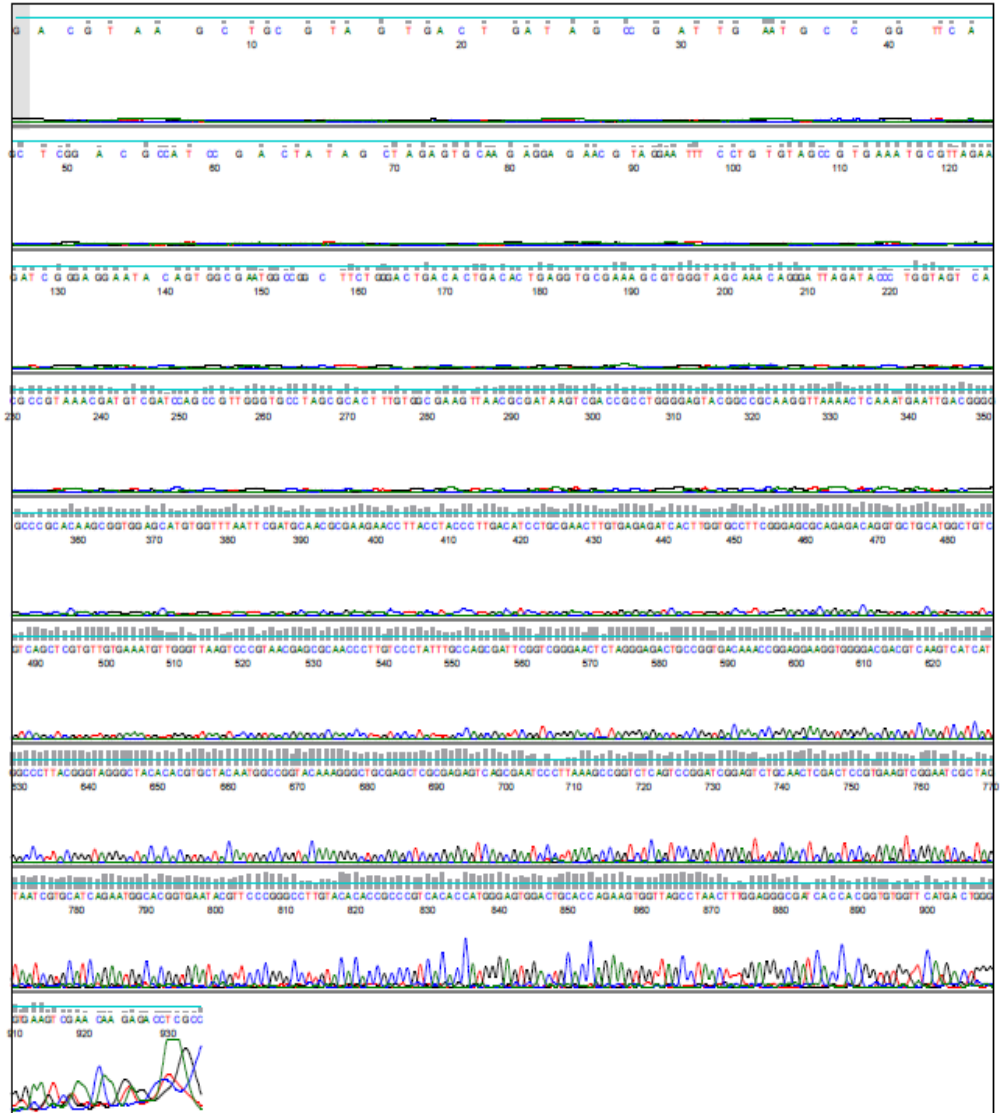
Lane/Cap#: 7

Spacing: 13.6292

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Reverse Complement



Printed: Tem 2, 2014 6:37PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

Şekil 4.130 KC-101'in R primer (1542R) ile çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürününün DNA dizi analizi kromatogramı

4.5.11. NCBI-BLAST sonuçlarına göre en yüksek benzerlik gösteren türler

Çizelge 4.11 NCBI-BLAST sonuçları

	Maksimum benzerlik	1*	2*	3*	4*	5*	6*
CT-2	<i>Bacillus</i> sp. HZ03	627	627	%54	1e-175	%89	AY690704.1
CT-3	<i>Bacillus</i> sp. MH05	2163	2163	%100	0.0	%94	AY690699.1
CT-4	<i>Bacillus</i> sp. MH05	2479	2479	%100	0.0	%98	KF146607.1
CT-5	<i>Virgibacillus</i> sp. B1-21 (<i>V. marismortui</i>)	2327	2327	%100	0.0	%95	EU435360.1
CT-6	<i>Kocuria</i> sp. ZS2-6	2593	2593	%98	0.0	%99	FJ889675.1
CS-4	Uncultured bacterium clone TFp_11	1561	1561	%100	0.0	%87	JX001308.1
CS-4	<i>Pantoea agglomerans</i> strain KB38	1561	1561	%100	0.0	%87	JF327464.1
CS-5	<i>Halomonas</i> sp. TB216 (<i>H. janggokensis</i>)	2630	2630	%99	0.0	%99	EU308361.1
HT-9	<i>Oceanobacillus kimchii</i> strain X50	2540	2540	%100	0.0	%98	NR_117544.1
KC-2	<i>Salinivibrio</i> sp. FAM 10 clone 2	1393	1393	%100	0.0	%97	JN381954.1
KC-101	<i>Halomonas</i> sp. TB216 (<i>H. janggokensis</i>)	2614	2614	%98	0.0	%99	EU308361.1

1*, Maksimum skor, 2*, Total skor, 3*, query coverage, 4*, e-value, 5*, Benzerlik, 6*, Genbankası No.

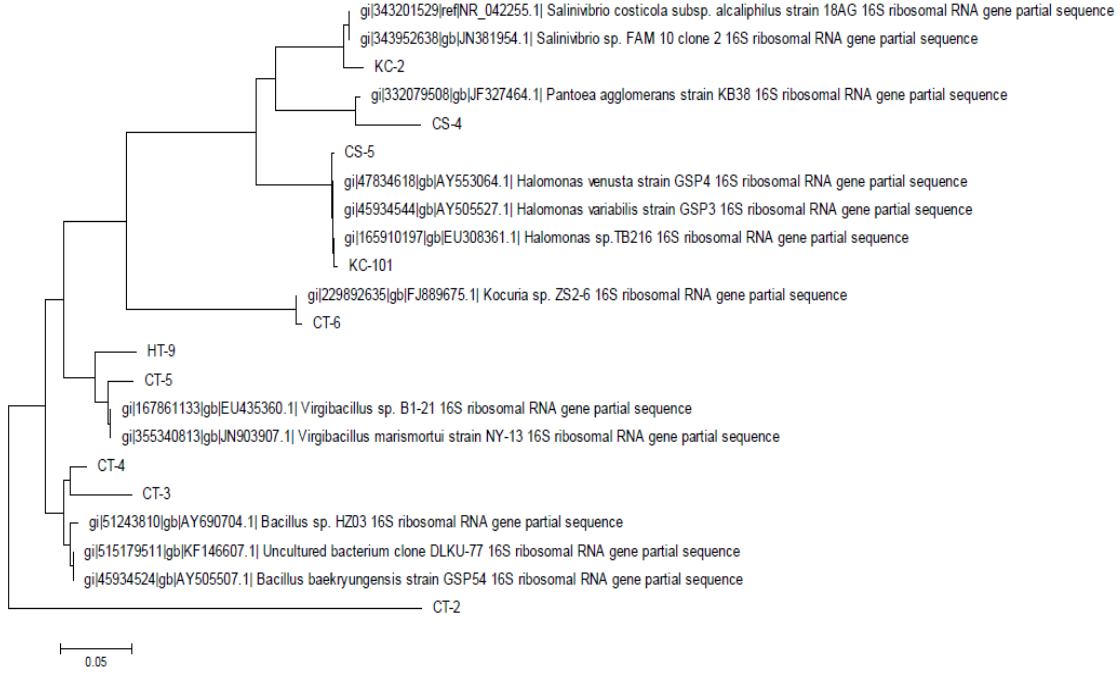
4.5.12. NCBI'dan alınan izolatlara ait 16S rRNA gen bölgesi erişim numaraları

Çizelge 4.12 NCBI'dan alınan izolatlara ait 16S rRNA gen bölgesi erişim numaraları

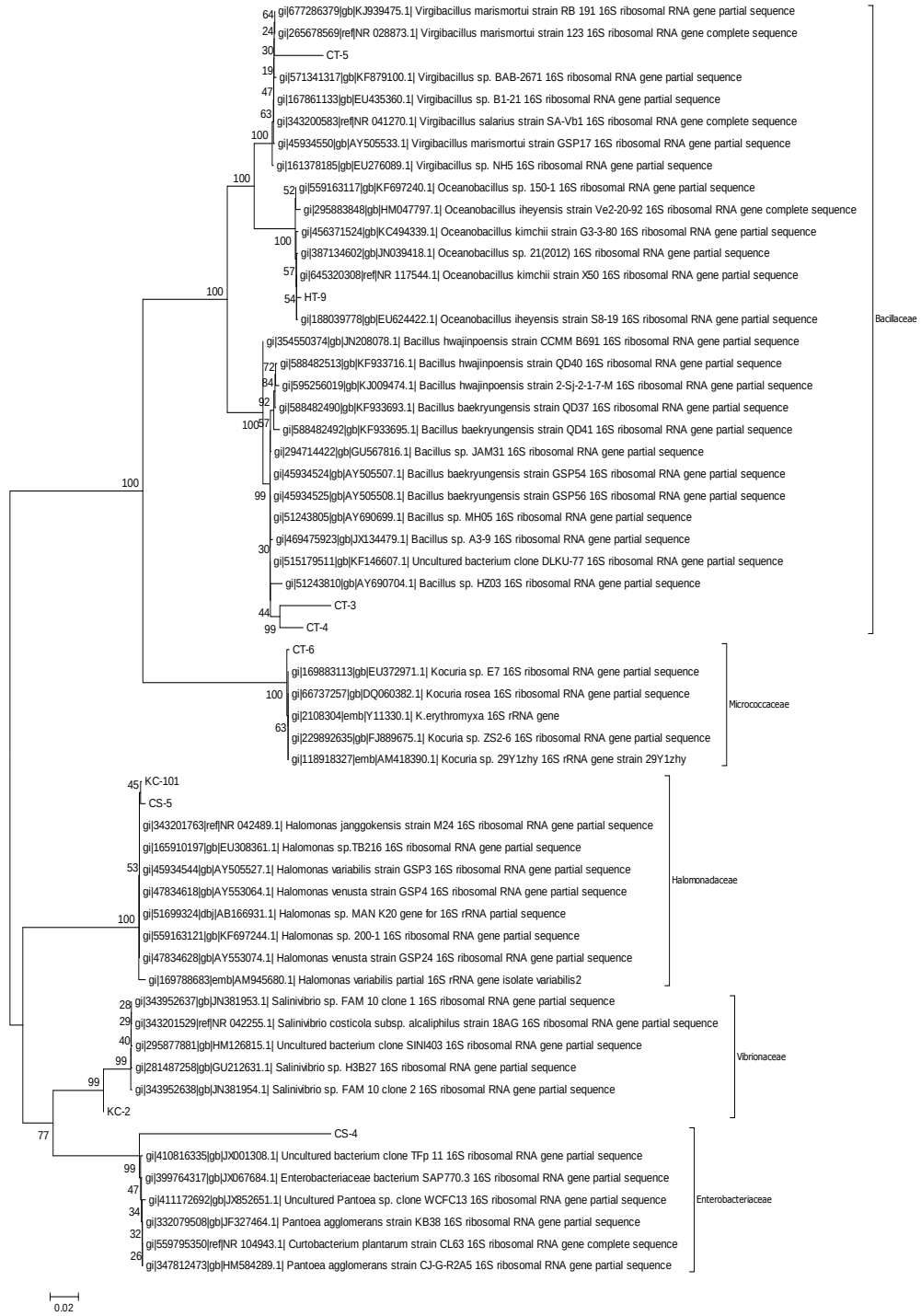
	NCBI	NCBI Erişim Numarası
CT-3	BankIt1775796 <i>Bacillus</i> sp. CT-3	KP238664
CT-4	BankIt1777449 <i>Bacillus</i> sp. CT-4	KP238665
CT-5	BankIt1777477 <i>Virgibacillus</i> sp. CT-5	KP238666
CT-6	BankIt1777478 <i>Kocuria</i> sp. CT-6	KP238667
CS-4	BankIt1777479 <i>Pantoea</i> sp. CS-4	KP238668
CS-5	BankIt1777488 <i>Halomonas</i> sp. CS-5	KP238669
HT-9	BankIt1777489 <i>Oceanobacillus</i> sp. HT-9	KP238670
KC-2	BankIt1777491 <i>Salinivibrio</i> sp. KC-2	KP238671
KC-101	BankIt1777493 <i>Halomonas</i> sp. KC-101	KP238672

Not: CT-2, CT-3 ve CT-4 ile benzer çıkması nedeniyle tekrar çalışılmamıştır.

4.5.13 Filogenetik ağaç



Şekil 4.131 Taksonlar arası evrimsel ilişki NCBI sonuçlarına göre en benzer çıkan türlerin 16S rDNA gen dizileri ile eldeki izolatların 16S rRNA gen dizileri MEGA6 (Tamura et al., 2013) programıyla analiz edilmesi sonucu çizilen filogenetik ağaç. Bu programa göre Neighbor-Joining metodu kullanılarak evrimsel geçmiş analiz edilmektedir (Saitou and Nei, 1987). Evrimsel uzaklıklar Maximum Composite Likelihood metodu kullanılarak hesaplanmıştır (Tamura et al., 2004). Optimum ağaç dal uzunluğunun toplamı 0.98023979'dur. Evrimsel uzaklığı belirlemek için aynı birimlerdeki dal uzunlukları kullanılarak ağaç skala üzerine çizilmiştir ve birim baz değişimleri birimi olarak gösterilmiştir. Analiz sırasında boşluk içeren ve kayıp tüm datalar elimine edilmiştir. Son data setinde toplam 774 pozisyon bulunmaktadır.



Şekil 4.132 Taksonlar arası filogenetik ağaç çizimi. Neighbour Joining metodu (Saitou and Nei, 1987) ile analiz sırasında bootstrap testi (1000 replikat) de yapılarak sonuçları birbiriyle ilişkili taksonların birlikte kümelenmelerini gösteren replike ağaçların yüzdesi olarak ağaçta gösterilmektedir (Felsenstein, 1985). Ağaç skala üzerine çizilmiş olup, dal uzunluğu evrimsel uzaklığı göstermektedir. Evrimsel uzaklık, Maximum Composite Likelihood metodu ile hesaplanmıştır (Tamura et al., 2004). 100 birim nükleotid başına değişim gösteren nükleotid sayısı olarak ölçeklendirilmiştir. Analizde 58 nükleotid dizisi kullanılmıştır. % 95’den az coverage gösteren bölgeler elimine edilmiştir. % 5’ten az alignment gapler, kayıp veriler, belirsiz bazlar kısmi delesyonla elimine edilmiştir. Final verisetinde toplam 1295 pozisyon vardır. MEGA6 ile analiz edilmiştir (Tamura et al., 2013).

4.5.14 Tasarlanan primerlere göre Ektoin üreticisi olduğu tespit edilen izolatlar

Çizelge 4.13 İzolatların geçici kodları, gerçek kodları, benzerlikleri ve ektoin sentaz geni bakımından değerlendirilmesi

	Kod	Benzerlik	Uzunluk	Tür adı	Ektoin* üreticileri
1	CT-2	% 89	999	<i>Bacillus</i> sp. HZ03	-
2	CT-3	% 94	1533	<i>Bacillus</i> sp. MH05	-
3	CT-4	% 98	1507	<i>Bacillus</i> sp. MH05	-
4	CT-5	% 95	1533	<i>Virgibacillus</i> sp. B1-21	-
5	CT-6	% 99	1472	<i>Kocuria</i> sp. ZS2-6	+
6	CS-4	% 87	1522	<i>Pantoea agglomerans</i> strain KB38	-
7	CS-5	% 99	1469	<i>Halomonas</i> sp.TB216	+
8	HT-9	% 98	1519	<i>Oceanobacillus kimchii</i> strain X50	+
9	KC-2R	% 97	893	<i>Salinivibrio</i> sp. FAM 10 clone 2	-
10	KC-101	% 99	1473	<i>Halomonas</i> sp.TB216	-

*Tasarlanan primerler ile ektoin üreticisi olup olmadığı genetik olarak tespit edilmiştir.

4.6 Tüm İzolatların Fenotipik ve Biyokimyasal Özelliklerine İlişkin Sonuçlar

Çizelge 4.14 İzolatlara ait bazı fenotipik ve biyokimyasal özelliklerin karşılaştırılması. 1, *Bacillus* sp. CT-2 suşu; 2, *Bacillus* sp. CT-3 suşu; 3, *Bacillus* sp. CT-4 suşu; 4, *Virgibacillus* sp. CT-5 suşu; 5, *Kocuria* sp. CT-6 suşu; 6, *Pantoea* sp. CS-4 suşu; 7, *Halomonas* sp. CS-5 suşu; 8, *Oceanobacillus* sp. HT-9 suşu; 9, *Salinivibrio* sp. KC-2 suşu; 10, *Halomonas* sp. KC-101 suşu.

