

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**HALOFİLİK MİKROORGANİZMALARIN
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE
BİYOTEKNOLOJİK ÖNEME SAHİP EKSTRASELÜLER
ENZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özge KAHRAMAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.04

Sunuş tarihi: 13/08/2008

Tez Danışmanı: : Yrd.Doç.Dr. İhsan YAŞA

Bornova-İzmir

III

Özge KAHRAMAN tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan “**Halofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Biyoteknolojik Öneme Sahip Ekstraselüler Enzimlerinin Araştırılması**” 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 13/08/2008 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Yrd. Doç. Dr. İhsan Yaşa

Raportör Üye : Doç Dr. Mustafa ATEŞ

Üye : Doç. Dr. B. Oral BİTLİSLİ

ÖZET

HALOFİLİK MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK ÖNEME SAHİP EKSTRASELÜLER ENZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

KAHRAMAN, Özge

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. İhsan YAŞA

Ağustos 2008, 107 sayfa

Bu araştırmada İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan alınan örneklerden halofilik mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilerek bu mikroorganizmaların biyoteknolojik öneme sahip bazı enzimlerinin taramaları ve biyokimyasal testlerinin yanı sıra moleküler karakterizasyonları yapılmaya çalışılmıştır.

Tuzlanın iki farklı yerinden alınan toprak örneklerinden saflaştırılan 14 izolatın ekstraselüler ekstremozim taramalarında % 48,2'sinin esteraz, % 28,5'nin proteaz, % 100'ünün DNaz aktivitesine sahip oldukları; lipaz, amilaz jelatinaz ve selülaz aktivitelerine ise sahip olmadıkları görülmüştür. Proteaz aktivite ölçüm sonuçlarında % 99 benzerlik oranıyla *Halobacterium salinarum* olarak saptanan 2 nolu izolatın, % 0,5 maya özütü içeren SW-25 (pH 7.0) ortamında 4. gün 2 U

VI

aktivite, 5. gün ise 2,5 U aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Farklı besin, azot kaynaklarının ve farklı NaCl konsantrasyonlarının proteaz üretimine etkisi incelendiğinde maya özütünde; 2,6 U ve et özütünde; 1,2 U ayrıca 3,5M NaCl içeren ortamda 2,3 U aktivite ve 4M NaCl içeren ortamda 2 U aktivite gösterdiği görülmüştür. İzolatların 16S rDNA moleküler tanıları sonucu 1,4,6,7,10,11,13 nolu izolatlar % 99 oranında *Haloferax alexandrinus*, 5 nolu izolat % 98 oranında *Haloferax alexandrinus*, 12 nolu izolat % 96 benzerlik oranıyla *Haloferax alexandrinus*, 3 nolu izolat % 99 *Haloferax sp. HSC4*, 8 nolu izolat % 97 *Haloferax YT 228*, 2 nolu izolat % 99 *Halobacterium salinarum R1 strain*, 9 nolu izolat % 97 *Halobacterium salinarum* olarak tanılanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ekstrem Halofilik Archaea, Halobacteriaceae, Ekstraselüler Enzim, Ekstreozimler, Proteaz

ABSTRACT

**ISOLATION, IDENTIFICATION OF HALOPHILIC
MICROORGANISMS AND RESEARCH OF THEIR
EXTRACELLULAR ENZYMES WITH BIOTECHNOLOGICAL
IMPORTANCE**

KAHRAMAN, Özge

Master of Science Thesis Biology Department

Supervisor: Assist. Prof. Dr. İhsan YAŞA

August, 2008, 107 pages

In this research we tried to isolate halophilic microorganisms from İzmir Camaltı Saltern and screened their enzymes with biotechnological importance and molecular identification besides biochemical tests.

In the extracellular extremozyme screening of 14 isolates isolated from soil samples taken from two different parts of saltern, we observed that % 48.2 has esterase activity, % 28.5 has protease activity, % 100 has DNase activity but any lipase, amylase, gelatinase and cellulase activity have been detected.

Compared to protease production capacities of isolates, isolate 2 was the best protease producer and identified as *Halobacterium salinarum* with % 99 sequence similarity. Isolate 2 reached to 2 U activity in SW-25 (pH:7.0) medium containing % 0.5 yeast extract at 4th days and 2.5 U activity at 5th days.

When we investigated effect of different nutrition, nitrogen sources and NaCl concentration on protease production, we observed the

VIII

best activities in medium containing yeast extract with 2.6 U activity and meat extract with 1.2 U activity; 2.3 U activity in medium containing 3.5M NaCl and 2 U activity in medium containing 4M NaCl.

At the result of 16S rDNA molecular identification, isolates identified as *Haloferax alexandrinus* with % 99 sequence similarity are 1,4,6,7,10,11,13; isolate identified as *Haloferax alexandrinus* with % 98 sequence similarity is 5; isolate identified as *Haloferax alexandrinus* with % 96 sequence similarity is 12; isolate identified as *Haloferax sp. HSC4* with % 99 sequence similarity is 3; isolate identified as *Haloferax sp. YT 228* with % 97 sequence similarity is 8; isolate identified as *Halobacterium salinarum R1 strain* with % 99 sequence similarity is 2; isolate identified as *Halobacterium salinarum* with % 97 sequence similarity is 9.

Key Words: Extreme Halophilic Archaea, Halobacteriaceae, Extracellular Enzyme, Extremozymes, Proteases

IX

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen başta sayın hocam Yrd. Doç. Dr. İhsan Yaşa' ya ve Araş. Gör. Ali Koçyiğit, Uzman Biyolog Zeliha Demirel, Araş Gör. Ferda Yılmaz Köz'e, can dostum Ebru Tekin'e, Doç. Dr. Mustafa Ateş'e, desteklerini esirgemeyen tüm Biyoloji bölümüne, Ege Üniv. Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ABD başkanı Selda Erensoy'a, Mustafa Kemal Üniv. 'den Yrd. Doç. Dr. Birgül Özcan'a, ayrıca beni daima destekleyen aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (2006/Fen/056)

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIX
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	6
2.1. Halofiller	6
2.1.1. Halofillerin Taksonomi ve Ekolojileri:	9
2.1.2. Halofilik Bakteriler	9
2.1.3. Halofilik Archaea	13
2.2. Yüksek Tuzlu Çevrelere Adaptasyon.....	17
2.2.1. Osmoregülasyon.....	17
2.3. Halofilik Archaea Hücresel Yapıları.....	24
2.3.1. Halofilik Archaeada Hücre Duvarı	24
2.3.2. Halofilik Archaeada Hücre Dışı Kapsül.....	27
2.3.3. Halofilik Archaea Flajeli.....	27
2.3.4. Sitoplazmik Zar ve Lipidleri	28
2.3.5. Depo Materyalleri	31
2.4. Halofillerin Biyoteknolojik Potansiyelleri	31
2.4.1. Bakteriorodopsin	32
2.4.2. Biyopolimerler	34
2.4.3. Tıp	35

XII

2.4.4. Dengeleyici Çözgen	36
2.4.5. Enzimler	37
2.5. Enzimlerin Halofilik Adaptasyonları	39
2.5.1. Halofilik Enzim Nedir?	39
2.5.2. Halofilik Proteinlerin Aminoasit Kompozisyonu	39
2.5.3. Halofilik Enzim Çözünürlüğü	40
2.5.4. Ekstraselüler Proteazlar	40
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	43
2.7. 16S rDNA Dizi Analizi	45
3. MATERYAL VE YÖNTEM	47
3.1. Materyal	47
3.1.1. Kullanılan besiyerleri ve kimyasallar	47
3.1.2. Örneklerin toplanması ve hazırlanması	50
3.1.3. Antibiyotikler	50
3.1.4. Kimyasal çözeltiler ve tamponlar	50
3.2. Yöntem	54
3.2.1. Halofilik mikroorganizmaların izolasyonu	54
3.2.2. Mikroskopik inceleme	55
3.2.3. Stoklama	55
3.2.4. Büyüme gereksinimleri	56
3.2.5. Antibiyotik duyarlılık testi	58
3.2.6. Hücre Dışı Hidrolitik Ekstremozimlerin Taranması	58
3.2.7. Biyokimyasal Testler	62
3.2.8. İzolatların moleküler tanıları	64
4. BULGULAR	67
4.1. İzolatların Elde Edilmesi	67