Karakteristikleri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hücre şekli	Basil	Basil	Basil	Basil	Kok	Basil	Kısa basil	Uzun basil	Vibrioid	Orta u. basil
Gram reaksiyonu	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Hareketlilik	+	+	+	+	-	+	+	Y	+	+
Pigmentasyon	Turuncu	Turuncu	Turuncu	Krem	Kırmızı	Krem	Sarı	Beyaz	Krem	A.krem
Sıcaklık aralığı (°C)	4-50	4-50	4-50	20-55	4-37	4-50	4-45	4-45	4-55	4-55
pH aralığı	5-11	5-11	5-11	5-11	5-11	5-11	5-11	5-11	5-11	5-11
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Hidroliz testleri:										
Kazein	+	+	+	+-	-	-	-	+-	+	-
Nişasta	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tribütirin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tirozin	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Fenilalanin deaminasyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginin dekarboksilasyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lizin deaminasyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitin dekarboksilasyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat indirgenmesi	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
H ₂ S üretimi	-	-	-	+-	-	+	-	-	-	+
Optimum NaCl %	3,5-19	3,5-19	3,5-19	7,5-21	3,5-10	7,5-19	7,5-25	7,5-25	7,5-21	7,5-21
Tuz aralığı (%)	3-22	3-22	3-22	0-22	0-19	2,5-19	0-25	2-25	1-25	1,5-25
Asit ve gaz üretim										
Sükroz	+++	+++	+	-	+++	++	++	++G	++	+++
Sitrat	+-	+-	++	-	+-	+	+	++	+	+-
Gliserol	+++	+++	++	-	+	++	++	+++	+++	+++
Arbutin	+-	-	++	-	+G	+	+-	++G	-	-
Fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	++	+++	+++
Glukoz	+++	+++	++	-	+-	+-	+++	+++	+++	+++
Mannitol	++	++	++	++	++	+	+	+	+	++
Trehaloz	+++	+++	++	-	+	+	+	++	+++	+++
Salisin	+++	+	+	-	+++	+	+	++	+++	+++
Maltoz	+++	+++	+	-	+++	++	+++	+++	+++	+++
Laktoz	+-	+G	+	-	+	-	+	++	-	-
L-Arabinoz	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
D-Sellobiyoz	++	++G	++	-	+-	+-	+-	++	++	++
D-Riboz	++	+	+	+	+	+	+	++	+++	+++
D-Galaktoz	+	+	+	+	+	++	+	+	+	++
D-Mannoz	+ G	+G	-	+	-	+	+	++	++G	+
Bakto-inositol	+	+	+	+	+G	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	++	+	+	-	+	+	+-	-	++	+++
Melibiyoz	+-	+-	+	Y	+	+	+	++	-	Y
D-Melezitoz	++	+	+	+	+	++	++	++	+	++
D-Rafinoz	+-	+-	+-	-	+	+	+	++	+	+-

Y: test yapılmadı , G:Gaz pozitif +++: Asit pozitif ; ++: Asit negatif büyüme pozitif ; +: Büyüme zayıf, +-: Büyüme oldukça zayıf, -: Büyüme yok

5. TARTIŞMA

5.1 Örneklerin Toplanması ve Seçimi

İzmir Çamaltı Tuzlası tuz yığını ve tuzlu su örnekleri, İzmir Kuş Cenneti tuzlu su örnekleri, Konya Meke Gölü su örneği ve ticari salamura tuz örneklerinden (Cihanbeyli-Konya'dan, Denizli Acıgöl'den, İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan ve Himalaya tuz örneğinden) yapılan 3 günlük kültürasyonlar sonucunda (Şekil 4.1) CS'nin (Çamaltı Tuzlası tuzlu su örneğinden alınan örneklerin) sayımı sonucunda $2,3 \times 10^7$ kob/ml, CT'nin (Çamaltı Tuzlası tuz yığını örneği) sayımı sonucunda $3,0 \times 10^2$ kob/ml, HT'nin (Himalaya tuz örneği) sayımı sonucunda $1,8 \times 10^3$ kob/ml, CK'nın (Cihanbeyli-Konya ticari salamura tuz örneği) sayımı sonucunda 9×10^5 kob/ml elde edilmiştir (Çizelge 4.1). İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan salamura tuz örneğinde, Meke Gölü su örneğinden, Denizli Acıgöl'den üretilen salamura tuz örneklerinde büyüme görülmemiştir. Aynı örneklerden SW-25 halofilik arke besiyerine ekim yapıldığında ise halofilik arke büyümesi görülmüştür. Bu durumda bakteri büyümesinin görülmemesinin nedeni olarak örneklerin aşırı tuzlu olması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. İzolasyona alınan ve büyüme görülen tuz çeşitlerinden izole edilen kolonilerle çalışmalara devam edilmiştir.

Çevresel örneklerin yoğun karışık kültür popülasyonları nedeniyle izolat elde edip kültür saflaştırmak için Şekil 4.1'den Şekil 4.11'e kadar görüldüğü gibi çok sayıda çizgi ekimleri, tek koloniden seyreltme plaka tekniği ile saf kültür elde etme teknikleri uygulanmıştır. Her uygulama sonrasında kültür saflığı gram boyama yapılarak kontrol edilmiştir. Ardından Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te görüldüğü gibi farklı tuz konsantrasyonu denemesi yapıp sadece % 10, % 15 veya % 20 (w/v) NaCl içeren yüksek tuzda gelişebilenlerin seçilmesi yoluyla çalışmalara devam edilmiştir. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi toplam 29 izolat seçilmiş, yeniden farklı tuz konsantrasyonu denemesine tabi tutularak içlerinden yüksek tuzda yaşayabilen 10 tane izolat seçilerek Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi geri kalan testlere 10 izolat ile devam edilmiştir. Bu 10 izolatın isimleri işlemler sırasında en son olarak 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 diye numaralandırılmış ancak gerçek kodları sırasıyla CT-2, CT-3, CT-4, CT-5, CT-6, CS-4, CS-5, HT-9, KC-2,

KC-101 olarak elde edildiği kaynakların baş harfleri olmak üzere isimlendirilmiştir.

Saf kültürlerin gram boyamalarının yapıp gram reaksiyonlarının tespit edilmesinden sonra tür tanısını gerçekleştirebilmek amacıyla genomik DNA'larının ekstraksiyonu ve 16S rRNA gen bölgelerinin çalışılmıştır. Ardından daha uzun zaman alan fenotipik ve biyokimyasal testleri yapılmıştır. Şekil 4.14'ten Şekil 4.23'e kadar Gram boyama sonuçları ve koloni görünimleri verilmiştir. Buna göre üç adet gram değişken basil (CT-2, CT-3, CT-4), iki adet gram pozitif basil (CT-5, HT-9), bir adet gram pozitif kok (CT-6), üç adet gram negatif basil (CS-4, CS-5, KC-101), bir adet gram negatif virgül şekilli (KC-2) bakteriler elde edilmiştir. Besiyeri tipine göre değişen, üç adet sarımsı veya turuncumsu renkte (CT-2, CT-3, CT-4), bir adet sarımsı veya çok açık sarımsı renkte (CS-5), bir adet beyazımsı krem (CS-4), bir adet kırmızımsı yavru ağzı (CT-6), bir adet açık kremimsi (KC-2), bir adet ve özellikle yaşlı kültürde koyu kremimsi (KC-101), bir adet açık kremimsi mat (CT-5), 1 adet açık kremimsi (HT-9) renkte kolonilere sahip oldukları gözlenmiştir.

16S rRNA gen bölgesi çoğaltılması ve bu bölgelerin DNA dizi analizi sonuçlarına göre (Şekil 4.111'den Şekil 4.130'a) cins düzeyinde filogenetik tanımlamaları yapılmıştır. Çizelge 4.11 ve 4.12'de görüldüğü gibi üç adet (CT-2, CT-3, CT-4) birbirine benzer *Bacillus* sp. cinsine, bir adet (HT-9) *Oceanobacillus* sp. cinsine, bir adet (CT-5) *Virgibacillus* sp. cinsine ait olmak üzere *Firmicutes* şubesi *Bacilli* sınıfı *Bacillaceae* familyasına ait toplamda beş adet izolat elde edilmiştir. Bu beş izolatın hali hazırda yeni bir filogenetik hat olarak 2000 yılından beri öne sürülen (De Vos et al., 2009) ve içlerinde halotolerant veya halofilik *Bacillus* sp. cinslerine ait *Virgibacillus* sp. ve *Oceanobacillus* sp. türlerini içeren *Bacillus sensu lato* grubu içerisine girdiği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmada izole edilen diğer *Bacillus* sp. türleri de halofilik karakterde olduğu için bu CT-2, CT-3, CT-4 suşlarının da *Bacillus sensu lato* grubuna girmesi gerektiği düşünülmektedir. Sonuç olarak 2000 yılında öne sürülmüş olan yeni bir filogenetik hatta elde edilen türlerin dahil olabileceği düşünülmektedir. Geri kalan izolatlar ise başlangıçta hedeflendiği gibi *Proteobacteria* şubesi *Gammaproteobacteria* sınıfı *Oceanospirales* takımı *Halomonadaceae*

familyasına ait iki adet *Halomonas* sp. cinsine ait (CS-5, KC-101) çıkmıştır. Yine bir adet izolatın (KC-2) aynı şubeye ait *Vibrionales* takımından *Salinivibrio* sp. cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Bir adet izolatın (CS-4) ise yine *Gammaproteobacteria* sınıfına ait *Enterobacteriales* takımı *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir cins olan *Pantoea* sp. cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Bir adet izolatın (CT-6) ise *Actinobacteria* şubesi, *Actinobacteria* sınıfı, *Micrococcales* takımı *Kocuria* sp. cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Amaç ektoin üretebilen türler elde etmek olduğu için ve farklı suşlar elde edebilmek olduğu için farklı tuz kaynakları seçilmiş ve bu hedeflenen farklı suşlara özellikle de hedeflenen potansiyel ektoin üreticisi *Halomonas* sp. suşlarına ulaşılmıştır. Diğer ektoin üreticileri olarak ektoin gen bölgesinin varlığı *Kocuria* sp. ve *Oceanobacillus* sp. suşlarında bu çalışmada dizayn edilen ektoin spesifik primerler (Çizelge 3.2) ile tespit edilmiştir.

Filogenetik olarak 16S rRNA genlerinin DNA dizi analizi sonucunda % 99 oranında *Halomonas* sp. TB216 suşuna en yüksek benzerlik göstermelerine rağmen CS-5 ve KC-101 izolatlarının aynı *Halomonas* sp. cinslerine benzer çıkmasının ardından fenotipik olarak aynı besiyeri kompozisyonunda farklı pigmentlere sahip oldukları görülmüş ve tek başına bu iki izolatın farkı 16S rRNA gen analizlerine göre değil pigment üretimlerine göre ayırt edilebilmiştir. Bu durum da özellikle 16S rRNA gen çalışmaları sonucunda % 99 oranında benzer çıkabilen suşlar için fenotipik özelliklerin güçlü bir şekilde ayırt edici özellik oluşturması bakımından önemli olduğu düşünülmektedir.

Günümüzde DNA-DNA hibridizasyonunun halen tür tanımlamada altın standard olduğu ancak zaman alan, yüksek maliyetli ve yüksek hata oranları nedeniyle yanlış yorumlamalara açık olduğu bu nedenle de DNA-DNA hibridizasyonunun yerine tüm genom sekanslamasının yapılmasının önemli olduğu vurgulanmaktadır. Yine bu sayede Guanin + Sitozin % mol oranının da direkt belirlenebileceği bildirilmiştir (Nalbantoğlu and Sayood, 2011). Ancak bu teknolojinin oldukça yeni olması, ülkemizde yeni yaygınlaşmaya başlamasıyla nedeniyle bu çalışmada çalışılmamıştır. Yine de özellikle NCBI-BLAST taramalarına göre % 99 oranında benzer çıktığı bilinen izolatların ve diğer tip türlerin karşılaştırılmasında ayırt edici özelliğe sahip fenotipik ve biyokimyasal

testlerin kullanılması ile türlerin farklı olup olmadığını belirlemede önemli olduğu bir kez daha ortaya konmaktadır.

5.2 Biyokimyasal Testlerin Değerlendirilmesi

Tüm izolatların katalaz enzimi pozitif iken (Şekil 4.25) oksidaz enzimi (Şekil 4.24) sadece KC-2 izolatında pozitif çıkmıştır. Nitrat indirgenmesi testi sonuçlarına göre (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28) Durham tüpünde gaz oluşumu yani denitrifikasyon hiç bir izolatta gözlenmezken, nitratın nitrite indirgenmesi CS-5 ve HT-9 izolatları haricinde geri kalan izolatlarda gözlenmiştir. Nitrat indirgenmesi testi sonucuna göre yine CS-5 ve KC-101 izolatlarının birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Çünkü CS-5 nitrat indirgenmesi gerçekleştiremezken, KC-101 nitratı nitrite indirgeyebilmektedir.

Proteaz enzim görüntülenmesi neticesinde CT-2, CT-3, CT-4 izolatlarının zon çaplarına bakıldığında diğer izolatlara nazaran daha iyi proteaz enzimini ürettikleri ve birbirine benzer oldukları görülmektedir. CT-5 ve HT-9'da proteaz çok az da olsa gözlenmiştir. KC-2'nin ise CT-5 ve HT-9'a göre daha fazla oranda enzim üretebildiği zon çaplarının karşılaştırılmasıyla gözlenmiştir (Şekil 4.29).

Triple sugar iron agar besiyerinde yatık büyütülen izolatlardan H₂S üretimi (Şekil 4.42, Şekil 4.43) CT-5 izolatında var yok arası gözlenmişken, CS-4 ve KC-101 izolatlarının H₂S üreticisi oldukları görülmüştür. Diğer izolatların ise H₂S üreticisi olmadıkları tespit edilmiştir. H₂S üretimi de CS-5 ve KC-101 için birbirinden ayırıcı bir biyokimyasal test olduğu saptanmıştır. CS-5 izolatı H₂S üretmezken KC-101'in H₂S üretebildiği saptanmıştır.

Lizin dekarboksilasyon testinde (Şekil 4.38) tüm izolatlarda besiyerinde renk değişiminin önce sarı sonra tekrar mor renge dönüşmemesi sebebiyle negatif olduğu gözlenmiştir. Ornitin dekarboksilasyon (Şekil 4.40) ve arginin dihidrolaz (Şekil 4.39) testinde glukozdan asit oluşumu gözlenmiş ama deaminasyon gözlenmediği için negatif olduğu görülmüştür. Fenilalanin deaminasyonu (Şekil 4.41) 1 N HCl damlatıldığında yeşil renk oluşturmaması ve renk değişimi olmaması sebebiyle tüm izolatlarda negatif olduğu görülmüştür. Lipaz testi (Şekil

4.37) tüm izolatlar için negatif çıkmıştır. Tirozin hidrolizi (Şekil 4.101) gözlenmemiş ancak CS-4'te tirozinden pigment oluşumu gözlenmiştir.

DNAz testinde (Şekil 4.35, Şekil 4.36) 24 saat sonucunda yapılan ilk denemede zon oluşumu gözlenmemiş, bunun üzerine tekrar yapılan üç paralel ekimde hem metil yeşili içeren hem de içermeyen DNAz test ortamlarında hem 1 N HCl damlatılarak hem % 0,05 (w/v) toluidin mavisi damlatılarak hem de besiyerinin içine metil yeşili katılarak koloni etrafında zon oluşumu gözlemlenmiş, bu üç farklı yöntemde 72 saatlik inkübasyon sonucu ve ardından paralel petrilere ek olarak 48 saat buzdolabında bekletilmesi ile yeniden teste tabi tutulmalarıyla sonuçları kaydedildiğinde bu yöntemler içinde en etkili olanın 1 N HCl damlatılarak zon oluşumunun gözlenmesi olduğu sonucuna varılmıştır ayrıca ilk denememizde metil yeşilinin büyüme üzerine inhibe edici etkisi olduğundan bu çalışmada daha düşük konsantrasyonu (% 0,005 (w/v)) kullanılmış ve sadece boyanın CT-6 izolatı üzerine sınırlayıcı etkisi olduğu gözlemlenmiştir. İzolatların buzdolabında bekletilmelerinin DNAz aktiviteleri üzerine olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir. Bu da bu enzimlerin soğukta aktif DNAz olabileceğini işaret etmektedir.

Nişasta hidrolizi (Şekil 4.30'dan Şekil 4.34'e) görüntülenmesi neticesinde CT-6 izolatının diğerlerine göre daha iyi derecede amilaz enzimi ürettiği diğerlerinin de ona göre daha az oranda amilaz ürettikleri CT-5'in ise bu şartlar altında en az oranda amilaz enzimi ürettiği zon çaplarına göre tespit edilmiştir.

Tek karbon kaynaklarından asit ve gaz oluşum testleri (Şekil 4.44'ten 4.56'ya) açısından 5 günlük sonuçları değerlendirdiğimizde sırasıyla CT-2 izolatının; sükrozdan, glikozdan, trehalozdan, maltozdan, gliserolden, salisinden sadece asit oluşturduğu gözlenmiştir. Ribozdan, selleobiyozdan, sorbitolden, melezitozdan, mannitolden asit oluşturamadığı ama büyüebildiği gözlenmiştir. Ayrıca mannozda asit oluşturmazken gaz oluşumu gözlenmiştir. Fruktoz, L-arabinoz, D-galaktoz, bakto-inositolde zayıf gelişme gözlenmiştir. Sitrat, laktoz, arbutin, melibiyoz, rafinozda ise oldukça zayıf gelişme gözlenmiştir.

CT-3 izolatının; sükrozdan, glikozdan, trehalozdan, maltozdan, gliserolden sadece asit oluşturduğu gözlenmiştir. Mannitolde asit oluşturamadığı ama büyüebildiği gözlenmiştir. Ayrıca laktozda, sellobiyozda, mannozda asit oluşturmazken gaz oluşumu gözlenmiştir. Fruktozda, L-arabinozda, salisinde, D-galaktozda, bakto-inositolde, melezitozda, ribozda, sorbitolde zayıf gelişme gözlenmiştir. Sitratta, melibiyozda ve rafinozda ise oldukça zayıf gelişme gözlenmiştir. Arbutinde gelişme gözlenmemiştir.

CT-3 izolatının CT-2 izolatından farkları arbutinde büyüememesi, salisinde asit oluşturamaması ve daha zayıf gelişmesi, laktozda ve sellobiyozda büyümenin yanında gaz oluşturma, ribozda, melezitozda ve sorbitolde daha zayıf gelişmesidir.

CT-4 izolatının CT-2 ve CT-3 izolatlarından farkı; sükrozdan asit oluşturamaması ve gelişiminin zayıf olması, sitratta gelişiminin diğerlerine göre iyi olması, gliserolde asit oluşturamaması, arbutinde daha iyi gelişmesi, glukoz, mannitol, trehaloz, sellobiyozda daha az gelişmesi, sadece arbutinde iyi asit oluşturduğu sükroz ve mannitolde ise büyüebildiği gözlenmiştir. Glukoz ve sükroz ile trehaloz ve maltozda gelişim durumları CT-2 ve CT-3 izolatlarıyla karşılaştırıldığında oldukça farklıdır. Bu durum bize karbon kaynakları testinin birbiriyle aynı pigmente sahip olan izolatların ayırımında kullanılabileceğini göstermektedir.

CT-5 izolatının sadece mannitolde iyi büyüebildiği ama asit oluşturmadığı görülmüştür. Fruktozda, L-arabinozda, D-ribozda, D-galaktozda, D-mannozda, bakto-inositolde, D-melezitozda zayıf geliştiği gözlenmiştir. Diğerlerinde ise gelişim gözlenmemiştir. CT-5 izolatı için melibiyoz testi ise yapılamamıştır.

CT-6 izolatının sükrozda, maltozda ve salisinde çok iyi asit oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca farklı olarak arbutinde ve bakto-inositolde asit oluşumu gözlenmezken gaz oluşumu gözlenmiştir. Mannitolde sadece iyi büyüme gözlenmiştir. Rafinozda, D-melezitozda, melibiyozda, sorbitolde, D-galaktozda, ribozda, L-arabinozda, laktozda, trehalozda, fruktozda, gliserolde zayıf gelişme

gözlenmiştir. Glukozda, sitratta, sellobiyozda oldukça zayıf gelişme gözlenmiştir. Mannozda gelişme gözlenmemiştir.

CS-4 izolatının sükrozda, gliserolde, maltozda, L-arabinozda, galaktozda, melezitozda büyüme iyi görülmüştür ancak asit ve gaz oluşumu gözlenmemiştir. Sitratta, arbutinde, fruktozda, mannitolde, trehalozda, salisinde, ribozda, mannozda, bakto-inositolde, sorbitolde, melibiyozda, rafinozda zayıf gelişme görülmüştür. Glukozda ve sellobiyozda ise oldukça zayıf gelişme gözlenmiştir. Laktozda gelişme gözlenmemiştir.

CS-5 izolatının glukozda ve maltozda asit oluşumu pozitif, gliserolde, sükrozda, L-arabinozda, D-melezitozda büyüme iyi asit ve gaz oluşumu gözlenmezken sitratta, fruktozda, mannitolde, trehalozda, salisinde, laktozda, ribozda, galaktozda, mannozda, bakto-inositolde, melibiyozda, rafinozda gelişme zayıftır. Arbutin, sellobiyozda ve sorbitolde gelişme oldukça zayıftır.

KC-2 izolatının glukoz, frukroz, gliserolde trehalozda, maltozda, salisinde çok iyi asit oluşturabildiği; sükrozda, L-arabinozda, D-sellobiyozda, D-sorbitolde sadece iyi büyüebildiği; D-mannozda hem iyi büyüüp hem de gaz oluşturduğu; D-raffinozda, D-melezitozda, bakto-inositolde, D-galaktozda, mannitolde ve sitratta büyümenin zayıf olduğu; arbutin, laktozda, melibiyozda ise büyümenin gözlenmediği görülmüştür.

KC-101 izolatının ise sükrozda, gliserolde, fruktozda, glukozda, trehalozda, salisinde, maltozda, ribozda, sorbitolde çok iyi asit oluşturduğu; sitratta ve rafinozda büyümenin oldukça zayıf olduğu; L-arabinozda, mannitolde, sellobiyozda, D-galaktozda, D-melezitozda sadece gelişmenin iyi olduğu; arbutinde ve laktozda hiç gelişme olmadığı gözlenmiştir. Melibiyoz testi ise yapılamamıştır.

Şekil 4.86'dan Şekil 4.94'e görüldüğü gibi pH 5'te hepsinde gelişme zayıf ama çok az da olsa görülmüştür. Genel anlamda 1, 2, 3 nolu izolatlar inokulum miktarının düşük gelmesi nedeniyle zayıf gelişmiş görünmektedir ancak önceki analizlerde iyi gelişebildikleri görülmektedir. 4 nolu izolat pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve

11’de iyi gelişim göstermiştir. Optimum gelişmenin pH 6-11 aralığında olduğu tespit edilmiştir. 5 nolu izolat pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11’de iyi gelişim göstermiştir. Optimum gelişmenin pH 6-10 aralığında olduğu tespit edilmiştir. 6 nolu izolat pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11’de iyi gelişebilmekte optimum gelişmenin ise pH 6-11 aralığında olduğu tespit edilmiştir. 7 nolu izolat pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11’de iyi gelişebilmekte optimum gelişmenin ise pH 6-11 aralığında olduğu tespit edilmiştir. 8 nolu izolat pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11’de iyi gelişebilmekte optimum gelişmenin ise pH 6-11 aralığında olduğu tespit edilmiştir. 9 nolu izolat pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11’de iyi gelişebilmekte optimum gelişmenin ise pH 6-11 aralığında olduğu tespit edilmiştir. 10 nolu izolat pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11’de iyi gelişebilmekte optimum gelişmenin ise pH 6-11 aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Optimum NaCl testinde (Şekil 4.69’dan Şekil 4.84’e) karşılaşılan en büyük güçlük % 0 (w/v) NaCl konsantrasyonu içeren besiyerlerinde gelişim olup olmaması olmuştur. Bunu netleştirmek için MH % 12,5 (w/v) total tuz içeren besiyerinde geliştirilmiş olan kültürler % 0 (w/v) NaCl içeren besiyerine direkt 10’ar µl inoküle edildiğinde % 0 (w/v) tuz içermesine karşın besiyerinden gelen tuz içerikleriyle gelişim gösterdiği görülmüştür. İlk total tuz denemesinde hücre yıkaması yapmaksızın bu şekilde aktarım yapılmış % 0 (w/v) tuzda bile gelişim görülmüştür ancak bu durum katı besiyerindeki son tuz konsantrasyonunu etkilediği için yalancı pozitif bir reaksiyon verdiği sonucuna varılmıştır. Bunun yerine başlangıç kültürleri optimum gelişebildiği MH % 12,5 (w/v) besiyerinde 25’şer ml’lik büyük hacimlerde üretilmiştir. Üretimi test edilecek besiyeri olarak ise total tuz yerine sadece % (w/v) NaCl konsantrasyonu ile deneme yapmak için her bir tuz konsantrasyonu için ayrı ayrı birer ml eppendorflara kültürden aktarılıp santrifüjlenmiş ilgili tuz konsantrasyonunu içeren steril besiyeri ile homojenize edilip tekrar santrifüjlendikten sonra aynı besiyerinden 100’er µl aktarılıp homojenize edildikten sonra 3 paralel olacak şekilde petrilere 10’ar µl aktarılmıştır. Bu şekilde gerçekleştirilen % NaCl (w/v) konsantrasyonlarında Nutrient agar genel besiyeri kullanılarak izolatların halofilik olma derecesi yüksek doğrulukla saptanmıştır. Örneğin önceki denemede % 0 (w/v) total tuz içeriğinde gelişen kültürler bu denemede gelişim göstermemiştir. İzolatın halotolerant mı yoksa ılımlı halofilik mi olduğu bu çalışma ile netlik kazanmıştır. Ancak % 15

(w/v) ve üstü NaCl içeren Nutrient agar besiyerlerinde oldukça zayıf gelişim gösterdiği görülen izolatlara bu nedenle % 15 (w/v) ve üstü NaCl konsantrasyonu denemeleri için sıvı kültürlerde test edilmesine karar verilmiştir. MH % (w/v) total tuz çalışmasına göre katı ortamda hepsinin son gelişebildikleri tuz konsantrasyonu % 20 (w/v) olduğu tespit edilmiştir ancak katı ortamda sınırlı geliştikleri gözlemlendiği için aynı çalışma % 19, % 20, % 21, % 22, % 23, % 25 (w/v) NaCl içeren Nutrient Broth (NB) besiyerlerinde sıvı kültürde test edilmiştir. İlk çalışmada 24 saatlik sonuçlar değerlendirilmiş, sonraki çalışmada katı besiyerinde 37 °C’de 72 saatlik sonuçlar değerlendirilmiş ve son çalışmada ise sıvı kültürlerde yüksek konsantrasyonlarda yapılan testlerin sonuçları 37 °C’de 120 saatlik değerlendirmeye alınmıştır. Bu sayede büyüme durumları daha net bir şekilde gözlemlendiği görülmüştür. Sonuçlara göre minimum gelişebildiği tuz aralıkları CT-2, CT-3, CT-4 için aynı olup % 3 (w/v) NaCl içeren NB olmuştur. CT-5, CT-6 ve CS-5 izolatının % 0 (w/v) NaCl’de diğerlerine göre oldukça iyi gelişim gösterdikleri dolayısıyla halotolerant karakterde oldukları tespit edilmiştir. CS-4 izolatının minimum % 2,5 (w/v) NaCl içeren NB besiyerinde gelişim göstermesi nedeniyle ılımlı halofilik özellik gösterdiği görülmüştür. Minimum gelişimini % 2 (w/v) NaCl içeren NB besiyerinde gösteren HT-9 izolatının ılımlı halofilik karakter gösterdiği görülmüştür. % 1 (w/v) NaCl içeren NB’da gelişim gösteren KC-2 ve % 1,5 (w/v) NaCl içeren NB besiyerinde gelişim gösteren KC-101 izolatının ise yine birer ılımlı halofilik karakter gösterdiği görülmüştür. Bu durumda CT-5, CT-6, CS-5 izolatlarının halotolerant bakteri, diğer izolatların ise ılımlı halofilik bakteri olduğu tespit edilmiştir.

Optimum sıcaklık testleri (Şekil 4.95’ten 4.100’e) denemesi sonucuna göre test edilen sıcaklık aralıkları içerisinde minimum sıcaklık olarak CT-2, CT-3, CT-4, CT-6, CS-4, CS-5, HT-9, KC-2 ve KC-101 izolatlarının +4 °C’de gelişebildiği görülmüştür. Sadece CT-5 izolatının +4 °C’de gelişmediği, gelişim gösterdiği minimum sıcaklığın ise 20 °C olduğu tespit edilmiştir. CS-5 ve HT-9 izolatlarının 45 °C’de gelişebildiği, CT-2, CT-3, CT-4 ve CS-4 izolatlarının 50 °C’de gelişebildiği, CT-6 izolatının 37°C’de gelişebildiği, CT-5, KC-2 ve KC-101 izolatlarının ise 55 °C’de gelişebildiği tespit edilmiştir.

Sıvı kültürlerde tek azot kaynağında (Şekil 4.57, Şekil 4.58, Çizelge 4.5) 5 günlük büyüme testi sonuçları değerlendirildiğinde, 8 farklı amino asit kaynağında büyüme testine göre CT-2 hepsinde pozitif, CT-3, L-Metiyonin, L-Arginin, L-Valin'de negatif geri kalanda pozitif büyüme göstermiştir. CT-4, L-Treonin ve L-Sistein'de negatif geri kalanlarda pozitif büyüme göstermiştir. CT-5, L-Valin ve L-Lizin'de pozitif diğerlerinde negatif büyüme göstermiştir. CT-6, L-Lizin, L-Arginin, L-Serin'de pozitif diğerlerinde negatif büyüme göstermiştir. CS-4, L-Metiyonin, L-Treonin ve L-Sistein'de negatif geri kalanlarda pozitif büyüme göstermiştir. CS-5, DL-Asparagin L-Metiyonin, L-Serin, L-Treonin, L-Lizin'de negatif geri kalanlarda pozitif büyüme göstermiştir. HT-9, L-Metiyonin, L-Sistein'de negatif geri kalanlarda pozitif büyüme göstermiştir. KC-2, L-Metiyonin, L-İzolösin, L-Valin, L-Lizin'de negatif geri kalanlarda pozitif büyüme göstermiştir. KC-101, L-İzolösin, L-Sistein, L-Valin'de negatif geri kalanlarda pozitif büyüme göstermiştir.

5.3 Antibiyotik Dirençliliklerinin Değerlendirilmesi

Antibiyotik test sonuçlarına göre (Şekil 4.59'dan Şekil 4.68'e, Çizelge 4.6) aynı morfolojiye sahip üç izolat olan CT-2, CT-3 ve CT-4 karşılaştırıldığında CT-2 ve CT-4'ün birbirinden farklı olduğu, CT-3 ve CT-4'ün de Ampisilin ve Basitrasin açısından farklı olduğu diğerlerinin aynı olduğu görülmüştür. Bu durumda üçü birbirinden farklı çıkmaktadır. CS-5 ve KC-101'in ise yine 16S rRNA gen sonuçlarına göre benzer çıkmasına rağmen farklı antibiyotik profilleri göstermiştir. Dirençlilik açısından ele aldığımızda CS-5; Basitrasin, Tetrasiklin ve Eritromisine karşı dirençli çıkmıştır. CS-4; Basitrasin, Tetrasiklin ve Novobiyosine dirençli çıkmıştır. HT-9; Tetrasiklin ve Streptomisine karşı dirençli çıkmıştır. KC-2; Basitrasin ve Tetrasikline dirençli çıkmıştır. KC-101; Basitrasin, Tetrasiklin ve Novobiyosine dirençli çıkmıştır. Antibiyotik testlerinin fenotipik testler içinde ayırt edici bir öneme sahip olduğu bir kez daha görülmüştür. Dirençlilik profilleri açısından değerlendirdiğimizde izolatlardan *Halomonas* cinsine ait CS-5 izolatı deniz kökenlidir. Bu ortamda evlasyonel süreçte kazanmış olduğu direnç genleri Basitrasin, Tetrasiklin ve Eritromisin antibiyotiklerine karşıdır. *Pantoea* sp. CS-4 izolatına ait direnç sonuçlarına göre

farklı olarak Novobiyosine karşı dirençli çıkmıştır. *Oceanobacillus* sp. HT-9 izolatı ise diğerlerinden farklı olarak Streptomisine direnç geliştirmiştir.

5.4 Çamaltı Tuzlası'ndan Bugüne Kadar İzole Edilmiş Halofilik Bakteriler

Çamaltı Tuzlası'ndan bugüne kadar izole edilen türler bakımından Türkiye kaynaklı yapılan tezler incelendiğinde; *Halobacillus* sp., *Halomonas salina*, *Bacillus marismortui*, *Halomonas salina* izolatları yüksek lisans tez çalışmasında (Demirci, 2009); *Bacillus permians*, *Halomonas halophila*, *Halobacillus* sp. izolatları bir başka yüksek lisans tez çalışmasında (Albayrak, 2010); *Halomonas* sp. MU21 yüksek lisans tez çalışmasında (Uzyol, 2007); *Bacillus halodenitrifica*, *Bacillus laevolacticus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus halodenitrificans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus oleronius*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus coalulans*, *Bacillus circulans* türleri yine yüksek lisans tez çalışmasında tanımlanmıştır (Çetinkuş, 2007). *Halomonas* sp. MU6, *Halomonas salina* olarak yüksek lisans tez çalışmasında karakterize edilmiştir (Yavuztürk, 2005). *Halomonas* sp. AAD12 suşunun proteomu çıkartılarak tuz stresinin ektoin metabolizması üzerine etkisi çalışılmıştır (Ceylan et al., 2012). *Halomonas* sp. AAD21 adlı türün termostabil amilaz üreticisi olduğu bildirilmiştir (Uzyol et al., 2012, Poli et al., 2013) tarafından *Halomonas* sp. AAD6^T Çamaltı Tuzlası'ndan izole edilmiş ve tür tanısı yapıp *Halomonas smyrnensis* AAD6^T olarak Uluslararası Sistematik ve Evrimsel Mikrobiyoloji dergisinde yayınlanan ilk tip tür özelliğinde olup koyu sarı renkte olduğu, H₂S ve nitrat indirgenmesinin olmadığı, % 3-25 (w/v) NaCl'de, pH 5,5-8,5 arasında geliştiği, 5-40 °C arası sıcaklıklarda gelişebildiği, kazein ve tween 80 hidrolizleyen bir tür olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *Halomonas smyrnensis* AAD6^T'in taslak genom sekansının da çıkartıldığı bildirilmiştir (Sogutcu et al., 2012). Levan üretebildiği tespit edilen bu türün anti-kanser aktivitesi araştırılmış (Kazak Sarilmiser and Toksoy Öner, 2014) ve üretimini arttırıcı faktörleri de çalışılmıştır (Kazak Sarilmiser et al., 2014, in press).

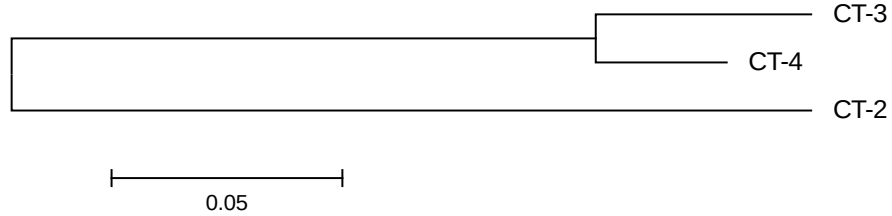
5.5 Tip Tür Karşılaştırmaları ve Tür Tanısının Sonuçlandırılması

5.5.1 CT-2, CT-3, CT-4 izolatlarının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması

CT-2, CT-3, CT-4 izolatları birbirine benzer görünüşleri nedeniyle incelediğimizde birbirlerinden tek karbon kaynağında asit ve gaz oluşumları bakımından ve antibiyotik dirençlilikleri açısından farklılık gösterdiklerini bunun dışında genetik olarak ve pigment üretimi açısından birbirinin aynısı olduğu gözlenmiştir. Ancak filogenetik olarak en yüksek benzerlikleri sırasıyla; CT-2, *Bacillus* sp. HZ03 (% 89)'e 999 bp uzunlukla, CT-3, *Bacillus* sp. MH05 (% 94)'e 1533 bp uzunlukla, CT-4, *Bacillus* sp. MH05 (% 98)'e 1507 bp uzunlukla benzer çıktığı görülmüştür. Fakat bu suşların tam tanısı yayınlanmadığı için tür bazında tanısı yapılmış ikinci en yüksek benzerleri sırasıyla CT-2 için *B. hwajinpoensis* CCMM B691 (% 85), CT-3 için *B. baekryungensis* GSP56 (% 93), CT-4 için *B. baekryungensis* GSP54 (% 97) olduğu NCBI BLAST sonuçlarına göre tespit edilmiştir. Tür ayrımında % 97 sınır değer olarak bilindiğinden (Nalbantoglu and Sayood, 2011), CT-3 ve CT-4 için bu izolatların yeni tür olduğu düşünülmektedir. CT-2'nin ise 16S rRNA gen bölgesi uzunluğunu karşılaştırmada yetersiz kalması nedeniyle bu aşamada ek çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir. CT-3, *B. baekryungensis* GSP56 ile % 93 genetik benzerliğe sahip olması nedeniyle literatüre göre tür bilgilerinin karşılaştırılması sonucunda CT-3 ve CT-4'ün farklı yüzdelerde de olsa aynı türe benzer çıkmaları (*B. baekryungensis*) ve sadece farklı suşlarına (GSP56 ve GSP54) benzemeleri ile çok büyük bir benzerliğe sahip oldukları görülmekte ancak suşlarının farklı olabileceği düşünülmektedir. İzolasyon kaynakları açısından değerlendirdiğimizde CT-3 deniz suyunun kademeli olarak buharlaştırmasıyla elde edilen tuz üretim yeri olan İzmir Çamaltı Tuzlası (Koru, 2004) tuz yığını örneğinden izole edilmiştir. *B. baekryungensis* GSP56 ve GSP54 suşları ise Oklahoma'nın Büyük Tuz tavalarından izole edilmiştir (Caton et al., 2004). *B. baekryungensis* türü ise Sarı Deniz'den izole edilip Gen Bankasında AF541965 numarasıyla kayıt edilmiş (Yoon et al., 2002) ancak makalesi çıkmamış provizyonel bir tür olduğu ancak zenginleştirme kültüründe sarı veya turuncu koloniler oluşturduğu ve seyreltme plaka tekniği ile kültüre edilememiş bir tür olduğu da bildirilmiştir (Caton et al., 2004). Turuncu