XIII

4.2. Büyüme İstekleri	69
4.2.1. Optimum NaCl Konsantrasyonu	69
4.2.2. Büyüme İçin Gerekli Minimum Maya Özütü Konsantrasyonu	70
4.2.3. Minimum Mg^{+2} İhtiyacı	70
4.2.4. Tek Karbon Kaynağında Büyüme	71
4.2.5. Azot Kaynağı	72
4.2.6. pH ve Sıcaklık Toleransı	72
4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi	73
4.4. Hücre Dışı Hidrolitik Ekstremozimlerin Taranması	74
4.5. Proteaz Aktivitesinin Taranması ve Üretim Koşulları	75
4.5.1. Farklı Besin ve Azot Kaynaklarının Proteaz Üretimine Etkisi	76
4.5.2. NaCl Konsantrasyonlarının Proteaz Üretimine Etkisi	76
4.6. Biyokimyasal Testler	77
4.7. İzolatların Moleküler Tanıları	77
5. TARTIŞMA	89
KAYNAKLAR DİZİNİ	96
ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa No</u>
1.1. Çamaltı Tuzlası	2
1.2. Çamaltı Tuzlası (Google earth).....	2
2.1. Tuzlu ve alkali göllerin oluşum şeması.....	7
2.2. <i>Haloarcula japonica</i> ’a ait asimetrik hücre bölünme görüntüsü (A. 1. saat, B. 2. saat, C. 3. saat, D. 12. saat) 17	
2.3. Bakteri ve Archaeada tespit edilen zwitteryonik organik ozmolitler	20
2.4. Bakteri ve Archaeada tespit edilen yüksüz organik ozmolitler	21
2.5. Bakteri ve Archeada tespit edilen karboksilatları içeren anyonik organik ozmolitler	22
2.6. Bakteri ve Archaeada Fosfat ve sülfat kısımları içeren anyonik organik ozmolitler	23
2.7. Hekzagonal düzenlenmiş S-tabakası (Sara and Sleytr, 2000)	25
2.8. <i>Halococcus morrhuae</i> strain 24’ e ait ince duvar yapısı. Bar 0,5µm (Steensland and Larsen, 1971)	26
2.9. <i>Halobacterium salinarum</i> bipolar flajel. Bar 1µm. (Alam et al, 1984)	28
2.10. Halobacteriaceae familyasındaki ana lipid yapıları (a) C ₂₀ -C ₂₀ 2,3-di- <i>O</i> -phytanyl- <i>sn</i> -glycerol (b),2- <i>O</i> - sesterterpanyl-3- <i>O</i> -phytanyl- <i>sn</i> -glycerol (C ₂₅ ,C ₂₀) (c)	

2,3-di- <i>O</i> -sesterterpanyl- <i>sn</i> -glycerol (C ₂₅ ,C ₂₅) (Oren 2002).....	29
2.11. Halobacteriales ordosunda görülen glikolipid yapıları a) <i>Haloferax</i> ve diğer türlerden S-DGD-1 b) <i>Natrialba asiatica</i> S ₂ -DGD-1 c) <i>Haloarcula</i> TGD-2 ve d) S-TGD-1 e) <i>Halobacterium</i> S-TeGD.....	30
2.12. Bakteriorodopsinin fotodöngüsü ve proton yer değişiminin mekanizması (Krebs and Khorona, 1993)	34
2.13. Farklı büyüme koşullarında proteolitik enzimlerin şematik sunumu	43
2.14. PZR şematik gösterimi.....	45
4.1. 9 nolu izolatın Faz- kontrast görüntüsü	68
4.2. 5 nolu izolatın Faz- kontrast görüntüsü	68
4.3. 2 nolu izolatın petrideki görüntüsü	69
4.4. 6 Nolu İzolatın antibiyotik denemesi.....	74
4.5. DNaz aktivitesi	75
4.6. Esteraz aktivitesi	75
4.7. 2 nolu izolatın günlere bağlı büyüme eğrisi ve proteaz aktivitesi.....	75
4.8. Farklı besin ve azot kaynaklarının proteaz üretimine etkisi.....	76
4.9. NaCl Konsantrasyonlarının proteaz üretimine etkisi.....	77
4.10. 2, 5, 9, 10, 14 nolu izolatlara ait DNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü.....	78
4.11. 2, 3, 4 ve tip türe ait PZR jel görüntüsü	79

XVII

4.12. 7 nolu izolatın dizi analizi sonucu elde edilen Forward kromotogramı.....	80
4.13. 7 nolu İzolatın dizi analizi sonucu elde edilen Reverse kromotogramı.....	82
4.14. 7 nolu İzolatın filogenetik ağaçtaki yeri.....	86
4.15. Tüm izolatların karşılaştırmalı filogenetik ağacı. alexandri: <i>Haloferax alexandrinus</i> , volcanii: <i>Haloferax</i> <i>volcanii</i> , gibbons: <i>Haloferax gibbonsii</i> , medi: <i>Haloferax mediterranei</i> , salıDSM3754T: <i>Halobacterium</i> <i>salinarum DSM3754T</i>	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1. Haloarchaeadan izole edilen hücre dışı proteazlar.....	42
3.1. Azokazein proteaz aktivite ölçüm yöntemi.....	61
3.2. PZR protokolü.....	65
3.3. Thermalcyclers protokolü.....	65
4.1. Optimum NaCl Konsantrasyonu.....	69
4.2. Minumum Mg^{+2} İhtiyacı.....	70
4.3. Tek Karbon Kaynağında Büyüme.....	71
4.4. Azot Kaynağı.....	72
4.5. Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	73
4.6. Hücre Dışı Hidrolitik Ekstreozimlerin Taranması.....	74
4.7. Biyokimyasal test sonuçları.....	77

1. GİRİŞ

Toprak set hazırlanır, su geçişi için bırakılır. Suyun rengi kırmızıya dönene kadar öyle kalır. Eğer kuzey rüzgarları yaz ve sonbahar boyunca güçlü eserse tuz oluşur. Eğer kuzey rüzgarı gelmezse bütün kazanç kaybolur.

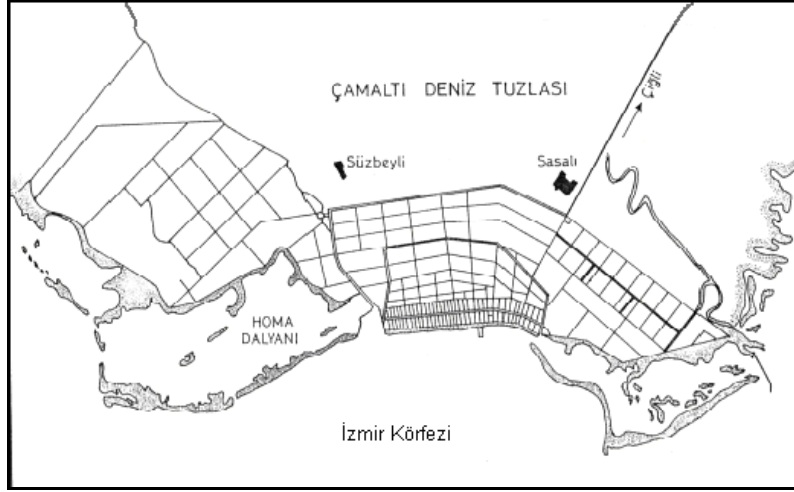
Peng-Tzao-Kan-Mu,Çin Yazıtları

2700 İÖ(İsa'dan Önce)

Bu Çin yazıtında belirtildiği gibi kırmızı tuzlu suların oluşumuna dair kaynaklar çok öncelere dayanmaktadır ve şimdi bilinmektedir ki; bunu sebebi yüksek tuzda yaşama adapte olmuş mikroorganizmaların oluşturduğu yoğun komunitelerdir. Yine mısır yazıtlarında da Nil nehri suyunun kırmızıya döndüğü, hala Wadi Natrun Gölünde mikrobiyal üremeyi gösteren kırmızı rengin olduğu belirtilmektedir (Jannasch, 1957).

Ülkemizdeki önemli tuz üretim yerlerinden biri olan Çamaltı Tuzlası, İzmir iline 28 km uzaklıkta, Gediz nehri havzasına kurulmuş, Türkiye'nin deniz kaynaklı en büyük tuzlasıdır (Şekil 1.1, Şekil 1.2). İlk kez 1863 tarihinde İtalyanlar tarafından düzenli tuz üretim havuzları ve tesisleri inşa edilmiştir. Çamaltı Tuzlası 24.161.000 m² alana yayılmış buharlaştırma havuzları ve 3.158.000 m² alanı kaplayan kristalizasyon havuzlarıyla önemli bir sulak alandır. Su depolama havuzları %35-50,

buharlaştırma havuzları %50-150, kristalizasyon havuzları %150-300 tuzluluktadır (Koru, 2004).



Şekil 1.1. Çamaltı Tuzlası(Koru, 2004).



Şekil 1.2. Çamaltı Tuzlası (<http://earth.google.com/>).

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikrobiyal yaşamın spesifik çevrelerle sınırlı olmadığını, mikrobiyal komünitenin yüksek sıcaklık, yüksek tuz, asidik ve alkali pH, yüksek basınç gibi ortamlarda bulunabileceğini ortaya koymuştur. Bu tür ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar ekstremofiller olarak adlandırılırlar (Van den Burg, 2003). Ekstremofilik mikroorganizmaların, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan üyeleri olan halofiller üç domainde de (Archaea, Bacteria, Eucarya) yer almaktadır (Horikoshi and Grant, 1998) ve Kushner' e (1978, 1993) göre; halofilik olmayanlar (0-1 M), az halofiller (0,2-2,0 M), ılımlı halofiller (0,4-3,5 M), ekstreme yakın halofiller (1,4-4,0 M), ekstrem halofiller (2,0-5,2 M), halotolerantlar (0->1 M) ve değişken halofiller (0->3 M) olarak sınıflandırılmışlardır. Halofilik mikroorganizmalar tuzla, hipersalin göl gibi bölgelerde bulunurlar. Bu ortamlarda, ökaryotlar içerisinde *Dunaliella* (% 10 w/v), *Artemia salina*, *Ephydra* gibi organizmalar yer alır. Bakteriler içerisinde ise *Salinibacter ruber* (% 20-30 w/v) en ekstrem halofilik bakteri olma özelliğine sahiptir. *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* gibi genuslarsa Archaea domaininde yer alır ve bunlar tuzun çökme noktasına yakın konsantrasyonlarda yaşayabilirler.

Ekstrem halofilik mikroorganizmalar biyolojik tuza toleranslılığın model organizmalarıdır ve farklı sıcaklık, tuz konsantrasyonlarında optimum aktivite gösteren proteaz, lipaz, amilaz, DNaz, esteraz, selüloz, pullanaz ve ksilanaz gibi hidrolitik enzim kaynaklarıdır. Haloarchaeal ekstremozimler tuza son derece dayanıklı olmalarının yanı sıra çevrelerindeki uzun süreli yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı yani termotolerantlardır. Dahası, halofilik enzimler tuzla zenginleştirilmiş

koruma kalkanına sahiptir ki, bu durumda düşük su aktivitesi, yüksek organik çözen seviyelerinde katalitik aktivitelerini sürdürebilmektedirler. Bu özellikler birçok uygulama için oldukça ilgi çekicidir. Bununla beraber haloarchaeaya ait ticari değere sahip extremozim örnekleri vardır. Halococcus genusuna ait bir türden elde edilen restriksiyon enzimine ait üretim patenti mevcuttur (Obayashi et al., 1988). Düşük tuzda aktivitesini kaybeden pek çok haloarchaeal proteaz örneğine karşın (Eisenberg and Watchtel, 1987; Kim and Dordick, 1997), alkalifilik *N. pharaonis* proteaz 3mM kadar düşük tuz konsantrasyonunda işlevini sürdürmektedir. Bu özellikler bu tür ekstremozimlerin deterjan katkı maddesi olarak kullanışlı olduklarını göstermektedir (Horikoshi, 1999).

Halofilik mikroorganizmaların tuzlu ortamda proteaz lipaz gibi enzimleri üretme kapasiteleri ise özellikle deri endüstrisinde koruma amaçlı yapılan tuzlamanın da bu tip mikroorganizmaların aktivitesi ile ham deride zararlı sonuçlar ortaya çıkarabildiği görülmüştür (Yaşa vd., 2004).

Halofilik mikroorganizmaların tanılanması fizyolojik testler yanında spesifik archaea ve bacteria primerleri ile saf kültürlerin veya karışık kültürlerin 16S rRNA dizileri karşılaştırılarak yapılabilmektedir (Pohlschröder et al., 2006). Günümüzde hızla gelişen moleküler teknikler dolayısı ile toprak ve su örneklerinden DNA izolasyonları kolaylıkla yapılabilmekte ve alınan örneklerdeki mikrobiyal çeşitlilik ortaya çıkarılabilmektedir (Pohlschröder et al., 2006). Ancak biyoteknolojik olarak bu canlılardan yararlanabilmek için onların kültür ortamlarında

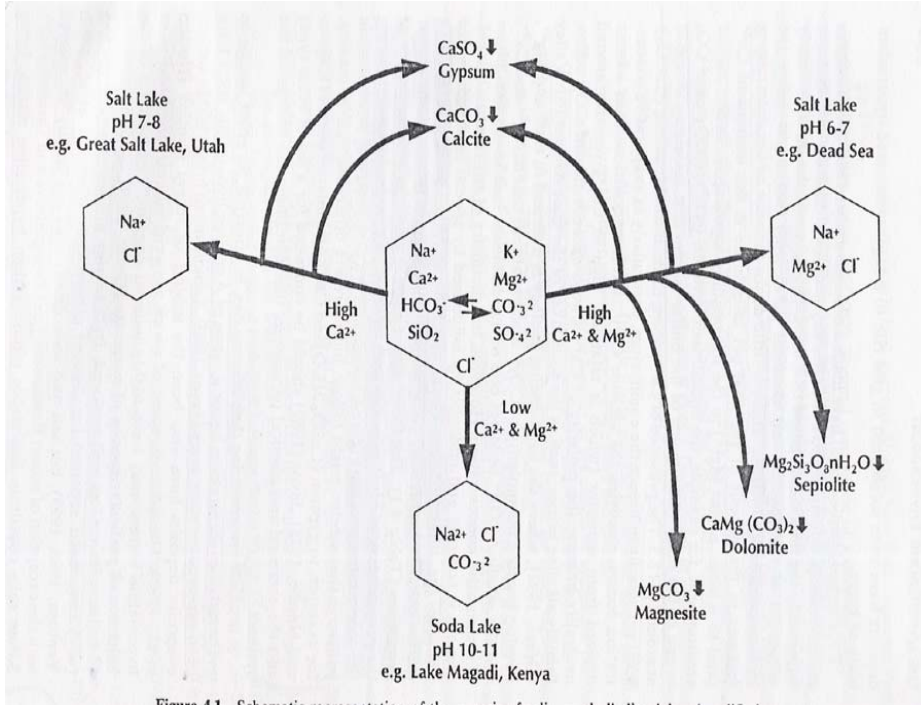
yetiştirilmesi gereklidir. Bu bağlamda, çalışmamızda kültüre edilebilir veya saf kültür halinde elde edilebilen ekstrem halofilik Bacteria ve Archaea domainine ait mikroorganizmaların ülkemizin en önemli tuzlarından olan Çamaltı Tuzlası'ndan izolasyonu bir ön koşul olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda izole edilen türlerin enzim üretme kapasitelerinin araştırılmasının yanında bu türlerin tanılanması, ülkemiz ekstrem halofilik kültüre edilebilir prokaryotik çeşitliliğinin ortaya çıkarılmasına katkıda bulunacağı gibi diğerk araştırmacıların çalışmaları içinde izolatlarımız bir kaynak teşkil edecektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1.Halofiller

Hipersalin sular tuz konsantrasyonları deniz suyundan fazla olan sulardır ($>3,5$ w/v). Hipersalin çevrelerin iki kategorisi vardır: *thalassohaline* sular deniz türevli, deniz suyuna benzer kompozisyona sahip sulardır. Solar tuzlalar, deniz tuzu üretimi için deniz suyunun buharlaştırıldığı yerlerdir. Bununla beraber, proses sırasında çöken minerallerden dolayı bu tip tuzlu suların son kompozisyonları deniz suyundakinden farklıdır. Bu tuzların kristalizasyon ve presipitasyonu calcite (CaCO_3), gypsum ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Halit (NaCl), sylvite (KCl) ve karnalit (KCl , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) formundadır, son Mg^{+2} ve Cl^- baskın olduğundan orijinal deniz suyundan daha asidik bir ortam oluşur. *Athalassohaline* sular deniz suyundan etkilenmiş olabilen ancak esasen oluştukları bölgenin jeoloji, jeografi ve topografisinin bir yansıması olan sulardır. Ölü deniz, böyle tuzlu sulara örnektir, Mg^{+2} 'ce zengindir. pH bu tür sistemleri tanımlayan fiziksel ve kimyasal parametlerin etkilerindendir. Ancak son pH'nın oluşumuyla ilgili bazı şüpheler vardır ki, buda çevredeki Ca^{+2} miktarıdır. Denizel çevrelerde CO_3^{-2} , HCO_3^- , CO_2 oranları deniz suyu pH'sını 8.3 civarında tutan ana tampon elementlerdir. Çözünemeyen kalsit formunda (CaCO_3) Ca^{+2} bulunuşu dengeyi etkiler, solusyondan alkali CO_3^{-2} iyonunu uzaklaştıran buharlaşma gerçekleşir. Böylece deniz suyundan türevlenen tuzlu su (göreceli olarak Ca^{+2} 'ce zengin) nötral seviyede kalır çünkü Ca^{+2} molaritesi CO_3^{-2} 'inkini her zaman aşmaktadır. Son derece alkali tuzlu sular, örneğin; Doğu Afrika