veya açık sarı pigmentli olan, % 3-22 (w/v) NaCl arasında gelişen ılımlı halofilik olan bu 3 izolatın gram reaksiyonu gram değişkendir. *B. hwajinpoensis* CCMM B691 (Berrada et al., 2012)'in % 0,5-15 (w/v) NaCl arasında geliştiği bildirilmiştir. *B. hwajinpoensis*'in (Yoon et al., 2004) gelişebildikleri optimum NaCl konsantrasyonlarının % 2-5 (w/v) NaCl aralığında olduğu % 19 (w/v) NaCl'de büyümenin olduğu ancak NaCl içermeyen veya % 20 (w/v) ve üstünde büyümenin gözlenmediği bildirilmiştir. Gelişebildikleri sıcaklık aralıkları bakımından *B. hwajinpoensis* (Yoon et al., 2004) ile karşılaştırıldığında izolatlardan farklı oldukları görülmüştür. Zira CT-2, CT-3 ve CT-4'ün 4-50 °C iken *B. hwajinpoensis* 10-40 °C (Yoon et al., 2004), *B. hwajinpoensis* (Berrada et al., 2012) 10-55 °C arasında gelişim gösterdiği bildirilmiştir. *B. hwajinpoensis* (Yoon et al., 2004)'in gelişebildiği pH aralıklarının optimum pH 6,0-7,0 olduğu ve pH 5,0'de büyümenin gözlemlendiği ama pH 4,5'de büyümenin gözlenmediği bildirilmiştir. Zira CT-2, CT-3 ve CT-4'ün pH 5-11 arasında gelişen bu üç suş, optimum olarak pH 6-11 arasında gelişmektedir. İlk pH denemelerinde MH % 5 (w/v) total tuz içeren besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonuçlarının soğukta bekletildikten sonra fotoğrafları çekilmiştir. Sonraki pH denemesinde % 5 (w/v) NaCl içeren NB besiyerinde 72 saat inkübe edilerek sonuçlar kaydedilmiştir. *B. hwajinpoensis* JCM 11807T (Yoon et al., 2004) optimum pH 7,0 olduğu, *B. hwajinpoensis* CCMM B691 (Berrada et al., 2012)'in ise optimum 7,0-9,0 olduğu bildirilmiştir. Kazein, jelatin, nişasta, tween 80, nitrat indirgenmesi için pozitif olduğu bildirilmiş ancak DNaz testi bildirilmemiştir. Bu durumda tween 80 ve Dnaz testleri haricindeki biyokimyasal testleri benzer bulunmuştur. L-arabinoz, bakto-inositol, D-sorbitol, D-melezitoz ve D-rafinoza yanıtları *B. hwajinpoensis* (Yoon et al., 2004) ile birbirlerinden farklıdır. Laktoz, sellebiyoz, mannozdan gaz oluşumları da farklı olan bir diğer özellikleridir. *Bacillus sp.* HZ03 ve *Bacillus sp.* MH05 suşları Kore'nin güneybatı kıyılarındaki tuzlu topraklardan izole edilmiş heterotrofik halotolerant bakteri başlığı altında AY690704.1 ve AY690699.1 Gen bankası erişim numaralarıyla NCBI'da yer almaktadır (Choi et al., 2004) ancak tür tanısına ilişkin veriler bulunmamaktadır. Şu aşamada isimlendirmeleri *Bacillus sp.* CT-2 suşu, *Bacillus sp.* CT-3 suşu, *Bacillus sp.* CT-4 suşu olarak yapılmış ve Gen Bankasından erişim numaraları alınarak sisteme kayıt ettirilmiştir. Sonuç olarak CT-2, CT-3 ve CT-4 suşları temel özellikleri bakımından özellikle sıcaklık, tuzluluk istekleri ve pH aralıkları bakımından farklı olmalarına dayanarak

filogenetik açıdan ise sınır değer olan % 97'nin altında bir benzerlik bulunması nedeniyle ve izole edildikleri kaynakların birbirinden oldukça uzak olması yani coğrafik sınırlar nedeniyle yeni tür olduğu öne sürülmektedir.



Şekil 5.1 Taksalar arası evölüsyonel benzerlik

Şekil 5.1’de Neighbour Joining metoduna göre MEGA6 programı kullanılarak yapılan analizde (Saitou and Nei 1987, Tamura et al., 2013) evrimsel uzaklık Maximum Composite Likelihood metoduna göre program tarafından hesaplanmıştır (Tamura et al., 2004) ve her bir birim bölgede baz değişim sayısı kullanılmıştır. Boşluk ve kayıp veri içeren tüm pozisyonlar elimine edilmiştir. Son datasetinde 871 pozisyon elde edilmiştir. Evrimsel analiz MEGA6 ile yapılmıştır (Tamura et al., 2013).

5.5.2 CS-5 ve KC-101 izolatlarının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması

NCBI BLAST sonuçlarına göre CS-5, 1469 bp uzunlukla ve KC-101, 1473 bp uzunlukla 16S rRNA gen benzerlikleri bakımından % 99 oranında *Halomonas* sp. TB216 olarak bildirilen suşa benzer çıkmıştır. Sonrasında bu suşun tam tanısı yapılmış ve *Halomonas janggokensis* olduğu bildirilmiştir (Kim et al., 2007). Aralarında benzerlik karşılaştırması yapmadan önce izolatların nereden izole edildiğini ve karşılaştırmanın izolasyon kaynağından başlaması gerektiğinden hareketle CS-5, İzmir Çamaltı Tuzlası tuzlu su havuzundan izole edilmiştir. KC-101, İzmir Kuş Cenneti Tuzlu su havuzundan izole edilmiştir. *Halomonas janggokensis* Kore’deki Janggok güneş tuzlasından izole edilmiştir (Kim et al., 2007). CS-5 ile KC-101 temel morfolojik özellikleri karşılaştırıldığında CS-5’in aynı büyüme ortamında belirgin bir şekilde sarı pigmentli koloniler oluşturduğu

ve KC-101'in ise açık krem renkli koloniler oluşturduğu bekleyen kültürün koyu kahverengine dönüştüğü gözlenmiştir. *Halomonas janggokensis* kolonilerinin ise diğer ikisinden farklı olarak beyaz olduğu bildirilmiştir (Kim et al., 2007). Işık mikroskobuna göre de hücre boyutlarının birbirinden farklı olduğu CS-5'in kısa basil KC-101'in ise orta uzunlukta basil olduğu görülmüştür. Bu şekilde morfolojik özellikleri bakımından karşılaştırıldığında birbirinden farklı oldukları görülmüştür. CS-5'in gelişebildiği sıcaklık aralığının 4-45 °C olduğu, KC-101'in 4-55 °C olduğu, *Halomonas janggokensis*'in ise 5-45 °C (Kim et al., 2007) olduğu bilinmektedir. Gelişebildiği pH aralıkları olarak CS-5'in ve KC-101'in pH 5-11 olduğu gözlenmiş, *Halomonas janggokensis*'de ise pH 6,0-10 aralığında (Kim et al., 2007) gelişebildiği bildirilmiştir. Gelişebildikleri tuzluluk aralıkları bakımından incelendiklerinde CS-5'in % 0-25 (w/v) NaCl aralığında gelişebildiği, KC-101'in % 1,5-25 (w/v) NaCl aralığında gelişebildiği görülmüştür. *Halomonas janggokensis*'in ise % 1-20 (w/v) NaCl aralığında gelişebildiği (Kim et al., 2007) bildirilmiştir. H₂S üretimi bakımından incelendiğinde CS-5'in H₂S üreticisi olmadığı, KC-101'in ise H₂S üreticisi olduğu görülmüştür. *Halomonas janggokensis*'in ise H₂S üreticisi olmadığı (Kim et al., 2007) bildirilmiştir. CS-5'in nitratı nitrite indirgemediği ancak KC-101'in indirgeyebildiği dolayısıyla bu özellikleriyle de birbirinden farklı oldukları gözlenmiştir. *Halomonas janggokensis*'in ise nitratın nitrite indirgemediği bildirilmiştir (Kim et al., 2007). Kazein hidrolizinin her üçü için de negatif olduğu görülmektedir (Kim et al., 2007). Nişasta hidrolizinin CS-5 ve KC-101 için pozitif olduğu gözlenmiş, *Halomonas janggokensis* için ise negatif olduğu bildirilmiştir (Kim et al., 2007). DNA hidrolizinin her üçü için de pozitif olduğu görülmüştür (Kim et al., 2007). Ayrıca tek karbon kaynağından asit ve gaz oluşum testlerine göre de KC-101 laktozda gelişmezken, CS-5 gelişebilmektedir. KC-101 sükrozda asit oluştururken, CS-5 sadece gelişebilmektedir. Tek azot kaynaklarında büyüme testine göre ise CS-5, DL-Asparagin L-Metiyonin, L-Serin, L-Treonin, L-Lizin'de negatif geri kalanlarda pozitif büyüme göstermiştir. KC-101 ise L-İzolösin, L-Sistein, L-Valin'de negatif geri kalanlarda pozitif büyüme göstermiştir. Tüm bu testler ışığında CS-5 ve KC-101'in tanımlanmış tür olan ve filogenetik olarak en yüksek benzerliğe sahip tür olan *Halomonas janggokensis*'den fenotipik, morfolojik ve bazı biyokimyasal testler bakımından farklı olduğu tespit edilmiştir. 16S rRNA gen analizleri % 99 oranında benzer çıkmasına rağmen izolatların çok

belirgin bir şekilde birbirinden farklı oldukları görülmektedir. Bu da fenotipik ve biyokimyasal testlerin tür ayırmada etkin olduğu ve 16S rRNA genlerinin analizinin ise izolatların taksonomik yerini belirlemek açısından cins düzeyinde tanı yapması açısından çok etkin ancak bu türleri birbirinden ayırmada etkin olmadığı bu çalışma ile görülmektedir. Bu ayırım korunmuş gen bölge analizleriyle (Nalbanoglu and Sayood, 2011) de daha sonra desteklenecektir ancak şu anki bilgiler ışığında CS-5'in halotolerant ve KC-101 ise bir ılımlı halofilik olduğu dolayısıyla hem yeni tür olduğu hem de *H. janggokensis*'ten farklı olduğu düşünülmektedir. İzolatlar *Halomonas* sp. CS-5 suşu ve *Halomonas* sp. KC-101 suşu olarak NCBI Gen Bankasına kayıt ettirilmiştir.

5.5.3 CT-5 izolatının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması

Genbankası verileri ile yapılan NCBI BLAST 16S rRNA gen dizi analizleri sonucunda 1533 bp uzunlukla CT-5 izolatının % 95 oranında *Virgibacillus* sp. B1-21'e benzer olduğu tespit edilmiştir. % 97 sınır değer altındaki bu benzerlikle farklı tür olduğu görülmektedir. Ölü Deniz'den izole edilen *Virgibacillus* sp. B1-21'in daha sonra *Virgibacillus marismortui* olarak tanımlandığı bildirilmiştir (Essghaier et al., 2009). *Virgibacillus* sp. B1-21 (*Virgibacillus marismortui*)'in % 5-25 (w/v) NaCl aralığında yaşayabilen kolonilerinin krem renkli, dairesel, bütün ve opak olduğu ılımlı halofilik bir tür olduğu bildirilmiş, CT-5 suşunun ise % 0-22 (w/v) NaCl'de iyi gelişebildiği için halotolerant olduğu gözlenmiştir. CT-5'in gelişebildiği sıcaklık aralığı 20-55 °C ve gelişebildiği pH aralığı pH 5-11'dir. Optimum olarak ise pH 6-10 aralığında gelişmektedir. *Virgibacillus* sp. B1-21 (*Virgibacillus marismortui*) ise 15-50 °C sıcaklık aralığında ve pH 6,0-9,0 arasında optimum ise pH 7,5'da geliştiği bildirilmiştir. *Virgibacillus* sp. B1-21 (*Virgibacillus marismortui*)'de oksidaz pozitifken CT-5 suşunda oksidaz negatif görülmüştür. *Virgibacillus* sp. B1-21 (*Virgibacillus marismortui*)'de proteaz ve amilaz negatif olduğu bildirilmiştir ancak CT-5'de proteaz ve amilaz enziminin çok az da olsa bulunduğu gözlenmiştir. *Virgibacillus* sp. B1-21 (*Virgibacillus marismortui*)'de jelatin pozitif ve tween 80 hidrolizi negatif, CT-5'te tween 80 negatif gözlenmiştir. Nitrat indirgenmesi her ikisinde de pozitif, H₂S üretimi sadece CT-5'te çok zayıf bir şekilde pozitifdir. Laktozdan ve glukozdan asit oluşumu her ikisinde de negatiftir.

CT-5 izolatının sadece mannitolde iyi büyüebildiği ama asit oluşturmadığı görülmüştür. Fruktozda, L-arabinozda, D-ribozda, D-galaktozda, D-mannozda, bakto-inositolde, D-melezitozda ise zayıf geliştiği gözlenmiştir. Diğerlerinde ise gelişim gözlenmemiştir. CT-5 izolatı için melibiyoz testi ise yapılamamıştır. CT-5, L-Valin ve L-Lizin’de pozitif diğerlerinde negatif büyüme göstermiştir. *Virgibacillus* sp. B1-21 (*Virgibacillus marismortui*)’de asit üretiminin D-fruktoz, D-glukoz, gliserol ve maltozda olduğu ancak D-arabinoz, D-galaktoz, laktoz, D-mannitol, sükroz, D-trehaloz, veya D-ksilozda olmadığı bildirilmiştir. D-fruktoz, inulin, maltoz, D-mannitol, D-mannoz, piruvat, D-raffinaz, D-ramnoz ve süksinatı tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiği bildirilmiştir (Essghaier et al., 2009). Bu durumda yapılan karşılaştırmalar sonucu tip tür olan *Virgibacillus marismortui* ile *Virgibacillus* sp. CT-5 arasında hem fenotipik, hem biyokimyasal hem de genetik açıdan farklılıkların olması nedeniyle yeni tür olduğu düşünülmektedir. *Virgibacillus* sp. CT-5 suşu NCBI Gen Bankasına kayıt ettirilmiştir.

5.5.4 CT-6 izolatının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması

CT-6; 1472 bp uzunlukla % 99 oranında *Kocuria* sp. ZS2-6 (Yu et al., 2010)’a benzer bulunmuştur. Ancak çalışmada tür tanısına dair bilgi verilmediği için genel tür karşılaştırılması yapılacaktır. Gram pozitif kok olan CT-6 izolatı İzmir Çamaltı Tuzlası’ndan tuz yığınının izole edilmiştir. 4-37 °C aralıklarında, pH 5-11 aralığında gelişebilmekte olup, katalaz pozitif oksidaz negatif özelliğe sahiptir. Kazein, tributirin, tirozin hidrolizi negatif, DNA, nişasta hidrolizi pozitif olup, nitratı nitrite indirgeyebilmektedir. H₂S üretimi negatiftir. % 0-19 (w/v) NaCl aralığında gelişebilmekte olup halotolerant özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Arbutin ve bakto-inositolden gaz oluşturmakta, D-mannozda gelişememekte, sitrat, glukoz ve sellobiyozda zayıf gelişip geri kalanlarda gelişebilmektedir. Sükroz, salisin ve maltozdan iyi derecede asit oluşturabilmektedir.

Kocuria sp. türlerinin ise tuza toleranslarının değişken olduğu çoğu suşunun % 5 (w/v) NaCl tolere edebildikleri bildirilmiştir ve sadece *K. marina* ve *K. rhizophila*’nın % 15 (w/v) NaCl’ü tolere ettiği bildirilmiştir. *K. marina*’nın 4-43

°C arasında yaşayabildiği bildirilmiştir (Kim et al., 2004). *K. rhizophila*'nın (Kovacs et al., 1999) pH aralığı olarak ise sıklıkla alkalifilik oldukları pH 5-12'de yaşayabilen *Kocuria aegyptia* ile pH 7-12'de yaşayabilen *Kocuria polaris* olduğu bildirilmiştir (Stackebrandt et al., 1995, Goodfellow et al., 2012). *Kocuria rosea* (Flügge 1886) tip türünün ise katalaz pozitif, kolonileri dairesel, biraz konveks, düz ara sıra pürüzlü, pembe veya kırmızı renkte olup, optimum büyüme sıcaklığının 25-37 °C arasında olduğu, koloni morfolojisi ve renginin yaşla birlikte çok farklılaştığı bildirilmiştir. % 7,5 (w/v) NaCl'a kadar iyi gelişebildikleri % 15 (w/v) NaCl'te gelişemedikleri, oksidazın negatif olduğu ve nadiren zayıf pozitif olabildiği benzidin testinin pozitif olduğu, nitrat indirgenmesinin pozitif veya zayıf pozitif olduğu; arginine dihidrolaz, fenilalanin deaminaz, üreaz, lesitinaz, fosfataz, β -galaktozidaz ve koagulazın negatif olduğu bildirilmiştir. İnorganik nitrogen agarda ve sitrat agarda çoğu suşun büyümediği, eskülin hidrolizi ve jelatin hidrolizinin negatif olduğu, tween 80 ve nişasta hidrolizinin değişken olduğu, asetoin üretiminin negatif ya da zayıf olduğu, indol ve H₂S üretilmediği bildirilmiştir. Çoğunun ramnozu, ksilozu, glusitolü kullanabildiği ve mannoz, galaktoz, laktoz, gliserolden asit oluşturamadığı bildirilmiştir. Glukozdan asit oluşumunun ise değişken olduğu bildirilmiştir. *Kocuria* sp. ZS2-6'ya ilişkin tür bilgileri sadece Çin'de Antartik kumullarından izole edildiği ancak sadece filogenetik olarak çalışıldığı dolayısıyla fenotipik, biyokimyasal özelliklerinin belirlenmemiş olması nedeniyle yeni tür olup olmadığı konusunda net bir bilgi verilememektedir. *Kocuria* sp. CT-6 suşu NCBI Gen Bankasına kayıt ettirilmiştir.