Rift vadisi soda göllerinde Ca^{+2} ve Mg^{+2} yoktur çünkü CO_3^{-2} molaritesi daha baskın gelir ve alkali CO_3^{-2} 'ı ortamdaki dominant iyonlardan biri yapar. Bununla beraber bir tuzlu suyun kimyası kompleks ve bazı özel lokal faktörlerden etkilenmiştir. *Athalassohaline* Great Salt Lake; denizel tuzlulardan daha alkalidir çünkü kompozisyonu daha önceki buharlaşmalardan etkilenmiştir. Ölü deniz, biraz asidik yapıdadır. Mg^{+2} mineralleri sepiolit şeklinde çöker ve çökme sırasında H^+ oluşur. Tuzlu su oluşumu için üç muhtemel yolu göstermektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Tuzlu ve alkali göllerin oluşum şeması(Jones et al., 1994'den modifiye edilmiştir)

Tuzlu topraklar tuz göllerine göre daha az çalışılmıştır ve bu tür topraklar hipersalin sulara göre daha az stabil olan alanlardır çünkü özellikle yağmur nedeniyle tuz oranları seyrelebilmektedir. Mikroorganizmaların daha az koloni oluşturduğu bilinen diğer bazı tuzcul ortamlar ise tuz çıkışının olduğu hayvan ve bitki yüzeyleridir.

Şüphesiz ki; hepsi olmasada birçok hipersalin biyotop mikroorganizma popülasyonunu barındırır. Bu tür habitatlarda büyüme için ne tür substratların bulunduğu ve kullanıldığı pek açık değildir. Hipersalin sular genelde önemli oranda (bazı durumlarda ise 1g/l'den fazla) çözünmüş organik karbon (DOC) içerir,. Bu tür sularda mevcut primer verimliliğin ana kaynağı siyanobakteriler ve anoksijenik fotototrofik bakterilerdir ancak *Dunaliella* spp. gibi ökaryotik alglerde organik bileşik kaynağı olmaktadır, ancak su altında kalan yüksek bitkiler ve omurgasızlardan kalan artıklar önemli katkıda bulunduğu göz ardı edilmemelidir. Ana girdilerden biride organik dengeleyici molekül ve ozmolitlerdir bunlar fototrofların çoğu tarafından üretilir hipersalin biyotoplardaki mikroorganizmalar böyle bileşikler ve fototroflarca salınan diğer ürünler üzerinde yaşama yeteneğine sahiptir. Tipik geniş yüzey/hacim oranına rağmen hipersalin sular çok az çözünmüş oksijen içerir ve hatta anaerobik olabilir. Deniz suyundaki oksijen çözünürlüğü 25°C'de 7mg/l civarındadır ve tuz çökeltisinde bu oran 2mg/l'ye düşebilir (Horikoshi and Grant, 1998).

2.1.1. Halofillerin Taksonomi ve Ekolojileri:

Kushner (1978,1993) tuz toleransına/ihtiyacına sahip halofilik mikroorganizmaları tanımlayan yaygın olarak kullanılan bir çok tanımı yapmıştır. Halofil (tuz seven) ifadesi; büyümeleri için tuza gereksinim duyan mikroorganizmaları tanımlar ancak bu tanım yeterli değildir. Üst seviyedeki tuz konsantrasyonlarında yaşayabilen ama tuz yokluğunda da optimum büyüme oranına sahip organizmalara *halotolerant* denir. Tuzun sıfır konsantrasyonlarından doygunluk konsantrasyonlarına kadar büyüme yeteneğindeki ancak tuz varlığında optimum gelişen organizmalara da *haloversatil* denilmektedir orijinal olarak önerilen ismi “euryhaline” dir.

Tuz toleranslılığı sıcaklık gibi çevresel etkilerle değişkenlik gösterebilir. *Rhodospirillum salinarum* anaerobik fototrof olarak büyüdüğünde, aerobik organotrof olarak büyütüldüğünden daha çok tuza toleranslılık gösterir.

2.1.2. Halofilik Bakteriler

Omurgalılar için en yüksek tuza tolerans sınırı 1.5M'dır. Bu tuz konsantrasyonunun üstünde *Artemia salina* (tuzlu su karidesi), *Ephydra* (tuzlu su sineği) ve *Dunaliella* genusuna dahil ökaryotik fotosentetik flagellatların sayısı artarken ökaryotların sayıları azalır. 1.5 M'ı aşan tuz konsantrasyonlarında prokaryotlar baskındır: ılımlı halofiller ve haloversatil bakteriler 1.5-3.0M tuz konsantrasyonlarında ve ekstrem halofilik archaea türleri (halobacteria) tuzun çöktüğü konsantrasyonlarda bulunurlar.

Denizel tuzlalarda aerobik heterotroflarla yapılan çalışmada; Rodriguez-Valera et al. (1981) bakteriyel halofillerin 2M NaCl'a kadar baskın bulunduğunu konsantrasyonların üzerinde ise tamamen halobakterilerin baskın olduğunu göstermiştir. Birkaç çalışmada tuzlu topraklardan hem bakteri hem archaea izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Horikoshi and Grant, 1998).

Aerobik gram negatif organotrofik bakteriler tuzlu sularda baskındır. Gram negatif ılımlı halofillerin benzer tipleri taksonomik çalışmalarda tanımlanmıştır bunlar; *Vibrio*, *Alteromonas*, *Acinetobacter*, *Deleya*, *Marinomonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*. Ilımlı halofillerin çoğu izolatu *Halomonas* ve *Halovibrio* genuslarına dahildir. *Halomonadaceae* familyası fiolojenetik olarak tutarlıdır ve *Halomonas*, *Halovibrio*, *Deleya* genuslarını içerir. Ayrıca, 16 rRNA-DNA hibridizasyon çalışmaları *Chromohalobacter marismotui*, *Volcaniella eurihalina* ve *Pseudomonas halosaccharolytica* muhtemelen *Halomonadaceae* familyasına ait olduğunu göstermiştir. *Halomonas/Deleya* grubu genelde düşük konsantrasyonlu hipersalin çevrelerde bulunmaktadır.

Solar tuzlalarda gram pozitif aerobik hetotroflar gram negatifler kadar yaygın değildir ama *Marinococcus*, *Sporosarcina*, *Salinicoccus* ve *Bacillus* genusunun benzer türleri tuzlu topraklardan ve tuzlalardan elde edilmiştir. Filogenetik analizler *Sporosarcina halophila*'nın *Sporosarcina ureae*'dan farklı olduğunu ve *Bacillus subtilis* grubuna yakın olduğunu göstermiştir. *Marinococcus halophilus* *Bacillus alcalophilus*'a daha yakın olan farklı bir genustur. Gram pozitif kok

taksonomisi yeniden incelenmiş ve halen *Micrococcus spp.* olarak sınıflandırılan bazı bakterilerin *Salinicoccus* genusuna transfer edilmesi gerekli olduğunu belirtmiştir. *Halomonas* ve *Flavobacterium* genusuna dahil birkaç gram negatif halofilik mikroorganizma Antarktik göllerde mikrobiyal floranın ana temsilcileri olarak tanımlanmışlardır. Ek olarak, haloversatil gram pozitif koklarda bu çevrelerde bulunabilirler (Horikoshi and Grant, 1998).

Hipersalin tuzlaların pek çoğunda birincil üreticiler çift flajelli tek hücreli yeşil alg *Dunaliella* genusudur. Ölü denizde yüksek seviyede Mg^{+2} ve Ca^{+2} *Dunaliella spp.*'ya inhibitör bir etki yapar. Bununla beraber, siyanobakteriler pek çok hipersalin çevrede aerobik üretime katkıda bulunmaktadır. Bu siyanobakterilerin çoğu tek hücrelidir, muhtemelen *Synechocystis* ve *Synechococcus* genusunun temsilcileridir. Çoğu tür *Aphanothece* veya sinonimi olarak isimlendirilsede, bunlar muhtemelen *Synechococcus* türleridir. *Dactylococcopsis salina* nötral tuz göllerinde yaygındır ve *Spirulina* türleri göreceli olarak düşük tuzlu alkali göllerde yoğun üremeler oluşturur. *Microcoleus* ve *Oscillatoria* türlerini içeren mikrobiyal yığınlar % 18 tuzluluktaki solar göllerde oluşur. Halofilik anoksijenik fototrofik bakterilerle birlikte *Aphanothece spp.* ve *Phormidium spp.* içeren benzer yığınlar Akdeniz denizel tuzlalarda oluşur. Bununla beraber, %20 tuzluluğun üzerinde, siyanobakteri birincil üretimindeki rolü azaltmaktadır.