5.5.5 CS-4 izolatının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması

CS-4; 1522 bp uzunlukla en yüksek % 87 oranında *Pantoea agglomerans* KB38 (Pesciaroli et al., 2012) suşuna benzer bulunmuştur. Bu durumda bu izolatın % 97 sınır değerine göre değerlendirdiğimizde yeni tür olduğu düşünülmektedir. CS-4 izolatı 4-50 °C'de gelişmektedir ancak *Pantoea agglomerans* KB38 suşunun gelişim gösterdiği sıcaklık aralığının 5-35 °C olduğu ve optimum olarak ise 30 °C olduğu bildirilmiştir (Pesciaroli et al., 2012). Koloni özelliklerinin ise sarı pigmentli olduğu, parlak, dairesel, bütün, pürüzlü ve yükseltisi olduğu bildirilmiştir. Bu özelliği ile de CS-4 ile farklı oldukları görülmektedir. Çünkü CS-4 krem renkli kolonilere sahiptir. pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve

11’de iyi gelişebilmekte optimum olarak ise pH 6-11 aralığında gelişmektedir. CS-4 izolatının yoğun inokulum miktarına rağmen % 2,5-19 (w/v) NaCl içeren NB ortamında geliştiği için ılımlı halofilik özellikte olduğu görülmüştür. Gram negatif basil yapısında olan CS-4 izolatı, H₂S üreticisi olup, katalaz pozitif oksidaz negatiftir. Nitratı nitrite indirgeyebilmekte, proteaz negatif olup sükrozda, gliserolde, maltozda, L-arabinozda, galaktozda, melezitozda büyümenin iyi olduğu görülmüş ancak asit ve gaz oluşumu gözlenmemiştir. Sitratta, arbutinde, fruktozda, mannitolde, trehalozda, salisinde, ribozda, mannozda, bakto-inositolde, sorbitolde, melibiyozda, rafinozda gelişin zayıf olduğu görülmüştür. Glukozda ve sellobiyozda oldukça zayıf gelişim olduğu gözlenmiştir. Laktozda gelişme gözlenmemiştir. Tek azot kaynağında büyüme testi sonuçları değerlendirildiğinde, 8 farklı amino asit kaynağında büyüme testine göre CS-4, L-Metiyonin, L-Treonin ve L-Sistein’de negatif geri kalanlarda pozitif büyüme göstermiştir. CS-4’ün tip türle karşılaştırılması sonucunda farklı özellikleri olduğu görülmektedir. Bu nedenle de yeni tür olduğu düşünülmektedir. *Pantoea* sp. CS-4 suşu NCBI Gen Bankasına kayıt ettirilmiştir.

5.5.6 HT-9 izolatının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması

HT-9; 1519 bp uzunlukla % 98 oranında *Oceanobacillus kimchii* X50 suşuna benzer bulunmuştur. Eşik değeri geçtiği için *Oceanobacillus kimchii* X50 suşuna benzerliği karşılaştırıldıktan sonra muhtemelen bu türe ait bir suş olacağı düşünülmektedir. Ilımlı halofilik bir tür olduğu belirtilen *Oceanobacillus kimchii* X50^T tip türünün, Kore’nin geleneksel fermente gıdası olan “Kimçi”den” izole edilmiş olduğu, % 0-15,0 (w/v) NaCl aralığında ve optimum % 3 (w/v) NaCl’de gelişebildiği, pH 7,0-10,0 aralığında gelişebildiği optimum ise pH 9,0’da gelişebildiği ve sıcaklık aralığı olarak ise 15-45 °C arasında gelişebildiği optimum ise 37 °C’de gelişebildiği bildirilmiştir. Krem renkli kolonilere, basil şekilli hücrelere sahip olduğu bildirilmiştir (Whon et al., 2010). HT-9 izolatının ise gelişim gösterdiği sıcaklık aralığı 4-45°C arasında olup gelişim gösterdiği pH aralığının pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11 olduğu optimum olarak ise pH 6-11 aralığında gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. % 2-25 (w/v) NaCl içeren NB besiyerinde gelişim gösteren HT-9 izolatı ılımlı halofilik karakter göstermektedir. Açık kremimsi (HT-9) renkte pigment üreten, proteaz enzimini zayıf bi şekilde

üretebilen, DNaz pozitif, amilaz pozitif, H₂S üretimi negatif özelliktedir. HT-9 izolatının süktrozda ve arbutinde hem gelişmenin iyi hem de gaz oluşumunun pozitif olduğu, gliserolde, glukozda, maltozda asit oluşumunun çok iyi olduğu, sitratta, fruktozda, trehalozda, salisinde, laktoz, arabinoz, sellobiyoz, ribozda, mannozda, melibiyozda, melezitozda, rafinozda gelişim iyi iken, mannitol, galaktoz, bakto-inositolde gelişim zayıf, D-sorbitolde ise gelişim gözlenmemiştir. HT-9, L-Metiyonin, L-Sistein'de negatif geri kalanlarda pozitif büyüme göstermiştir. Bu iki suşun özellikleri karşılaştırıldığında birbirinden farklı oldukları görülmektedir. Bu nedenle de HT-9'un yeni tür olduğu düşünülmektedir. *Oceanobacillus* sp. HT-9 suşu NCBI Gen Bankasına kayıtlanmıştır.

5.5.7 KC-2R izolatının tip tür özellikleriyle karşılaştırılması

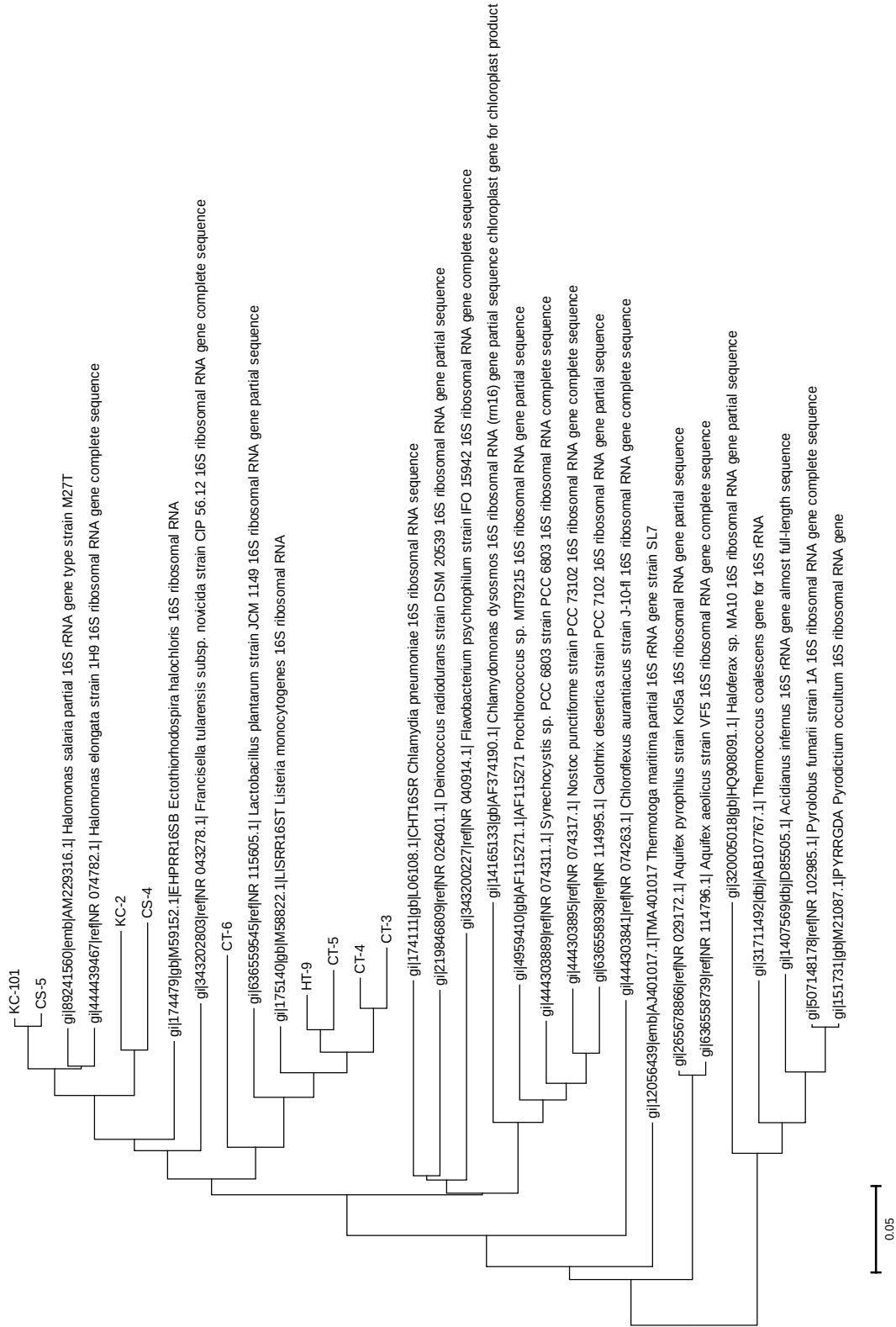
KC-2R; 893 bp uzunlukla % 97 oranında *Salinivibrio* sp. FAM 10 clone 2 (Lee, 2012) suşuna benzer bulunmuştur. KC-2 izolatu 4-55 °C gelişim gösterebilmekte, pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11'de iyi gelişebilmekte optimum olarak ise pH 6-11 aralığında gelişmektedir. KC-2R minimum % 1-25 (w/v) NaCl içeren NB'da geliştiği için ılımlı halofilik bakteridir. *Salinivibrio* sp. FAM 10 clone 2'nin ise optimal olarak % 2-4 (w/v) NaCl de gelişen ve maksimum % 18-22 (w/v) NaCl'de gelişebilen ılımlı halofilik proteaz üreticisi bir suş olduğu bildirilmiştir. Her ikisinin de gram negatif kıvrık basil olduğu ve krem renkli koloniye sahip, proteaz pozitif ve oksidaz pozitif olduğu bilinmektedir. Nitrat indirgenmesinin negatif olması aralarındaki farklılığı yansıtmaktadır çünkü KC-2'de nitrat indirgenmesi pozitifdir. FAM 10 clone 2'nin indol üretiminin negatif olduğu, glukoz ve sitrattan asit oluşturabildiği, arginin dihidrolaz pozitif, üreaz negatif olduğu, jelatinaz pozitif olduğu, glukozu, mannozu, mannitolü, n-asetil-glukozamini, maltozu, glukonatu, kapratı karbon kaynağı olarak kullanabildiği, adipat, malat ve fenil-asetatı kullanamadığı bildirilmiştir. KC-2 izolatının ise H₂S negatif, DNaz pozitif, amilaz pozitif, asit oluşumu; glukoz, frukroz, gliserolde trehalozda, maltozda, salisinde pozitif; süktrozda, L-arabinozda, D-sellobiyozda, D-sorbitolde sadece iyi büyüebildiği; D-mannozda hem iyi büyüüp hem de gaz oluşturduğu; D-raffinozda, D-melezitozda, bakto-inositolde, D-galaktozda, mannitolde ve sitratta büyümenin zayıf olduğu; arbutin, laktozda, melibiyozda ise

büyümenin gözlenmediği görülmüştür. KC-2, L-Metiyonin, L-İzolösin, L-Valin, L-Lizin'de negatif geri kalanlarda pozitif büyüme göstermiştir. Bu durumda iki suşun özelliklerinin birbirinden farklı olduğu görülmektedir. KC-2 izolatının yeni bir tür olduğu düşünülmektedir. *Salinivibrio* sp. KC-2 suşu NCBI Gen Bankasına kayıt ettirilmiştir.

5.5.8 16S rRNA gen bölgelerinin karşılaştırılması

Canlılığın 3. domaini olan Arkeleri keşfeden Woese (1982) sahip oldukları 16S rRNA gen bölgesi farklılıklarından hareketle canlılığın 3 domain altında incelenmesi gerektiğini aynı zamanda klasik taksonominin yerini alabilecek filogenetik bir markırın hızlı bir şekilde tür tanısına katkıda bulunacağını ortaya koymuştur (Woese, 1987). 16S rRNA gen bölgesi karşılaştırmaları sonucu bu çalışmada çizilen grafikte 3 domaini içeren örnek organizmaların 16S rRNA gen dizileri GenBank'tan elde edilerek bu çalışmada izole edilen izolatlarla birlikte MEGA6 programıyla filogenetik ağacı çizilmiştir. Bu ağaçta görüldüğü gibi yakın akraba olanlar komşu dalda birbirine en yakın konumda yer almaktadır. Bu da elimizdeki türlerin filogenetik konumlarını göstermektedir. Üç farklı ağaç çizilmiş ve en uygun olarak minimum evölüsyon ağacı burada gösterilmiştir (Şekil 2.1). Buna göre evrimsel uzaklığın Maximum Composite Likelihood metodu (Tamura et al., 2004) ile hesaplandığı, toplam dal uzunluğunun 2.50999711 olduğu, Close-Neighbor-Interchange algoritması (Nei and Kumar, 2000) ve Neighbor-joining algoritması (Saitou and Nei, 1987) kullanıldığı MEGA6 programında bildirilmiştir. 32 nükleotid dizisi toplamda karşılaştırılmıştır. Boşluk ve kayıp data içeren kısımlar elimine edilmiştir (Tamura et al., 2013). Karşılaştırma için kullanılan türler; *Aquifex aeolicus* strain VF5 (GenBank:NR_114796.1) (Deckert et al., 1998), *Thermotoga maritima* strain SL7 (GenBank: AJ401017.1) (Nesbo et al., 2001), *Flavobacterium psychrophilum* strain IFO 15942 (GenBank: NR_040914.1) (Nakagawa et al., 2002), *Synechocystis* sp. strain PCC6803 (GenBank: NR_074311.1) (Kaneko et al., 1996), *Prochlorococcus* sp. MIT9215 (GenBank: AF115271.1) (Rocap et al., 1999), *Calothrix desertica* strain PCC 7102 (NR_114995.1) (Sihvonen et al., 2007), *Ectothiorhodospira halochloris* GenBank: M59152.1 (Woese, 1993), *Aquifex aeolicus* strain VF5 (GenBank : NR_114796.1) Deckert et al., 1998), *Pyrodictium occultum* (GenBank: M21087.1)

(Kaine et al., 1989), *Nostoc punctiforme* strain PCC 73102 (NR_074317.1) (Copeland et al., 2015), *Chlamydia pneumoniae* (GenBank: L06108.1) (Gaydos et al., 1993), *Deinococcus radiodurans* strain DSM 20539 (NR_026401.1) (Rainey et al., 1997), *Pyrolobus fumarii* strain 1A (NR_102985.1) (Anderson et al., 2011), *Acidianus infernus* (GenBank: D85505.1) (Kurosawa et al., 1998), *Thermococcus coalescens* (GenBank: AB107767.1) (Kuwabara et al., 2005), *Aquifex pyrophilus* strain Kol5a (GenBank: NR_029172.1) (Burggraf et al., 1992), *Chloroflexus aurantiacus* strain J-10-fl (GenBank: NR_074263.1) (Copeland et al., 2014), *Lactobacillus plantarum* strain JCM 1149 (GenBank: NR_115605.1) (Martinez-Murcia and Collins, 2014), *Listeria monocytogenes* (GenBank: M58822.1) (Woese et al., 1993), *Francisella tularensis* subsp. *novicida* strain CIP 56.12 (GenBank: NR_043278.1) (Hsieh et al., 2006), *Halomonas salaria* tip strain M27^T (GenBank: AM229316.1) (Kim et al., 2007), *Halomonas elongata* strain 1H9 (GenBank: NR_074782.1) (Schwibbert et al., 2011), *Halomonas janggokensis* strain M24' (GenBank: NR_042489.1) (Kim et al., 2007), *Salinivibrio* sp. FAM 10 clone 2 (GenBank: JN381954.1) (Lee et al., 2012), *Bacillus hwajinpoensis* strain SW-72 (GenBank: NR_025264.1) (Yoon et al., 2004), *Bacillus baekryungensis* (GenBank: AF541965.1) (Yoon et al., 2004), *Virgibacillus* sp. B1-21 (GenBank: EU435360.1) (Essghaier et al., 2009), *Bacillus* sp. HZ03 (GenBank: AY690704.1) (Choi et al., 2004), *Kocuria* sp. ZS2-6 (GenBank: FJ889675.1) (Yu et al., 2010), *Pantoea agglomerans* strain KB38 (GenBank: JF327464.1) (Pesciaroli et al., 2012), *Halomonas* sp. TB216 (GenBank: EU308361.1) (Tsiamis et al., 2008), *Oceanobacillus kimchii* strain X50 (GenBank: NR_117544.1) (Whon et al., 2010), *Haloferax* sp. MA10 (GenBank: HQ908091.1) (Tekin, 2008; Tekin et al., 2012), NCBI Gen Bankası veri tabanından alınmıştır. *Bacillus* sp. CT-3 (GenBank: KP238664), *Bacillus* sp. CT-4 (GenBank: KP238665), *Virgibacillus* sp. CT-5 (GenBank: KP238666), *Kocuria* sp. CT-6 (GenBank: KP238667), *Pantoea* sp. CS-4 (GenBank: KP238668), *Halomonas* sp. CS-5 (GenBank: KP238669), *Oceanobacillus* sp. HT-9 (GenBank: KP238670), *Salinivibrio* sp. KC-2 (GenBank: KP238671), *Halomonas* sp. KC-101 (GenBank: KP238672) izolatları ise bu çalışmanın sonucunda elde edilmiştir.



Şekil 5.2 16S rRNA gen bölgelerinin Minimum Evolusyon metodu (Rzhetsky and Nei, 1992) ile karşılaştırılması sonucu MEGA6 programında çizilen filogenetik ağaç

5.6 Genel Değerlendirmeler

Bugüne kadar İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan yapılan halofilik bakteri izolasyonlarından karşılaştırılabileceği gibi yapılacak her çalışmada yeni ve farklı tür bulma olasılığının oldukça yüksek olduğu bu çalışmada bir kez daha görülmüştür. Aynı bölgenin farklı zamanlarda birden fazla çalışılmasına rağmen önceki çalışmalarda elde edilen türlerden oldukça farklı türler elde edilmiş olduğu görülmektedir.

İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan ilk defa *Kocuria*, *Pantoea*, *Virgibacillus* cinslerine ait suşlar izole edilmiştir. *Halomonas* cinslerine ait ise yeni suşlar elde edilmiştir. Bu da her zaman için yeni tür çıkma olasılığını göstermekte ve daha geniş kapsamlı çalışma yapılmasının her dönem için gerekli olduğunu bu bölgelerin daha önce çalışılmış olmasının sonraki çalışmalarda da tekrar çalışılmasına engel teşkil etmemesi gerektiğini işaret etmektedir. Ayrıca elde edilen bu yeni türlerin ayrı ayrı endüstriyel öneme sahip olması da bölgenin ve çalışmanın önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Bunun dışında Himalaya tuzundan izole edilen *Oceanobacillus* sp. HT-9 suşunun da ilk defa literatüre bu çalışma ile girdiği görülmektedir. Bunun yanı sıra türlerin hem psikrotolerant, termotolerant, alkalitolerant hem de ılımlı halofilik veya halotolerant özellikte olmaları ile aynı zamanda dünya çapında çok yeni bir kavram olan Poliektremofilik bakterilere benzer özellikte ancak Poliektremotolerant karakterde oldukları yani çoklu ekstrem koşulları tolere edebilenler olarak öne sürülmektedir. Bu sayede dünya çapında çok yeni bir kavram olarak öne sürülen Poliektremotolerant bakteriler ülkemizde ilk defa bu çalışmada ortaya konmaktadır. Poliektremotolerant bakterilerin soğukta aktif amilaz, DNaz ve proteaz enzimi üretme yeteneklerinin endüstriyel açıdan değerli olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Poliektremotolerant karakterleriyle ekstrem koşullara oldukça adapte olmuş türler olarak genom araştırmalarıyla çalışılması eşsiz bilimsel sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir. Antibiyotik direnç genlerine sahip olmaları genom çalışmalarıyla bu genlerin aydınlatılmasının da insan sağlığı açısından önemli katkılar sunacağı düşünülmektedir. Çalışmanın diğer bir önemi günümüzün popüler konularından biri olan Astrobiyoloji çalışmalarında

kullanılma potansiyellerinin olmasıdır. Ayrıca Aksöz ve Kolankaya (1984) tarafından da ortaya konduğu gibi ülkemizde en büyük tuz üretim sahalarından biri olan ve organik kirleticilerle kirlenmiş Tuz Gölü'nde organik kirleticilerin uzaklaştırılmasında da kullanılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmanın amacı olan potansiyel ektoin üretici türlerin tespit edilmesi için Ektoin biyosentezinden sorumlu genlerden iki tanesini içerecek şekilde bu çalışmada tasarlanan spesifik primerler kullanılarak *ectBC* gen bölgesinin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Buna göre *Kocuria* sp. CT-5, *Halomonas* sp. CS-5 ve *Oceanobacillus* sp. HT-9'un (*ectBC*) gen bölgesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ektoin spesifik gen bölgesinin araştırılması sırasında tasarlanan primerler sadece *ectC* yani ektoin sentaz bölgesini değil *ectB* bölgesini (diamino bütirik asit aminotransferaz) de içerecek şekilde dizayn edilmiştir. Bu sayede iki bölgenin birden kısmi olarak araştırılmasına imkan sağlanmıştır. Yaklaşık 2000 bp'lık bir bölgenin çoğaltılmış olması ile bölgenin uzun olması nedeniyle gradient PCR'da elde edilen bantların oldukça silik olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan değişik sıcaklıkların bant yoğunluğuna etkisinin olmadığı da gözlenmiştir (Şekil 4.105, Şekil 4.106, Şekil 4.107). Bu nedenle çoğaltılan bölgenin agaroz jel elektroforezine normalde 5 µl yüklenirken 12'ser µl ve 50'ser µl tekrar yüklenmesiyle bantların belirgin hale gelmesi sağlanmıştır (Şekil 4.108, Şekil 4.109, Şekil 4.110). Sonraki çalışmalarda bu çalışmada tanısı gerçekleştirilen suşlarla ve bu suşların özelliklerinin kullanılarak ektoin üretim potansiyellerinin endüstriyel uygulamalar için artırılması çalışmalarının yapılması hedeflenmektedir.

Ektoin sentaz genleri, promotorları, hangi stres koşullarında üretildikleri, ektoin transportörleri, ektoin transportör mutantları ile ilgili bilgiler literatürde her geçen gün artmaktadır. Mikrobiyal çeşitliliğin oldukça fazla olması, Horizontal Gen Transferi ile gen geçişleri ve bugün bilinen mikrobiyal çeşitliliğin dünya üzerindeki popülasyonun ancak % 1'ini oluşturması nedeniyle tuzcul ortamda yaşayan ve henüz keşfedilmemiş türler olma olasılığı nedeniyle yeni mikroorganizmaların keşfi ve yeni bilgiler edinme imkanı sunması açısından ve tuza adaptasyon mekanizmalarının aydınlatılarak insan sağlığı, tarım,

biyoteknoloji gibi alanlarda kullanım potansiyellerinin değerlendirilmesi açısından bu çalışmanın büyük önem taşıdığı düşünülmektedir.