Işığın ulaştığı hipersalin tuzlaların anoksik tabakalarında anoksik fototroflar özellikle mor bakteriler yaygın olarak bulunurlar. En yaygın izole edilen türler *Chromatium salexigens*, *Thiocapsa halophila* ve

Rhodospirillum salinarum. Soda göllerinde *Ectothiorhodospira* genusu kısmen yaygındır; bu türlerin bazıları ekstrem halofildir.

Anoksigenik fototroflar, *Rhodospirillaceae* üyeleri hariç H_2S ihtiyaç duyar bu da kükürtlü proteinlerin fermentasyonundan veya disimilatif sülfat indirgenmesiyle ortamda oluşabilir. Ölü deniz gibi çevrelerde yapılan izotop analizleri ve birçok hipersalin tuzlalarda siyah sedimentlerin varlığı, biyolojik sülfat üretiminin yaygın olduğunu göstermektedir. Bununla beraber son yıllarda sadece iki ılımlı halofilik sülfat indirgeyici tanımlanmıştır. Büyüme ortamına dengeleyici çözgen ilavesi halofilik sülfat indirgeyicilerin izolasyon şansını artırır, çünkü onlar bu bileşikleri sentezleyemezler.

Doygun tuzlu sularda düşük oksijen çözünürlüğü ve bol besin anaerobik fermentatif mikroorganizmaların büyümesini teşvikler. Bununla beraber, geçmiş on yılda böyle strainler sadece anoksik sedimentlerden değil, düşük miktarda oksijen içeren sediment yüzeylerinden izole edilmişlerdir. Lipid profilleri ve 16S rRNA oligonükleotid analizleri bu mikroorganizmaları eubakteriyel soy, *Haloanaerobiaceae*'ye yerleştirmektedir. *Haloanaerobiaceae* üyelerinin hücre komponentleri onların yüksek tuzlu çevrelere adapte olduğunu göstermiştir.

Son zamanlarda anaerobik hipersalin çevrelerin mikrobiyolojisini yeniden incelendi. *Haloanaerobiaceae* altı genus içerir, *Acetohalobium arabaticum* dışında bütün örnekleri karbohidratları fermente eder. Fermentasyon özellikleri şimdiye kadar tanımlanmış altı genusu ayırır.

Farklı karbon kaynakları bu zorunlu anaeroblar tarafından kullanılır. Örneğin; *Halocella callulolytica* ve *Haloanaerobacter chitinovorans* kompleks substratları kullanır. *Acetohalobium arabaticum* glisin betaini trimetilamine parçalar, tanımlanan diğer *Haloanarobiaceae* türleri karbohidratları CO₂, H₂, asetat ve etanol. Betainin bu metabolizması önemlidir çünkü bu madde hipersalin ortamlarda bol bulunan bir dengeleyici çözügendir. Ek olarak, hipersalin ekosistemlerden izole edilen metanogenik mikroorganizmalar asetatı parçalayamaz ama trimetininami ve onun parçalanma ürünlerini kullanabilir. Bu nedenle *Acetohalobium arabaticum* hipersalin çevrelerdeki karbon döngüsünde zincirin önemli bir halkasını oluşturur (Horikoshi and Grant, 1998).

Bazı halofiller yeni soy oluşturur örneğin; Kızıl Deniz'den izole edilen *Flexistipes sinusarabidici*. *Haloanarobiaceae* familyası sadece halofilik mikroorganizmaları içerir ve *Halomonadaceae* baskın olarak halofilleri içerir (Horikoshi and Grant, 1998).

2.1.3. Halofilik Archaea

Halobakteri ifadesi kırmızı pigmentli ekstrem halofilik archaea, *Halobacteriales* ordosunda tek familya olan *Halobacteriaceae* üyelerini ifade eder. Halobacteriales ordosu kok ve basilden yassı extrem çokşekilli (pleomorfik) ve *Haloarcula japonica*' da görüldüğü gibi üçgen, trapezoid şekilli hücreleri içermektedir (Şekil 2.2). Henüz kültüre edilmemiş ancak 16S rRNA sekans analizi çalışmaları sonucunda bu grupta yer aldığı belirlenen kare şekilli hücrelerde tespit edilmiştir (Oren, 2002). Çoğu halobakteri büyümeleri ve hücre bütünlüğünü sağlamaları

için 1,5M NaCl'e ihtiyaç duyarlar. Halobakteriler halofilik bakterilerden archaeal karakteristikleriyle (özellikle eter bağlı lipidleri) ayrılır. Çoğu halobakteri C₅₀ karetenoidlerin varlığından dolayı kırmızı veya turuncu pigmentlidir fakat bazı türleri renksiz gaz vezikülleriyle beyaz, opak veya pembe pigmentlidir. Bakteriyorodopsin içeren mor membrana sahip halobakterilerde mor renkte görülebilir (Oren, 2002).

Halobakteriler en halofilik mikroorganizmalardır ve hipersalin tuzlalar doygunluğa eriştiğinde baskın olurlar , tuzlu suya kırmızı bir renk verir. 2500 yıl öncesine ait Çin kayıtlarında tuzlaların kırmızıya büründüğü halobakteriyel bir patlama olduğu bildirilmiştir. Halobakteriyel karetenoid pigmentleri güneş ışınlarının radyasyona, artan sıcaklığa ve tuzlardaki buharlaşmaya karşı hücreye bir koruma sağlar.

Son zamanlarda, kemotaksonomik uygulamalar ve gen karşılaştırmaları homejenik olduğu düşünülen grubun aslında tamamen farklı olduğunu göstermiştir. Soda gölleri sınırlı oranda alkalifiliklere barınak olur, bunlar yüksek tuzun yanında yüksek pH'ya ihtiyaç duyarlar. Dünyadaki nötral hipersalin sular *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halorubrum* gibi hemen hemen benzer halobakteriyel türlere ev sahipliği yapar. Tuzlanmış gıdalar, proteolitik *Halobacterium salinarum* için zengin bir ortamdır. Halobakteriler çeşitli yaştaki tuz mağaralarındaki tuzlu sulardan bazende eski tuz kristallerinden de izole edilmektedir.

Farklı kültür koleksiyonlarından tip strainlerdeki farklılığı içerir. Ek olarak, aynı spesifik epitetler birkaç *Halobacterium* türüne verilmiştir

(örneğin; *halobium*, *cutirubrum*, *salinarum*, *trapanicum*). Ancak çoğu genus seviyesinde farklıdır.

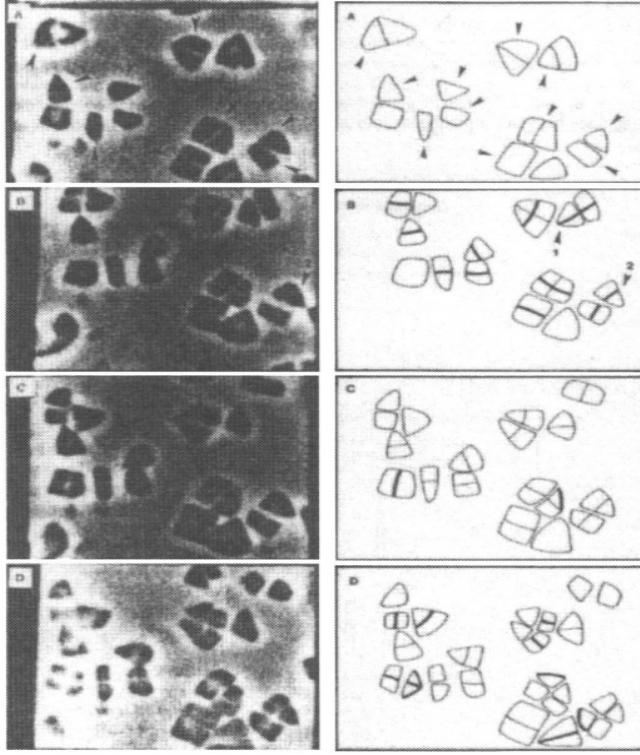
Kemotaksonomik analizler, polar lipidlerin varlığı veya yokluğu ve 16S rRNA gen sekans analizleri uygun grupları oluşturur. En son yapılan taksonomik düzenlemeler Ölü Deniz’de patlama yapan türler *Halobaculum gomorense*’nin isimlendirilmesini, *Halobacterium saccharovorum*’unun yeni genus *Halorubrum* içinde sınıflandırılmasını içerir (Oren, 2002).

Birçok hipersalin çevre, metanogenleri ve hipersalin göllerden, deniz stromatolitlerinden ve solar havuzlardan elde edilen halofilik metanogen izolatları içerir. Bu ekosistemdeki mikrobiyal çalışmalar H_2 ’nin hipersalin çevrelerde metanogenez için önemli bir kaynağı olmadığını doğrulamaktadır, buda muhtemelen bu biyotoplardaki yüksek sülfat konsantrasyonlarından kaynaklanmaktadır. Metilaminler gibi düşük moleküler ağırlıklı maddeler metanogenlerin kullandığı ana maddelerdir. Metilamin üretici fermentatif bakterilerin varlığı anaerobik hipersalin çevrelerde primer üreticiden metanogeze doğru bir beslenme zinciri oluşturur (Horikoshi and Grant, 1998).

Halobacteriales ordosuna ait yeni bir taksonun tanımlanması ile ilgili minimum standartlar Oren et al. (1997) tarafından belirlenmiştir. Buna göre;

- Koloni büyüklüğü, şekli ve pigmentasyon
- Hücre morfolojisi ve hareket

- Gram reaksiyonu
- Minimum ve optimum NaCl ve Mg^{+2} konsantrasyonları
- Sıcaklık ve pH aralığı
- Nitrat varlığında anaerobik büyüme yeteneği ve L- arjininde anaerobik üreme
- Karbohidratlardan asit üretimi
- Tek karbon kaynağında üreyebilme
- Katalaz ve oksidaz aktivitesi, indol üretimi ve nişasta, jelatin kazein ve Tween 80 hidrolizi
- Antimikrobiyal maddelere duyarlılık
- Mevcut glikolipid tiplerini ve PGS'nin varlığını veya yokluğunu kapsayacak şekilde polar lipid karakterizasyonu
- DNA'nın G+C içeriği
- 16S rRNA dizi bilgisini içermektedir.



Şekil 2.2. *Haloarcula japonica* 'a ait asimetrik hücre bölünme görüntüsü (A. 1. saat, B. 2. saat, C. 3. saat, D. 12. saat)(Hamamoto, 1988)

2.2.Yüksek Tuzlu Çevrelere Adaptasyon

2.2.1.Ozmoregülasyon

Tuzlu çevrelere maruz kalan mikroorganizmalar ozmozla meydana gelen su kaybı ile başa çıkacak mekanizmaya sahip olmalıdırlar. Çünkü su serbestçe sitoplazmik membrandan geçebilir. Halofiller osmotik potansiyeli olan, düşük moleküler ağırlıklı maddeleri üretirler veya hücre içinde biriktirirler. Bu osmolitler dengeleyici çözgen (compatible solute, stabilize edici ajan) olarakta bilinir. Hücrenin çalışabilmesi için 1 mol/kg

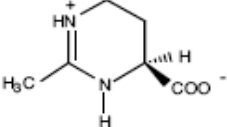
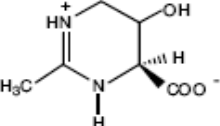
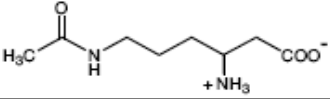
sudan fazla hücre içinde biriktirmelidir. Gliserol kısmen önemli bir osmolittir (özellikle maya, fungus ve alglerde) ancak prokaryotlarda oldukça küçük ve sınırlı bir rol oynar. Prokaryotlarda iş gören çok sayıda osmolit vardır. Bunun için organik ve inorganik çeşitli maddeleri kullanırlar. Hepsi oldukça polar, normalde yüksüz (Şekil 2.4) veya zwitteryonik bileşiklerdir (Şekil 2.3) ve özellikle aminoasit türevleri gibi bazı yapısal motifleri vardır (Horikoshi and Grant, 1998). N,N-dimetilglisin ve glisin betain ılımlı halofilik metanogenlerde gösterilmiştir. Bu iki osmoregülasyon tipinin hem archaea ve bacteria'da bulunduğunu gösterir. Glisin betain oksijenik ve anoksijenik fototrofik bakterilerin tipik bir ürünüdür, ama bu bileşiği sentezleme yeteneği bu grup dışında nadir olarak görülür. Glisinbetain çevreden ve besiyerinden kolayca hücre içine alınabilir. Fototrofik bakterilerin büyük kütleler oluşturduğu hipersalin ortamlarda betain çok yoğun bulunur ve pek çok organotrofik bakteri için uygun bir osmolit olarak iş görür. Ektoin ve türevleri hidroksiektoin organotrofik bakterilerce üretilen en bol osmolitlerden biridir. Osmolitler halofilik bakterilerde düşük su aktivitesine karşı oluşacak zararlara karşıda görev yapar. Osmolitlerin bu stabilize edici etkisi uzun zamandır bilinmektedir. Tüm osmolitlerde gözlenen tek yaygın özellik polar ve kısmen hidrofobik grupların bir kombinasyon göstermesidir. Osmolit işlevinin altında yatan moleküler prensipler, hidrofobik/hidrofilik yapısal elementlerin dengelenmesi ve düzenlenmesini, proteinlerin hidrasyon çevresinden osmolitlerin uzaklaştırıldığı su-solute etkileşimine sebep olan sterik konformasyonları içerir. Solventin uzaklaştırılması entropide azalmaya ve proteinin stabilizasyonunun artmasına neden olmaktadır.

Ozmolitleri sentezleyen veya biriktiren hücreler çevredeki ani seyrelmelere karşı reaksiyon gösterecek hızlı yanıt sistemlerine sahip olmalıdır. Bazı ozmolitler (örn: şekerler) hızlıca metabolize edilebildikleri gibi ozmotik olarak inert bir duruma polimerize edilebilirler, glisin betain ve ectoin gibileri ise hızlıca dışarı verilir. Ozmotik içeri alma ve dışarı verme deneyleri, biyoteknolojik amaçlar için ectoin ve betain iyi bir parametre olarak kullanılmaktadır (Horikoshi and Grant, 1998).

Organik ozmolitler 3 genel kimyasal kategoriye ayrılır: Zwitteryonik çözgen, yüksüz çözgen ve anyonik çözgenler (Roberts, 2005).

A. Zwitteryonik çözgenler

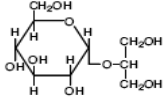
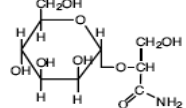
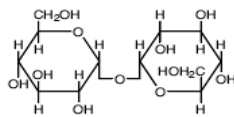
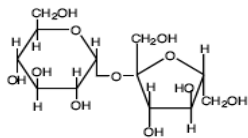
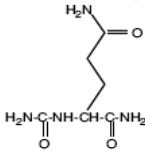
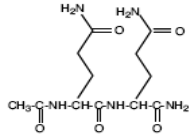
Pek çok archaea ve bakteri aminoasit türevi olan birkaç zwitteryonik molekül sentezler ve akümüle eder (Şekil 2.3)

Zwitteryonik ozmolitler	Organizma
betaine $^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Halotolerant : <i>Thioalkalivibrio versutus</i> , <i>Actinopolyspora</i> sp. Halofilik: <i>Actinopolyspora halophila</i> , <i>Halorhodospira halochloris</i> , <i>Methanohalophilus portulcalensis</i> FDF1; <i>Methanosarcina thermophila</i> ; <i>Synechococcus</i> sp. DUN 52
ectoine 	Halotolerant: <i>Sporosarcina pasteurii</i> ; <i>Brevibacterium epidermidis</i> ; <i>Thioalkalimicrobium aerophilum</i> ; <i>Vibrio cholerae</i> ve <i>V. costocicola</i> Halofilik: <i>Chromohalobacter israelensis</i> ; <i>Chromohalobacter salexigens</i> ; <i>Halorhodospira halochloris</i> ; <i>Halomonas elongata</i> , <i>H. variabilis</i> ve filogenetik olarak ilişkili organizmalar; <i>Methylophaga marina</i> ve <i>M. terricola</i> ; <i>Methylophaga alcalica</i> ve <i>Methylophaga natronica</i> ; Mono Gölünden aerobik, halofilik izolatlar
hydroxyectoine 	Halofilik: <i>Halomonas elongata</i> ; <i>Nocardiopsis halophila</i>
Nγ-acetyldiaminobutyrate $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{NH}_3^+$	Halotolerant: <i>Halomonas elongata</i> CHR63
Ne-acetyl-β-lysine 	Halotolerant: <i>Methanosarcina thermophila</i> ; <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i> ; <i>Methanosarcina mazei</i> Gö1 Halofilik: <i>Methanohalophilus portulcalensis</i> FDF1; <i>Methanohalophilus</i> Z7302
β-glutamine $^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_3^+)-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$	Halofilik: <i>Methanohalophilus portulcalensis</i> FDF1

Şekil 2.3. Bakteri ve Archaeada tespit edilen zwitteryonik organik ozmolitler(Roberts, 2005)

B. Yüksüz Çözgenler

Şekerler ve şeker polioller, glisin, betamin, tetrahidropirimidinler (=Ectoin), α-aminoasitler (prolin, glutamin), N asitilli diamin asitler, glutaminin N türevli karboksamidleri, bazı siyanobakterilerde ve deniz alglerinde dietil sülfoniopropiyonat gibi metillenmiş sülfür bileşikler bu sınıf içindedir (Şekil 2.4).