Bu alışma gerek insan sağlığına olan faydaları nedeniyle gerekse yaşam bilimleri çalışmalarında kullanım potansiyelleri nedeniyle ektoin gibi insan sağlığına son derece faydalı molekln çalışılması bakımından ülkemizde yapılan ilk tez çalışmasıdır. Çalışmanın diğer olumlu yanları lkemiz Poliektremotolerant mikroorganizma çeşitliliğine katkıda bulunulması, halk sağlığı açısından son derece önemli olan bu molekln ülkemizde de değerlendirilmesi, kullanılması, kullanımının yaygınlaştırılması ve değişik hastalıkların tedavisi üzerine etkilerinin değerlendirilebilmesi için bir giriş niteliğindedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aksöz N., ve Kolankaya N.,** 1984, Ilımlı tuzcul karakterli bir bakterinin Tuz Gölü'nden (Türkiye) izolasyonu, *Mikrobiyol Bült*, 18: 107-113s.
- Albayrak, G.,** 2010, Halofilik *Arkea* ve *Bakteria* identifikasyonunda FT-IR (Fourier Transform-Infrared Spektroskopisi Kullanımı), Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 95s.
- Ali, M., Emch M., Donnay J. P., Yunus M., and Sack R. B.,** 2002, The spatial epidemiology of cholera in an endemic area of Bangladesh, *Soc Sci Med.*, 55:1015–1024pp.
- Anderson, I., Goker, M., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J. F., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Huntemann, M., Liolios, K., Ivanova, N., Pagani, I., Mavromatis, K., Ovchinnikova, G., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Brambilla, E. M., Huber, H., Yasawong M., Rohde, M., Spring, S., Abt, B., Sikorski, J., Wirth, R., Detter, J. C., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., and Lapidus, A.,** 2011, Complete genome sequence of the hyperthermophilic chemolithoautotroph *Pyrolobus fumarii* type strain 1A, *Stand Genomic Sci.*, 4(3):381-392p.
- Andersson, M. M., Breccia, J. D., and Hatti-Kaul, R.,** 2000, Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase, *Biotechnol Appl Biochem.*, 32:145–53pp.
- Arahal, D. R., Marquez, M. C., Volcani, B. E., Schleifer, K. H., and Ventosa, A.,** 1999, *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea, *Int J Syst Bacteriol.*, 49: 521–530pp.
- Arakawa, T., and Timasheff, S. N.,** 1985, The stabilization of proteins by osmolytes, *Biophys J.*, 47: 411-414pp.
- Arda, M.,** 2006, Temel Mikrobiyoloji, *Medisan*, Isparta, 45:1-548s.
- Arora, A., Ha, C., and Park, C. B.,** 2004, Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules, *FEBS Lett.*, 564:121–5pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ausubel, F. M.**, 1984, Regulation of nitrogen fixation genes, *Cell*, 37(1):5-6pp.
- Baliarda, A., Robert, H., Jebbar, M., Blanco, C., Deschamps, A., and Le Marrec, C.**, 2003, Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*, *Int J Food Microbiol.*, 84:13–20pp.
- Baross, J.**, 2007, The Limits of Organic Life in Planetary Systems, The National Academy Press, Washington D.C., 116pp.
- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E. A., and Engert, A.**, 2000, Compatible-solutesupported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions, *Appl Environ Microbiol.*, 66:1572–9pp.
- Berrada I., Willems A., De Vos P., El fahime E., Swings J., Bendaou N., Melloul M., and Amar M.**, 2012, Diversity of culturable moderately halophilic and halotolerant bacteria in a marsh and two salterns a protected ecosystem of Lower Loukkos (Morocco), *Afr J Microbiol Res.*, 6(10):2419-2434pp.
- Beyer N., Driller H., and Bunger J.**, 2000, Ectoine, an innovative, multifunctional, active substance for the cosmetic industry, *SOWF J.*, 126:26–9pp.
- Bordo D., Van Monfort R. L., Pijning T., Kalk K. H., Reizer J., Saier M. H. Jr, and Dijkstra B. W.**, 1998, The three-dimensional structure of the nitrogen regulatory protein IIA^{Ntr} from *Escherichia coli*, *J Mol Biol.* 279(1):245-55pp.
- Botta C., Di Giorgio C., Sabatier A. S., and De Meo M.**, 2008, Genotoxicity of visible light (400–800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens, *J Photochem Photobiol.*, 91:24–34pp.
- Bowers, K. J., and Wiegel, J.**, 2011, Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review, *Extremophiles*, 15, 119–128 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bowers, K. J., Mesbah. N. M.. and Wiegel, J.,** 2009, Biodiversity of poly-extremophilic *Bacteria*: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life?, *Saline Syst.*, 5:9 pp.
- Brenner D. J., Krieg N. R., and Staley J. T.,** 2005, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition, Volume Two The *Proteobacteria* Part B The *Gammaproteobacteria*, Springer, 1136pp.
- Brooker D. C., Lund M. E., and Blazevic D. J.,** 1973, Rapid Test for Lysine Decarboxylase Activity in *Enterobacteriaceae*, *J Appl Microbiol*, 26(4): 622-623pp.
- Brown, A. D.,** 1976, Microbial water stress. *Bacteriol Rev.*, 40(4): 803–846pp.
- Buenger J., and Driller H.,** 2004, Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging, *Skin Pharmacol Physiol.*, 17:232–7pp.
- Bunger J.,** 1999, Ectoine added protection and care for the skin, *Eur Cosmet.*, 7:22–4pp.
- Buommino E., Schiraldi C., Baroni A., Paoletti I., Lamberti M., De Rosa M., et al.** 2005, Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response, *Cell Stress Chaperones*, 10(3):197-03pp.
- Burggraf S., Olsen G. J., Stetter K. O. and Woese C. R.,** 1992, A phylogenetic analysis of *Aquifex pyrophilus*, *Syst Appl Microbiol.*, 15(3), 352-356pp.
- Calderón M. I., Vargas C., Rojo F., Iglesias-Guerra F., Csonka L. N., Ventosa A., and Nieto J. J.,** 2004, Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T, *Microbiology*, 150(Pt 9):3051-63pp.
- Canganella, F. and Wiegel, J.,** 2011, Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond, *Naturwissenschaften* 98: 253–279 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Caton, T. M., Witte, L. R., Ngyuen, H. D., Buchheim, J. A., Buchheim, M. A. and Schneegurt, M. A.,** 2004, Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the great salt plains of Oklahoma, *Microbial Ecol.*, 48: 449–462pp.
- Ceylan, S., Yilan, G., Akbulut, B. S., Poli, A., and Kazan, D.,** 2012, Interplay of adaptive capabilities of *Halomonas* sp. AAD12 under salt stress, *J Biosci Bioeng.*, 114(1):45-52pp.
- Choi, G. G., Park, S. H., and Lee G. H.,** 2004, The diversity of halotolerant heterotrophic bacteria isolated from rhizosphere soil of salt marshes from southwestern coasts in Korea GenBank no. GenBank no. AY690699.1
- Choi, G. G., Park, S. H., and Lee, G. H.,** 2004, The diversity of halotolerant heterotrophic bacteria isolated from rhizosphere soil of salt marshes from southwestern coasts in Korea. NCBI Database, GenBank no. AY690704.1
- Christian, J. H. B., and Waltho, J. A.,** 1962, Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria, *Biochim Biophys Acta*, 65(3): 506-508pp.
- Cojoc, R., Merciu, S., Popescu, G., Dumitru, L., Kamekura, M., and Enache, M.,** 2009, Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal, *Rom Biotechnol Lett.*, 14, 4658-4664pp.
- Colwell, R. R., Litchfield, C. D., Vreeland, R. H., Kiefer, L. A., Gibbons, and N. E.,** 1979, Taxonomic studies of red halophilic bacteria, *Int J Syst Bacteriol.*, 29:379-399pp.
- Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Glavina del Rio, T., Hammon, N., Israni, S., Dalin, E., Tice, H., Pitluck, S., Chertkov, O., Brettin, T., Bruce, D., Detter, J.C., Han, C., Schmutz, J., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Kyrpides, N., Mikhailova, N., Pierson, B. K., Blankenship, R. E., and Richardson, P.,** 2014, US DOE Joint Genome Institute, Complete sequence of *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl. (GenBank: NR_074263.1).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Glavina Del Rio, T., Dalin, E., Tice, H., Pitluck, S., Chain, P., Malfatti, S., Shin, M., Vergez, L., Schmutz, J., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Kyrpides, N., Kim, E., Meeks, J.C., Elhai, J., Campbell, E. L., Thiel, T., Longmire, J., Potts, M., and Atlas, R., 2015, US DOE Joint Genome Institute, 2800, Mitchell Drive B100, Walnut Creek, CA 94598-1698, USA, *Nostoc punctiforme* strain PCC 73102 (NR_074317.1).
- Cruz, P. E., Silva, A. C., Roldao, A., Carmo, M., Carrondo, M. J. T., and Alves, P. M., 2006, Screening of novel excipients for improving the stability of retroviral and adenoviral vectors, *Biotechnol Prog.*, 22:568–76pp.
- Çetinkuş, K., 2007, Çamaltı Tuzlası Halofilik mikroorganizmalarının izolasyonu ve karakterizasyonu, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 109 s.
- Dartnell, L., 2011, Biological constraints on habitability, *Astron Geophys.*, 52: 1.25–1.28 pp.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., and Whitman, W. B., 2009, The *Firmicutes*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume Three, Springer-Verlag, New York, 1450pp.
- Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T., Young, W. G., Lenox, A. L., Graham, D. E., Overbeek, R., Snead, M. A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R. A., Short, J. M., Olsen, G. J., and Swanson, R. V., 1998, The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*, *Nature*, 392 (6674), 353-358pp.
- Demirci, A., 2009, Afyonkarahisar tekstil boyar maddelerin giderilmesinde halofilik bakterilerin kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon, 238s.
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., and Goloubinoff, P., 2001, Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses, *Biol Chem.*, 276(43):39586–39591pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dobson, S. J., and Franzmann, P. D.,** 1996, Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*, *Int J Syst Bacteriol.*, 46: 550–558pp.
- Ederer, G. M., Chu, J. H., and Blazevic, D. J.,** 1971, Rapid test for urease and phenylalanine deaminase production, *Appl Microbiol.*, 21(3): 545p.
- Essghaier, B., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Hajlaoui, M. R., Boudabous, A., Jijakli, H., and Sadfi-Zouaoui, N,** 2009, Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria, *Appl Microbiol.*, 106:833–846pp.
- Fallet, C., Rohe, P., and Franco-Lara, E.,** 2010, Process optimization of the integrated synthesis and secretion of ectoine and hydroxyectoine under hyper/hypo osmotic stress, *Biotechnol Bioeng*; 107:124–33pp.
- Fay G. D., and Barry A. L.,** 1972, Rapid Ornithine Decarboxylase Test for the Identification of *Enterobacteriaceae*, *Appl Microbiol*, 23(4): 710-713pp.
- Felsenstein, J.,** 1985, Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution*, 39:783-791pp.
- Franzmann, P. D., Wehmeyer, U., and Stackebrandt, E.,** 1989, *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*, *Syst Appl Microbiol.*, 11 :16-19pp.
- Frings, E., Sauer, T., and Galinski, E. A.,** 1995, Production of hydroxyectoine-high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52, *J Biotechnol*, 43:53-1pp.
- Furusho, K., Yoshizawa, T., and Shoji, S.,** 2005, Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado–Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch, *Neurobiol Dis*, 20:170–8pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Galinski, E. A., Pfeiffer, H. P., and Trüper, H. G.,** 1985, 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4- pyrimidine carboxylic acid a novel cyclic amino-acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*, *Eur J Biochem.*, 149, 135–139pp.
- Gavini, F., Mergaert, J., Bej, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters K., and De Ley J.,** 1989, Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov., *Int J Syst Evol Microbiol*, 39(3):337-345pp.
- Gaydos, C. A., Palmer, L., Quinn, T. C., Falkow, S., and Eiden, J. J.,** 1993, Phylogenetic relationship of *Chlamydia pneumoniae* to *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* as determined by analysis of 16S ribosomal DNA sequences, *Int J Syst Bacteriol.*, 43 (3), 610-612pp.
- Gibbons, N. E.,** 1969, Chapter VIII: Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria, *Method Microbiol.*, Part B, 3:169-183pp.
- Goldschmidt, M. C., and Lockhart, B. M.,** 1971, Rapid methods for determining decarboxylase activity: arginine decarboxylase, *Appl Microbiol.*, 22(3): 350–357pp.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M. E., Suzuki, K-I, Ludwig, W., and Whitman, W. B.,** 2012, The *Actinobacteria*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Five, Part A, *Springer*, 2105pp.
- Göller, K., Ofer, A., and Galinski, E. A.,** 1998, Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis, *FEMS Microbiol Lett.*, 161:293–300pp.
- Graf, R., Anzali, S., Buenger, J., Pfluecker, F., and Driller, H.,** 2008, The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant, *Clin Dermatol.*, 26:326–33pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grammann, K., Volke, A., and Kunte, H. J.,** 2002, New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T, *J Bacteriol.*, 184:3078–3085pp.
- Guzman, H., Van-Thuoc, D., Martin, J., Hatti-Kaul, R., Quillaguaman, J.,** 2009, A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 84:1069-77pp.
- Han, W. Q., and Webster, P. J.,** 2002, Forcing mechanisms of sea level interannual variability in the Bay of Bengal, *J. Phys Oceanogr.*, 32:216–239pp.
- Harjes, S., Scheidig, A., and Bayer, P.,** 2004, Expression, purification and crystallization of human 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synthetase, *Acta Crystallogr*, 60: 350–2pp.
- Harrison, J. P., Gheeraert, N., Tsigelnitskiy, D., and Cockell C. S.,** 2013, The limits for life under multiple extremes, *Trends Microbiol.*, 21(4):205-212pp.
- Heinrich, U., Garbe, B., and Tronnier, H.,** 2007, In vivo assessment of ectoin: a randomized, vehicle controlled clinical trial, *Skin Pharmacol Physiol*, 20:211–8pp.
- Horneck, G., et al.,** 2010, Space microbiology, *Microbiol Mol Biol Rev.*, 74: 121–156pp.
- Hsieh, C. Y., Tung, M. C., Tu, C., Chang, C. D., and Tsai, S. S.,** 2006, Enzootics of visceral granulomas associated with *Francisella*-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.), *Aquaculture* 254 (1-4), 129-138pp.
- <http://bitop.de/cms/website.php?id=/de/index/startseite.htm>** (Erişim tarihi 20.11.2014)
- Hu, R. M., Yang, T. C., Yang, S. H., and Tseng, Y. H.,** 2005, Deduction of upstream sequences of *Xanthomonas campestris* flagellar genes responding to transcription activation by FleQ, *Biochem Biophys Res Commun*, 335(4):1035-43pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huang, C. Y., Garcia, J. L., Patel, B. K. C., Cayol, J. L., Baresi, L., and Mah, R. A.,** 2000, *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis* subsp. nov., a halotolerant facultative anaerobe from Death Valley, and emended description of *Salinivibrio costicola*, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 50:615-622pp.
- Huang, X., and Miller, W.,** 1991, A time-efficient linear-space local similarity algorithm, *Adv Appl Math.*, 12:337-357pp.
- Huq, A., West, P. A., Small, E. B., Huq, M. I., and Colwell, R. R.,** 1984, Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar 01 associated with live copepods in laboratory microcosms, *Appl Environ Microbiol.*, 48:420–424pp.
- Inbar, L., and Lapidot, A.,** 1988, Metabolic regulation in *Streptomyces parvulus* during actinomycin D synthesis, studied with ¹³C- and ¹⁵N-labeled precursors by ¹³C and ¹⁵N nuclear magnetic resonance spectroscopy and by gas chromatography-mass spectrometry, *J Bacteriol.*, 170(9):4055–4064pp.
- Jebbar, M., Sohn-Bösser, L., Bremer, E., Bernard, T., and Blanco, C.,** 2005, Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism, *J Bacteriol.*, 187(4): 1293–1304pp.
- Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T., and Blanco, C.,** 1992, Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics, *J Bacteriol.* 174: 5027-5035pp.
- Kaine, B. P., Schurke, C., and Stetter, K. O.,** 1989, Genes for the 16S and 5S ribosomal RNAs and the 7S RNA of *Pyrodictium occultum*, *Syst Appl Microbiol.*, 12, 8-14pp.
- Kamble, K. D, and Kadu, S. S.,** 2012, Enhancement of DNase production from a moderate halophilic bacterium and studies on its phylogeny, *Int J Environ Sci.*, 3(3):1031-1037pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kanapathipillai, M., Lentzen, G., Sierks, M., and Park, C. B.,** 2005, Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid, *FEBS Lett.*, 579: 4775–80pp.
- Kanapathipillai, M., Ku, S. H., Girigoswami, K., and Park, C. B.,** 2008, Small stres molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106–126, *Biochem Bioph Res Co*, 365:808–813pp.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S.,** 1996, Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions, *DNA Res.*, 3 (3):109-136pp.
- Kazak Sarilmiser, H., Ates, O., Ozdemir, G., Arga, K. Y., and Toksoy Oner, E.,** 2014, Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6^T, *J Biosci Bioen.*, (in press). doi:10.1016/j.jbiosc.2014.09.019
- Kazak Sarilmiser, H., and Toksoy Oner, E.,** 2014, Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6^T, *Biochem Eng J.*, 92:28–34pp.
- Kim, K. K., Jin, L., Yang, H. C., and Lee, S. T.,** 2007, *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 57:675–681pp.
- Kim, S. B., Nedashkovskaya, O. I., Mikhailov, V. V., Han S. K., Kim K. O., Rhee M. S., and Bae K. S.,** 2004, *Kocuria marina* sp. nov., a novel Actinobacterium isolated from marine sediment, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 54: 1617–1620pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kolp, S., Pietsch, M., Galinski, E. A., and Gutschow, M.,** 2006, Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis, *Biochim Biophys Acta*, 1764:1234–42p.
- Koru, E.,** 2004, Artemia and its importance in the ecosystem of Çamaltı Saltern (Izmir, Turkey), *EU J Fish Aquat Sci.*, 21:187-189pp.
- Kovacs, G., Burghardt, J., Pradella, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., and Marialigetti, K.,** 1999, *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*), *Int J Syst Bacteriol.*, 49: 167–173pp.
- Kovács, N.,** 1956, Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction, *Nature* (London), 178:703–704pp.
- Kraegeloh, A., and Kunte, H. J.,** 2002, Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*, *Extremophiles*, 6:453-462pp.
- Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R., Kumar, and Gupta V.,** 2012, Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions, *Arch Appl Sci Res.*, 4 (4):1763-1770pp.
- Kunte, H. J.,** 2006, Osmoregulation in bacteria: compatible solute accumulation and osmosensing, *Environ Chem.*, 3:94–99pp.
- Kunte, H. J., Lentzen, G., and Galinski, E. A.,** 2014, Industrial Production of the Cell Protectant Ectoine: Protection Mechanisms, Processes, and Products, *Curr Biotechnol.*, 3:10-25pp.
- Kurosawa, N., Itoh, Y. H., Iwai, T., Sugai, A., Uda, I., Kimura, N., Horiuchi, T., and Itoh, T.,** 1998, *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic acidophile of the order *Sulfolobales*, *Int J Syst Bacteriol.*, 48 (PT 2):451-456pp.
- Kushner, D. J., and Kamekura, M.,** 1988, Physiology of halophilic eubacteria, In: *Halophilic Bacteria*, F. Rodriguez-Valera, Ed., CRC, Boca Raton, 1:87-103pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kuwabara, T., Minaba, M., Iwayama, Y., Inouye, I., Nakashima, M., Marumo, K., Maruyama, A., Sugai, A., Itoh, T., Ishibashi, J., Urabe, T., and Kamekura, M.,** 2005, *Thermococcus coalescens* sp. nov., a cell-fusing hyperthermophilic archaeon from Suiyo Seamount, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 55 (PT 6):2507-2514pp.
- Lamosa, P., Burke, A., Peist, R., Huber, R., Liu, M.-Y., Silva, G., Rodrigues-Pousada, C., LeGall, J., Maycock, C., and Santos, H.,** 2000, Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*, *Appl Environ Microbiol.*, 66:1974–1979pp.
- Lapidot, A., Ben-Asher, E., and Eisenstein, M.,** 1995, Tetrahydropyrimidine Derivatives Inhibit Binding of a Tat-Like, Arginine-Containing Peptide, to HIV TAR RNA in Vitro, *FEBS Lett.*, 367, 33–38pp.
- Lapidot, A., Iakobashvili, R., Malin, G.; Yeda, Res & Dev Co Ltd (Yeda) Yeda Res&Dev Co Ltd (Yeda), assignee.,** 1999, Performing nucleic acid extension reaction in presence of osmoprotectant, e.g.proline, particularly for sequencing and amplification—increases stability of polymerase and reducesmelting temperature of template orprimer. Patent WO9941410-A; EP1053350-A; WO9941410-A1; EP1053350-A1; JP2002503482-W; US6428986-B1; IL137725-A; US7150980-B1; US2007212760-A1; US7387878-B2; EP1053350-B1; DE69940662-E; ES2323561-T3; JP4393700-B2.
- Larsen, H.,** 1967, Biochemical aspects of extreme halophilism, *Adv Microb Physiol.*, 1:97-132pp.
- Lee, J. H.,** 2012, Isolation and genetic characterization of protease-producing halophilic bacteria from fermenting anchovy, *J Life Sci.*, 22(2):167-176pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lee, J. S., Lim, J. M., Lee, K. C., Lee, J. C., Park, Y. H., and Kim, C. J.,** 2006, *Virgibacillus koreensis* sp. nov., a novel bacterium from a salt field, and transfer of *Virgibacillus picturae* to the genus *Oceanobacillus* as *Oceanobacillus picturae* comb. nov. with emended descriptions, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 56: 251–257pp.
- Lee, S. J., and Gralla, J. D.,** 2004, Osmo-regulation of bacterial transcription via poised RNA polymerase, *Mol Cell.*, 14(2):153-62pp.
- LeFevre, E., and Round, L. A.,** 1919, A preliminary report upon some halophilic bacteria, *J Bacteriol.*, 4:177-182pp.
- Lentzen, G., and Schwarz, T.,** 2006, Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 72:623–634pp.
- Lippert, K., and Galinski, E. A.,** 1992, Enzyme Stabilization by Ectoine-Type Compatible Solutes: Protection Against Heating, Freezing and Drying, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 37:61–65pp.
- Liss, I.,** 1962, *Phytochemistry*, 1:87-88pp.
- Lobitz, B., Beck, L., Huq, A., Wood, B., Fuchs, G., Faruque, A. S. G., and Colwell, R.,** 2000, Climate and infectious disease: use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement, *Proc Natl Acad Sci.*, 97:1438–1443pp.
- Louis, P., Trüper, H. G., and Galinski, E. A.,** 1994, Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 41: 684–8pp.
- Lu, J., Nogi, Y., and Takami, H.,** 2001, *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge, *FEMS Microbiol Lett.*, 205(2): 291–297pp.
- Madigan, M. T., and Martinko, J. M.,** 2005, *Brooks Biology of Microorganisms*, Lebanon, Indiana, U.S.A. Pren; 11th edition, 1088pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Malin, G., and Lapidot, A.,** 1996, Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces*, *J Bacteriol.*, 178:385–95pp.
- Manzanera, M., de Castro, A. G., Tondervik, A., Rayner-Brandes, M., Strom, A. R., and Tunnacliffe, A.,** 2002, Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440, *Appl Environ Microbiol.*, 68:4328–33pp.
- Manzanera, M., Vilchez, S, and Tunnacliffe, A.,** 2004, High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine, *FEMS Microbiol Lett.*, 233:347–52pp.
- Margesin, R., and Schinner, F.,** 2001, Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology, *Extremophiles*, 5:73–83pp.
- Marin-Sanguino, A., Torres, N. V., Mendoza, E. R., and Oesterhelt, D.,** 2009, Metabolic Engineering with power-law and linear-logarithmic systems, *Math Biosci.*, 218(1):50-8pp.
- Martinez-Murcia, A. J., and Collins, M. D.,** 2014, *Lactobacillus plantarum* strain JCM 1149 (GenBank: NR_115605.1).
- Mascellani, N. , Liu, X., Rossi, S., Marchesini, J., Valentini, D., Arcelli, D., et al.,** 2007, Compatible solutes from hyperthermophiles improve the quality of DNA microarrays, *BMC Biotechnol.*, 7:82pp.
- Maskow, T., and Kleinsteuber, S.,** 2004, Carbon and energy fluxes during haloadaptation of *Halomonas* sp. EF11 growing on phenol, *Extremophiles*, 8:133–41pp.
- Mata, J. A., Martinez-Canovas, J., Quesada, E., and Bejar, V.,** 2002, a detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species system, *Appl Microbiol.*, 25:360–375pp.
- Matheson, A. T., Sprott, G. D., McDonald, I. J., and Teseier, H.,** 1976, Some properties of an unidentified halophile; growth characteristics, internal salt concentration, and morphology, *Can J Microbiol.*, 22:780-786pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mellado, E., Moore, E. R. B., Nieto, J. J., and Ventosa, A.,** 1996, Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: description of *Salinivibrio costicola* gen. nov., comb. nov., *Int J Syst Bacteriol.*, 46: 817–821pp.
- Mesbah, N. M. and Wiegel, J.,** 2008, Life at extreme limits: the anaerobic halophilic alkalithermophiles, *Ann N Y Acad Sci.*, 1125, 44–57pp.
- Mesbah, N. M. and Wiegel, J.,** 2012, Life under multiple extreme conditions: diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles, *Appl Environ Microbiol.*, 78, 4074–4082pp.
- Moghaieb, R. E. A., Tanaka, N., Saneoka, H., Murooka, Y., Ono, H., Morikawa, H., Nakamura, A., Nguyen, N.T., Suwa, R., and Fujita, K.,** 2006, Characterization of salt tolerance in ectoine-transformed tobacco plants (*Nicotiana tabaccum*): photosynthesis, osmotic adjustment, and nitrogen partitioning, *Plant Cell Environ*, 29:173–82pp.
- Motitschke, L., Hansjurgen D., Galinski, E., Merck Patent GmbH (DE), assignee.,** 2000, Ectoin and ectoin derivatives as moisturizers in cosmetics, United States.
- Mulligan, C., Kelly, D. J., and Thomas, G. H.,** 2007, Tripartite ATP-Independent Periplasmic Transporters: Application of a Relational Database for Genome-Wide Analysis of Transporter Gene Frequency and Organization, *J Mol Microbiol Biotechnol*, 12: 218–226pp.
- Nakagawa, Y., Sakane, T., Suzuki, M., and Hatano, K.,** 2002, Phylogenetic structure of the genera *Flexibacter*, *Flexithrix*, and *Microscilla* deduced from 16S rRNA sequence analysis, *J Gen Appl Microbiol.*, 48(3):155-165pp.
- Nakayama, H., Yoshida, K., Ono, H., Murooka, Y., and Shinmyo, A.,** 2000, Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells, *Plant Physiol.*, 122:1239-1248pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nalbantoglu, O. U., and Sayood, K.,** 2011, Computational genomic signatures, *Synthesis Lectures Biomed Eng*, 6(2):1-129pp.
- Nei, M., and Kumar, S.,** 2000, Molecular Evolution and Phylogenetics, Oxford University Press, New York, 333pp.
- Nesbo, C. L., L'Haridon, S., Stetter, K. O., and Doolittle, W. F.,** 2001, Phylogenetic analyses of two 'archaeal' genes in *Thermotoga maritima* reveal multiple transfers between archaea and bacteria, *Mol Biol Evol.*,18(3):362-375pp.
- Nieto, J. J., Fernandez-Castillo, R., Marquez, M. C., Ventosa, A., Quesada, E., and Ruiz-Berraquero, F.,** 1989, Survey of Metal Tolerance in Moderately Halophilic Eubacteria, *Appl Environ Microbiol.*, 55:2385-2390pp.
- Nyysola, A., Kerovuo, J., Kaukinen, P., Von Weymarn, N., and Reinikainen, T.,** 2000, Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation, *J Biol Chem*, 275:22196–22201pp.
- Ono, H., Sawada, K., Khunajakr, N., Tao T., Yamamoto, M., Hiramoto, M., Shinmyo, A., Takano, M., and Murooka, Y.,** 1999, Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*, *J Bacteriol*, 181(1):91-99pp.
- Onraedt, A. E., Walcarius, B. A., Soetaert, W. K., and Vandamme, E. J.,** 2005, Optimization of ectoine synthesis through fed-batch fermentation of *Brevibacterium epidermis*, *Biotechnol Progr.*, 21:1206–12pp.
- Oren, A.,** 2002, Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications, *J Ind Microbiol Biot.*, 28:56–63pp.
- Pabba, S. K., Samatha, B., Prasad, M. R., Nidadavolu, S. H., and Singara Charya, M. A.,** 2011, FAME fingerprints for identification of marine red pigmented bacteria isolated from Nellore Costal Region of Andhra Pradesh, *JRAAS*, 26:37-42pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Padan E., Venturi M., Gerchman Y., and Dover N.,** 2001, Na⁺/H⁺ antiporters, *Biochim Biophys Acta*, 1505:144-157pp.
- Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., Iborra, J. L., Vargas, C., Nieto, J. J., and Cánovas, M.,** 2010, Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production, *Biotechnology Advances*, 28:782–801pp.
- Pesciaroli, C., Cupini, F., Selbmann, L., Barghini, P., and Fenice, M.,** 2012, Temperature preferences of bacteria isolated from seawater collected in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia, *Polar Biol.*, 35:435–445pp.
- Pflughoeft, K. J., Kierek, K., and Watnick P. I.,** 2003, Role of ectoine in *Vibrio cholerae* osmoadaptation, *Appl Environ Microbiol.*, 69(10): 5919–5927pp.
- Pikuta, E. V., and Hoover, R. B.,** 2007, Microbial extremophiles at the limits of life, *Crit Rev Microbiol.* 33: 183–209 pp.
- Poli, A., Nicolaus, B., Denizci, A. A., Yavuzturk, B., and Kazan, D.,** 2013, *Halomonas smyrnensis* sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium, *Int J Syst Evol Microbiol*, 63:10–18pp.
- Pul, U., Wurm, R., and Wagner, R.,** 2007, The role of LRP and H-NS in transcription regulation: involvement of synergism, *J Mol Biol.*, 366:900-915pp.
- Rainey, F. A., Nobre, M. F., Schumann, P., Stackebrandt, E., and da Costa, M. S.,** 1997, Phylogenetic diversity of the *Deinococci* as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison, *Int J Syst Bacteriol.*, 47(2):510-514pp.
- Reddy, G. S. N., Prakash, J. S. S., Prabahar, V., Matsumoto, G. I., Stackebrandt E., and Shivaji S.,** 2003, *Kocuria polaris* sp. nov., an orange-pigmented psychrophilic bacterium isolated from an Antarctic cyanobacterial mat sample, *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 183-187pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Regev, R., Peri, I., Gilboa, H., and Avi-Dor, Y.,** 1990, ^{13}C NMR study of the interrelation between synthesis and uptake of compatible solutes in two moderately halophilic eubacteria, bacterium Ba1 and *Vibro costicola*, *Arch Biochem Biophys.*, 278:106-112pp.
- Reichelt, J. L., and Baumann, P.,** 1974, Effect of sodium chloride on growth of heterotrophic marine bacteria, *Arch Microbiol.*, 97:329-345pp.
- Rocap, G. L., Moore, L. R., and Chisholm, S. W.,** 1999, Molecular phylogeny of *Prochlorococcus* ecotypes, In: *Marine Cyanobacteria*, Charpy L., Larkum A.W.D. (Eds.), Monaco, 107-116pp.
- Romano, I., Gambacorta, A., Lama, L., Nicolaus, B., and Giordano, A.,** 2005, *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* subsp. nov., a haloalkaliphilic aerobe from Campania Region (Italy), *Syst Appl Microbiol.*, 28: 34-42pp.
- Romano, I., Lama, L., Nicolaus, B., Poli, A., Gambacorta, A., and Giordano, A.,** 2006, *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis* subsp. nov., an alkalitolerant halophile isolated from an algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy), and emended description of *Oceanobacillus oncorhynchi*, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 56: 805-810pp.
- Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L.,** 2001, Life in extreme environments, *Nature*, 409:1092-1101pp.
- Rzhetsky A., and Nei M.,** 1992, A simple method for estimating and testing minimum evolution trees, *Mol Biol Evol.*, 9:945-967pp.
- Saitou N., and Nei M.,** 1987, The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol Biol Evol.*, 4:406-425pp.
- Sauer T., and Galinski E. A.,** 1998, Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes, *Biotechnol Bioeng.*, 57:306-13pp.
- Schnoor, M., Voss, P., Cullen, P., Boking, T., Galla, H. J., Galinski, E. A., et al.,** 2004, Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR, *Biochem Biophys Res Commun*; 322:867-72pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schubert, T., Maskow, T., Benndorf, D., Harms, H., and Breuer, U., 2007,** Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium, *Appl Environ Microbiol*, 73:3343-7pp.
- Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, I., Heidrich, G., Lentzen, G., Seitz, H., Rampp, M., Schuster, S. C., Klenk, H.-P., Pfeiffer, F., Oesterheld, D., and Kunte, H. J., 2011,** A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T, *Environ Microbiol.*, 13(8):1973-1994pp.
- Sihvonen, L. M., Lyra, C., Fewer, D. P., Rajaniemi-Wacklin, P., Lehtimäki, J. M., Wahlsten, M., and Sivonen, K., 2007,** Strains of the cyanobacterial genera *Calothrix* and *Rivularia* isolated from the Baltic Sea display cryptic diversity and are distantly related to *Gloeotrichia* and *Tolypothrix*, *FEMS Microbiol Ecol.*, 61 (1), 74-84pp.
- Smibert, R. M. and Krieg, N.R., 1994,** Phenotypic characterization. In: Methods for General and Molecular Bacteriology, Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. and Krieg, N. R. (Eds), Washington, DC, 607-655pp.
- Sleator, R. D., and Hill, C., 2001,** Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence, *FEMS Microbiol Rev.*, 26:49-71pp.
- Sogutcu, E., Emrence, Z., Arikan, M., Cakiris, A., Abaci, N., Öner, E. T., Ustek D., and Arga, K. Y., 2012,** Draft genome sequence of *Halomonas smyrnensis* AAD6^T, *J Bacteriol.*, 194(20): 5690-1pp.
- Son, H. J., Park, G. T., Cha, M. S., Heo, M. S., 2006,** Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere, *Bioresour Technol.*, 97:204-210pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kampf, P., Maiden, M.C. J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward A. C., and Whitman W. B., 2002,** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 1043–1047pp.
- Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O., and Schumann, P., 1995,** Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. Emend., *Int J Syst Bacteriol.*, 45: 682–692pp.
- Stan-Lotter, H., 2012,** Physico-chemical boundaries of life, In: Adaptation of Microbial Life to Environmental Extremes, Stan-Lotter, H., Fendrihan, S. (Eds.), Springer-Verlag Wien, 1-19pp.
- Steger, R., Weinand, M., Krämer, R., and Morbach, S., 2004,** LcoP, an osmoregulated betaine/ectoine uptake system from *Corynebacterium glutamicum*. *FEBS Lett.*, 573 (1-3):155-60pp.
- Sydlik, U., Gallitz, I., Albrecht, C., Abel, J., Krutmann, J, and Unfried, K., 2009,** The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic, *Am J Respir Crit Care Med*, 180:29-35pp.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S., 2013,** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0., *Mol Biol Evol.*, 30:2725-2729pp.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S., 2004,** Prospects for inferring very large phylogenies by using the Neighbor-Joining Method, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 101:11030-11035pp.
- Tatar, D., Guven, K., Spröer, C., Klenk, H. P., and Şahin, N., 2014,** *Streptomyces iconiensis* sp. nov. and *Streptomyces smyrnaeus* sp. nov., two halotolerant actinomycetes isolated from a salt lake and saltern, *Int J Syst Evol Microbiol*, 64: 3126–3133pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tekin, E.**, 2008, İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan Poli- β -hidroksibütirat (PHB) üreticisi halofilik mikroorganizmaların izolasyonu, fenotipik karakterizasyonu ve PHB üretim verimliliğinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 122s.
- Tekin, E., Ateş, M., Kahraman, Ö.**, 2012, Poly-3-hydroxybutyrate-producing extreme halophilic archaeon: *Haloferax* sp. MA10 isolated from Çamaltı Saltern, İzmir, *Turk J Biol*, 36(3): 303-312pp.
- Temizkan G., ve Arda N.**, 2008, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 3. baskı, 345s.
- Tsiamis, G., Katsaveli, K., Ntougias, S., Kyripides, N., Andersen, G., Piceno, Y., and Bourtzis, K.**, 2008, Prokaryotic community profiles at different operational stages of a Greek solar saltern, *Res Microbiol.*, 159: 609-627pp.
- Uzyol, K. S.**, 2007, Amylolytic enzyme production from a moderately halophilic bacteria by using agricultural wastes, Yüksek Lisans Tezi, Marmara University, İstanbul, 60s.
- Uzyol, K. S., Sariyer-Akbulut, B., Denizci, A. A., and Kazan, D.**, 2012, Thermostable α -amylase from moderately halophilic *Halomonas* sp. AAD21, *Turk J Biol*, 36: 327-338pp.
- Vargas, C., Argandoña M., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Fernández-Aunión, C., and Nieto, J. J.**, 2008, Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance, *Saline Syst.*, 4(14):1-9pp.
- Ventosa, A., Quesada, E., Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A.**, 1982, Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-negative rods, *J Gen Microbiol.*, 128, 1959–1968pp.
- Vreeland, R. H., Anderson, R., Murray, R. G. E.**, 1984, Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of *Halomonas elongata*, *J Bacteriol.*, 160 (3): 879-883pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Martin, E. L., and Elliot, E.,** 1980, *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria, *Int J Syst Evol Microbiol*, 30: 485–495pp.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J.,** 1991, 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J Bacteriol.*, 173:697–703pp.
- Whon, T. W., Jung, M. J., Roh, S. W., Nam, Y. D., Park, E. J., Shin, K. S., and Bae, J. W.,** 2010, *Oceanobacillus kimchii* sp. nov. isolated from a traditional Korean fermented food, *J Microbiol.*, 48(6):862-866pp.
- Widderich, N., Hoppner, A., Pittelkow, M., Heider, J., Smits, S. H. J., and Bremer, E.,** 2014, Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms, *Plos one*, 9 (4):1-16pp.
- Woese, C. R.,** 1993, Phylogeny of some gamma purple bacteria based upon 16S rRNA, (NCBI GenBank: M59152.1).
- Woese, C. R.,** 1982, *Archaeobacteria* and cellular origins: an overview, *Syst Appl Microbiol.*, 3(1):1-17pp.
- Woese, C. R.,** 1987, Bacterial evolution, *Microbiol rev.*, 51(2):221-271pp.
- Woese, C. R., Yang D., and Kandler O.,** 1993, Phylogenetic analysis of the lactobacilli based upon 16S rRNA, (NCBI GenBank: M58822.1).
- Wohlfarth, A., Severin, J., and Galinski, E. A.,** 1990, The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*, *J Gen Microbiol.*, 136:705–712pp.
- Yavuztürk, B.,** 2005, Ekstremofillerin ülkemiz Çamaltı Tuzlasından izole edilmesi ve tanılanması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 104s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yoon, J. H., Kim, I. G., Kang, K. H., Oh, T-K, and Park, Y. H.,** 2004, *Bacillus hwajinpoensis* sp. nov. and an unnamed *Bacillus genomospecies*, novel members of *Bacillus* rRNA group 6 isolated from sea water of the East Sea and the Yellow Sea in Korea, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 54:803–808pp.
- Yu, I., and Nagaoka, M.,** 2004, Slowdown of water diffusion around protein in aqueous solution with ectoine, *Chem Phys Lett.*, 388 (4-6):316-321pp.
- Yu, Y., Li, H., Zeng, Y., and Chen, B.,** 2010, Phylogenetic diversity of culturable bacteria from Antarctic sandy intertidal sediments, *Polar Biol.*, 33:869–875pp.
- Yumoto, I., Hirota, K., Nodasaka, Y., and Nakajima, K.,** 2005, *Oceanobacillus oncorhynchi* sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile isolated from the skin of a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and emended description of the genus *Oceanobacillus*, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 55: 1521–1524pp.
- Zhang, L. H., Lang, Y. J, and Nagata, S.,** 2009, Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain, *Extremophiles*, 13:717–24pp.
- Zhang, L., Lang, Y., Wang, C., and Nagata, S.,** 2008, Promoting effect of compatible solute ectoine on the ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* CICC10232, *Proc Biochem.*, 43:642–6pp.
- Zhang, L., Wang, Y., Zhang, C., Wang, Y, Zhu, D, Wang, C, et al.,** 2006, Supplementation effect of ectoine on thermostability of phytase, *J Biosci Bioeng.*,102: 560–3pp.