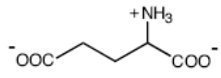
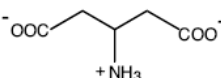
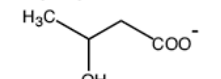
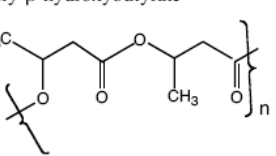
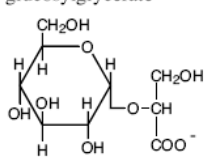
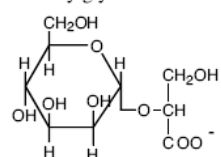
Yüksüz ozmolitler	Organizmalar
α-glucosylglycerol 	Halotolerant: Deniz & tatlı su cyanobakteri: <i>Synechocystis</i> sp. <i>Microcystis</i> firma; fototrofik eubakteri: <i>Rhodovulum sulfidophilum</i>; <i>Pseudomonas mendocina</i> ve <i>P. pseudoalcaligenes</i>; <i>Stenotrophomonas</i>
α-mannosylglyceramide 	Halotolerant: <i>Rhodothermus marinus</i> (R. obamensis)
trehalose 	Halotolerant: <i>Pyrobaculum aerophilum</i>; <i>Sulfolobus solfataricus</i> ve <i>S. ambivalens</i>; <i>Thermoproteus tenax</i>; <i>Thermoplasma acidophilum</i> Halofilik: <i>Actinopolyspora halophila</i>; <i>Chromohalobacter israelensis</i>; <i>Desulfovibrio halophilus</i>; <i>Rhodothermus obamensis</i>; <i>Natrialba magadii</i>
sucrose 	Haloterant: çeşitli cyanobakteri (<i>Synechocystis</i> sp. strain PCC 6803, <i>Anabaena</i> spp.) ve proteobakteri
N-α-carbamoyl-L-glutamine 1-amide 	Halofilik: <i>Ectothiorhodospira mobilis</i> (marismortui)
N-acetylglutaminylgutamine amide 	Halotolerant: <i>Sinorhizobium meliloti</i>; <i>Rhizobium leguminosarum</i>; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 Halofilik: mor kükürt bakterileri

Şekil 2.4. Bakteri ve Archaeada tespit edilen yüksüz organik ozmolitler (Roberts, 2005)

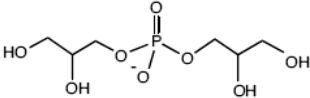
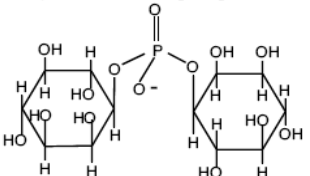
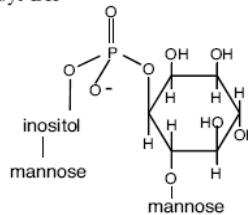
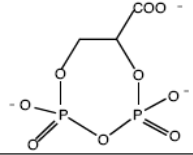
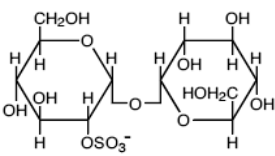
C. Organik Anyonlar

Hücre içinde negatif bir potansiyel ve çoğunlukla yüksek hücre içi K^+ vardır. Negatif yüklü çözenler ozmotik basıncı önlemenin yanı sıra yüksek hücre içi K^+ 'a karşı denge sağlarlar. Bakteriler ve archaelarca

kullanılan anyonik çözenler negatif yük sağlayan karboksilat (Şekil 2.5) veya fosfat, sülfat grubu içerir (Şekil 2.6).

Anyonik ozmolitler(Karboksilat)	Organizma
L-α-glutamate 	Pekçok halotolerant bakteri ve metanogen Halofilik: <i>Halomonas elongata</i>; <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1; <i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 ve <i>H. salinarum</i>
β-glutamate 	Halotolerant: <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>; Methanocaldococcus jannaschii; <i>Methanotorris igneus</i> Halofilik: <i>Nocardiopsis halophila</i>
hydroxybutyrate 	Halotolerant: <i>Photobacterium profundum</i>
poly-β-hydroxybutyrate 	Halotolerant: <i>Photobacterium profundum</i> Halofilik: <i>Methylococcus marinus</i> and <i>M. terricola</i>
α-glucosylglycerate 	Halotolerant: <i>Agmenellum quadruplicatum</i>; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Halofilik: <i>Methanohalophilus portucalensis</i> FDF1
α-mannosylglycerate 	Halotolerant: <i>Methanothermus fervidus</i>; <i>Pyrococcus furiosus</i>; <i>Rhodothermus marinus</i> (<i>R. obamensis</i>)

Şekil 2.5. Bakteri ve Archeada tespit edilen karboksilatları içeren anyonik organik ozmolitler (Roberts, 2005)

Anyonik çözen(Sülfat, Fosfat)	Organizma
α-diglycerol phosphate 	Halotolerant: <i>Archaeoglobus fulgidus</i>
di-<i>myo</i>-inositol-1,1'-phosphate 	Halotolerant: <i>Archaeoglobus fulgidus</i> ; <i>Methanotorris igneus</i> ; <i>Pyrococcus furiosus</i> ve <i>P. woesei</i> ; <i>Pyrodictium occultum</i> ; <i>Thermotoga maritima</i>
mannosyl-DIP 	Halotolerant: <i>Thermotoga maritima</i> ve <i>T. neapolitana</i>
cyclic-2,3-diphosphoglycerate 	Halotolerant: <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> ; <i>Methanopyrus kandleri</i> ; <i>Methanothermus fervidus</i>
sulfotrehalose 	Halofilik: <i>Natronococcus occultus</i> ; <i>Natronobacterium</i> spp.

Şekil 2.6. Bakteri ve Archaeada Fosfat ve sülfat kısımları içeren anyonik organik ozmolitler (Roberts, 2005)

D. K⁺ ve Diğer İnorganik Anyonlar

Halofiller arasında ozmotik denge için sadece inorganik iyonları kullananlarda vardır.

Halofilik aerobik archaeanın hücre içinde yüksek oranda K^+ ve Cl^- a sahip olduğu gösterilmiştir. Yüksek hücre içi K^+ içeren bakteriler de bilinmektedir. *Salinibacter ruber* zorunlu aerobik kemoorganotrofik halofilik bakteridir ve K^+ , 11-15 μ mol K^+ /mg protein oranında ana ozmotik denge bileşenidir. Organik çözenler bu organizmalarda göreceli olarak düşüktür (Roberts, 2005).

Ozmotik denge için organik ozmolitleri kullanmayan diğer mikroorganizmalar *Halobacteroidaceae* ve *Haloanarobiaceae* familyasının anaerobik fermentatif üyeleridir. *Halobacterium salinarum*, 12 μ mol K^+ /mg protein akümüle ettiği rapor edilmiştir. *H. salinarum* için 2.75 μ l/mg protein hücre hacmi kullanarak ölçülen hücre içi K^+ değeri 4.4-4.8 M iken, *S. ruber* için yaklaşık 1M).

Archaeal halofillerin aksine halofilik bakteriler çok yüksek K^+ biriktirmezler. Örneğin; *Halomonas elongata* maya özütünde büyütüldüğünde 1.1 μ mol K^+ /mg protein, karbon kaynağı olarak glukozlu ortamda büyütüldüğünde 2.2 μ mol K^+ /mg protein biriktirir.

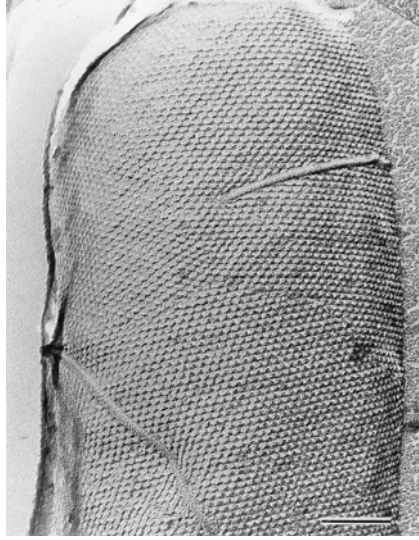
K^+ (bazen Na^+) ana hücre içi katyon olmasına rağmen bazı hücrelerde (denizel bakteriler) düşük çözünürlükteki organik karbon varlığında 0,9M'a yakın Mg^{+2} biriktirdiği görülmüştür (Roberts, 2005).