ÖZGEÇMİŞ

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

A1. Lucia Aquilanti, Ozge Kahraman, Emanuele Zannini, Andrea Osimani, Gloria Silvestri, Floriana Ciarrocchi, Cristiana Garofalo, Ebru Tekin, Francesca Clementi, 2012, Response of lactic acid bacteria to milk fortification with dietary zinc salts, *International Dairy Journal*, 25:(1)52-59pp.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler (Poster)

B1. Ebru Tekin, Mustafa Ateş, Umut Şahar. "Determination of Ectoine Production of Halotolerant Bacterial Isolate MA2" *XXI. Uluslararası Katılımlı Biyoloji Kongresi*, 3-7 Eylül 2012, İzmir/Türkiye.

B2. Ebru Tekin, Gökhan Zengin, Arife Candaş Adıgüzel Zengin, Mustafa Ateş, The Application of FAME (Fatty Acid Methyl Ester) Analysis in the Chemotaxonomic Examination of Halophilic Isolates, *XXI. Uluslararası Katılımlı Biyoloji Kongresi*, 3-7 Eylül 2012, İzmir/Türkiye.

B3. Ebru Tekin, Arife Candaş Adıgüzel Zengin, Gökhan Zengin, Mustafa Ateş, Determination of Protease Producing Potentials of Moderately Halophilic and Halotolerant Bacterial Isolates for Leather Industry, *XXI. Uluslararası Katılımlı Biyoloji Kongresi*, 3-7 Eylül 2012, İzmir/Türkiye.

B4. Fethiye Ferda Yılmaz, Zeliha Demirel, Ebru Tekin, Özge Kahraman, Ülkü Karabay-Yavaşoglu, Güven Özdemir, Meltem Conk-Dalay, Antinociceptive Activity and Acute Toxicity of *Oscillatoria amphibia*, *XXI. Uluslararası Katılımlı Biyoloji Kongresi*, 3-7 Eylül 2012, İzmir/Türkiye.

B5. Lucia Aquilanti, Emanuele Zannini, Cristiana Garofalo, Ozge Kahraman, Ebru Tekin, Gloria Silvestri, Alessandra Leoni, Cristiana Chiavari, Luigi Grazia, Francesca Clementi, Zinc Fortified Milk For Functional Dairy Products: The Response of Lactic Acid Bacteria, *US Ireland Functional Foods Conference* Page:23, 9-11 Mart 2010, Cork City/ İrlanda.

B6. Özge Kahraman, Emanuele Zannini, Lucia Aquilanti, Cristiana Garofalo, Gloria Silvestri, Ebru Tekin, Francesca Clementi. Response of Lactic Acid Bacteria To Zinc Salts Usable For Supplementation Of Fermented Milk and Milk-Based Products (Page:28) *VII Convegno AISSA, AGRICOLTURA, QUALITÀ DELL'AMBIENTE E SALUTE*, 2-4 Aralık 2009, Ancona/Italya

C. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

C1. Ebru Tekin, Mustafa Ateş, Özge Kahraman, 2012, Poly-3-hydroxybutyrate-producing extreme halophilic archaeon: *Haloferax* sp. MA10 isolated from Çamaltı Saltern, İzmir, *Turk J Biol*, 36:303-312.

C2. Yasa I., Ö. Kahraman, E.Tekin, A. Kocyiğit, 2008, Çamaltı Tuzlası'ndan Ekstrem Halofilik Archaea İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 25(2):117-121pp.

D. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

D1. Tekin, E., Ateş, M., Kahraman, Ö. “İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan İzole Edilen Ekstrem Halofilik Archaea'dan PHB Üretimi” *XIX. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 114-115s., 23-27 Haziran 2008, Trabzon/Türkiye.

D2. Tekin, E., Ufuktepe Ü. Biomathematics Workshop: “Biyomatematik” *İzmir Ekonomi Üniversitesi*, 23 Ekim 2007, İzmir/Türkiye.

D3. Kahraman, Ö., Yaşa, İ., Tekin, E., Koçyiğit, A., İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan İzole Edilen Halofilik Archaea'nın Ekstraselüler Hidrolitik Enzim Aktivitesi ve Moleküler Karakterizasyonları, *XV. Biyoteknoloji Kongresi*, 28-31 Ekim 2007, Antalya/Türkiye.

D4. Tekin, E., Mutasyonlar ve DNA Tamir Mekanizmaları, *12.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi*, Süleyman Demirel Üniversitesi, 5-8 Ekim 2005, Isparta/Türkiye.

D5. Gübe, Ö., Tekin E., Kocaman, H., Biyolojik Sistemlerde Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Uygulama Alanları, *Ebiltem*, 16 Mayıs 2004, İzmir/Türkiye.

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler (Poster)

E1. Tekin, E., Transpozonlar Ve Genler Üzerine Etkileri: Evrimsel Süreçte Faydalı Mıdır Değil Midir?, *I. Moleküler Biyoloji Öğrenci Kongresi*, Ege Üniversitesi, 27-31 Ağustos 2008, İzmir/Türkiye.

E2. Tekin, E., Ateş, M., Kahraman, Ö., *Haloferax mediterranei* ATCC 33500'den Biyoplastik Üretimi, *İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Proje Pazarı*, 18 Haziran 2008, İzmir/Türkiye.

E3. Kahraman, Ö., Yaşa, İ., Tekin, E., Koçyiğit, A., İzmir Çamaltı Tuzlasından İzole Edilen Halofilik Archaeanın Ekstraselüler Hidrolitik Enzim Aktivitesi Ve Moleküler Karakterizasyonları, *Inno-Venture 2007 Proje Pazarı*, Ebiltem, 13-14 Aralık 2007, İzmir/Türkiye.

E4. Tekin, E., Ateş, M., Kahraman, Ö., İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan İzole Edilen Ekstrem Halofilik Mikroorganizmaların PHB Üretimi Ve Verim Analizi, *Inno-Venture 2007 Proje Pazarı*, Ebiltem, 13-14 Aralık 2007, İzmir/Türkiye.

F. Staj

F1. Erasmus Staj Konusu: Laktik Asit bakterilerinin Çinko toleranslılığının saptanması ve RAPD-PCR ile farklı izolatların tespiti, *Universita Politecnica Delle Marche, Facolta di Agraria*, Dipartimento di SAIFET, 1 Temmuz 2009-30 Eylül 2009, Ancona/İtalya.

Danışman: Prof. Dr. Francesca CLEMENTI

G. İş Tecrübesi

G1. 6. ve 7. sınıfları SBS'ye Hazırlık Kursu Kapsamında *Yunus Emre İlköğretim Okulu'nda ve Altındağ İlköğretim Okulu'nda* Usta Öğretici/ Fen ve Teknoloji Eğitmeni, 2009-2010 Bahar Dönemi (4 ay)

H. Uygulamalı Kurslar

- H1.** 20-22 Kasım 2013 TUBİTAK *Proje Çağrılarına Etkin Proje Yazım Eğitimi*
- H2.** *Gen Klonlama Yöntemleri: IV. Klonlama Kursu*, TUBİTAK Destekli, İnönü Üniversitesi- Adnan Menderes Üniversitesi (26-27-28-29-30-31 Mayıs 2013)
- H3.** *Son gelişmeler ışığında Teorik ve Uygulamalı HPLC Eğitimi*, TUBİTAK Destekli, Akdeniz Üniversitesi-İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü-Ege Üniversitesi (TUBİTAK Tam Burslu) (26-27-28 Nisan 2013)
- H4.** Deney Hayvanı Kullanım Kursu: *IX.Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası*, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (6-17 Haziran 2011)
- H5.** *Next Generation Sequencing Workshop (Teorik ve Pratik uygulamalı)*, Facoltà di Scienze Biotechnologiche, Labobiotech, University of Bari, Bari, Italy (Pratik kısmı: small-RNA sekans verilerinden ChIP-Seq analizi ile mikroRNA'ların sayısal analizi), 16-18 Eylül 2009, Bari/İtalya.

I. Dinleyici olarak katıldığı kongre ve etkinlikler

- I1.** *III. International Workshop on Translational Bioinformatics and Medical Informatics*, 21-23 May 2014, İzmir/Turkey.
- I2.** *21.Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası katılımı)* 3-7 EYLÜL 2012, İzmir/Türkiye.
- I3.** *1.Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi*, Ege Üniversitesi, 27-30 Ağustos 2008, İzmir/Türkiye.
- I4.** *19.Ulusal Biyoloji Kongresi*, Karadeniz Teknik Üniversitesi, TRABZON, 23-27 Haziran 2008, İzmir/Türkiye.
- I5.** *Epigenetik II*, Konuşmacı :Prof.Dr.Feza Öztürk, Chicago State University, Ege Üniversitesi, 2 Mayıs 2008, İzmir/Türkiye.
- I6.** *II.Laboratuvar Güvenliği Sempozyumu*, AREL, Ege Üniversitesi, 16 Nisan 2008, İzmir/Türkiye.
- I7.** *Programlı Hücre Ölümü Sempozyumu*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 9 Nisan 2008, İstanbul/Türkiye.
- I8.** *Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Eğitim Sempozyumu*, Ege Üniversitesi, 6-7 Mart 2008, İzmir/Türkiye.

- I9.** *Epigenetik I*, Prof. Dr. Feza Öztürk (Chicago State University), Ege Üniversitesi, 1 Şubat 2008, İzmir/Türkiye.
- I10.** *Biomathematics Workshop I*. Konuşmacı: Doç. Dr. Ünal Ufuktepe, İzmir Ekonomi Üniversitesi, 9 Ekim 2007, İzmir/Türkiye.
- I11.** *XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası/Aydın.
- I12.** *Kromatografideki Son Gelişmeler Eğitim Semineri*, EBİLTEM, 4 Mayıs 2006, İzmir/Türkiye.
- I13.** *XII. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi*, Süleyman Demirel Üniversitesi, 5-8 Ekim 2005, Isparta/Türkiye.
- I14.** *Hücre Kültürü Teknolojisinde Temel Prensipler ve Yapay Organlar Kursu*, EBİLTEM, 24-26 Kasım 2004, İzmir/Türkiye.
- I15.** *Biyoenerji 2004 Sempozyumu*, EBİLTEM, 20-22 Ekim 2004, İzmir/Türkiye.
- I16.** *XI. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi*, Adnan Menderes Üniversitesi, 04-07 Ekim 2004, Aydın/Türkiye.
- I17.** *İnsan Genom Projesi Sempozyumu*, DEU Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 5 Nisan 2004, İzmir/Türkiye.

J. Bilimsel, Sosyal ve Kültürel Etkinlikler

- J1.** *Konya Karapınar Çölleşmeyle Mücadele Doğa Okulu*, 24-30 Temmuz 2011
- J2.** *Gediz Deltası- Spil Dağı Milli Parkı, Kula ve Çevresi Ekoloji Temelli Doğa Eğitimi*, 11-22 Eylül 2006.
- J3.** 2004-2008 İngilizce-Türkçe Makale Çevirmenliği
- J4.** *İzmir Büyükşehir Belediyesi Abı-Abi-Kardeş Projesi*, 24 Kasım-30 Aralık 2007.
- J5.** *2005 Uluslararası Üniversitelerarası Spor Organizasyonu (Universiade)*
- J6.** EBILTET Üyeliği (2002-2005)
- J7.** EBILTET Yöneticiliği (Mart 2004-Şubat 2005)

K. Lisans Diploma tez çalışması

- K1.** Quorum Sensing ve Patojenite (2005)