2.3.Halofilik Archaea Hücresel Yapıları

2.3.1.Halofilik Archaeada Hücre Duvarı

Kokkoid genuslar *Halococcus*, *Natronococcus* yapısal kararlılık için yüksek tuz konsantrasyonlarına ihtiyaç duymayan ince sert bir hücre

duvar yapısı sergilerken (Şekil 2.8) *Halobacteriaceae* familyasının diğer üyeleri büyük glikoprotein altbirimlerinden oluşan hücre duvarına sahiptir. Bu tabaka eukaryotik proteoglikana benzer olan S tabakasıdır (Şekil 2.7). S tabakası sülfat gruplarından dolayı negatif yüklüdür ve yapısal bütünlük için yüksek seviyede (+) iyonlara ihtiyaç gösterir. Hücre yüzeyindeki negatif yükün yoğunluğu ve halofilik türlerin sahip olduğu halofili derecesi arasında korelasyon vardır (Horikoshi and Grant, 1998).

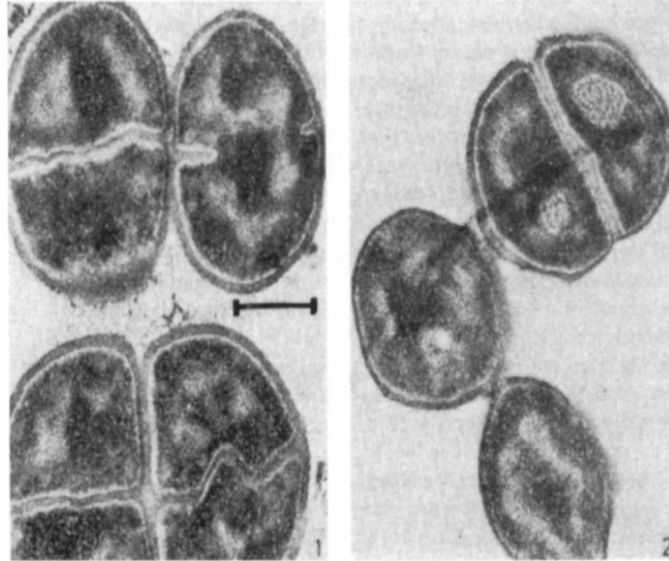


Şekil 2.7. Hekzagonal düzenlenmiş S-tabakası (Sara and Sleytr, 2000)

Halobacterium hücre duvarında normal duvar bileşenlerinin yokluğu (D-aminoasit ve teikoik asit) Archaea domaini tanımlandığında bulunmuştur. Glikoprotein tabakası basil (*Halobacterium*), yassı disk veya üçgen (*Haloferax* and *Haloarcula*) şekilli hücrelerin yapı kararlılığını sürdürmesi için gereklidir. Proteinlerin difitanilgliserilfosfat ile modifikasyonlarının yanı sıra sülfatlanmış şeker grupları ile yerdeğiştirmesi elektroforetik hareketliliği azaltır. *Halobacterium*

salinarum'da glikoproteinlerin karbohidrat içeriği % 10-12 dir (Oren, 2002). Glikoprotein 87kDa asidik aminoasitlerce zengin öz (temel) proteini içerir.

Halobacterium glikoproteinleri yapısal kararlılık için yüksek oranda NaCl' e ihtiyaç duyarlar. Düşük tuz içerikli çözeltilerle muamele edildiklerinde duvar proteinleri denatüre olur buda hücre ölümüne neden olmaktadır. Ancak NaCl yanında yine yüksek oranda magnezyum ve diğer divalent katyonlara da ihtiyaç vardır. Magnezyumca eksik çözeltilerde kok şekline dönüşüm gözlenen türler vardır (*Haloarcula marismortui*, *Haloferax volcanii* ve *Haloarcula japonica*). Hücre duvarını korumak için gerekli magnezyum konsantrasyonu 20-50mM kadar olabilmektedir. Küre oluşumu EDTA ilavesiyle azaltılabilir.



Şekil 2.8. *Halococcus morrhuae* strain 24' e ait ince duvar yapısı. Bar 0,5µm (Steensland and Larsen, 1971)

2.3.2. Halofilik Archaeada Hücre Dışı Kapsül

Halofilik archaeanın birkaç türü hücre duvarının dışında polisakkarit yapıda kapsül depo eder. *Haloferax mediterranei* ile yapılan araştırmalarda hücre dışı cıvık tabakanın çoğunlukla mannoz içerdiği gösterilmiştir. Amino şekerler üronik asitlerin yanı sıra glukoz, galaktoz ve diğer şekerler de tayin edilmiştir.

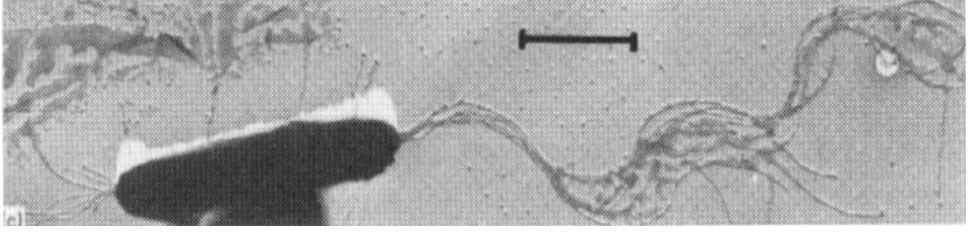
Haloferax gibbonsii de rastlanan polisakkarit yapısı biraz farklıdır. *Haloferax volcanii*'nin az miktarda heksuronik asitle beraber mannoz içerdiği görülmüştür. Sülfat grupları da bulunur. *Haloarcula* izolatları ise asidik hücre dışı polisakkarit üretir. Bazı hücre dışı polimerler biyoteknolojik öneme sahiptir (Oren, 2002).

2.3.3. Halofilik Archaea Flajeli

Halobacteriales üyelerinin çoğu flajellerinden dolayı hareketlidir. Halobakteriyel flajel bakteri flajelinin aksine sağ-el helix yapısına sahiptir.

Halobacterium salinarum'da hareketlilik yoğun olarak çalışılmıştır (Şekil 2.9). Organizma exponansiyel büyüme fazında monopolar flajele sahipken, stasyonier fazda bipolar flajele sahiptir.

SDS poliakrilamid jel elektroforeziyle yapılan çalışmalarda flajelin üç protein içerdiği görülmüştür. Bu üç Flajellin proteini sülfatlanmış oligosakkarit içeren glikoproteinle ilişkilidir. Flajellin *Halobacterium salinarum* hücre zarındaki glikoproteine benzerlik gösterir.



Şekil 2.9. *Halobacterium salinarum* bipolar flajel. Bar 1µm. (Alam et al, 1984)

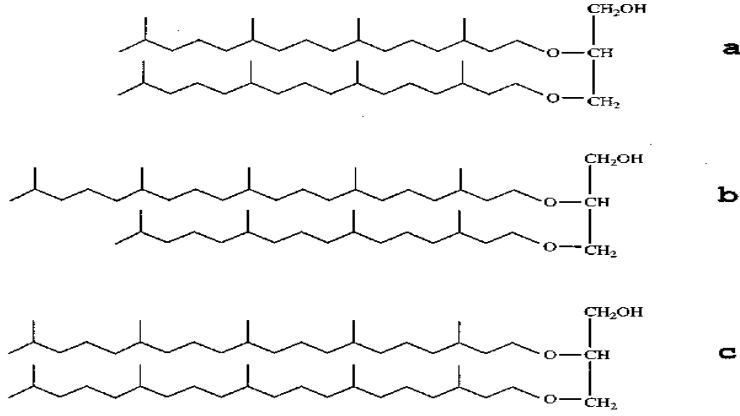
Halofilik Archaea flajeli saat yönü ile ileri yönde saat yönünün tersi yönde hareket ile geriye doğru bir hareket yapar. *Halobacterium* strain NRC-1 genomunda en az 17 tane homolog metil yakalayıcı protein, 6 cevap düzenleyici gen ve 14 histidin-kinaz kodlayan gen içermektedir (Oren, 2002).

2.3.4. Sitoplazmik Zar ve Lipidleri

Sitoplazmik membran protein ve lipidlerden oluşur. Solunum elektron taşınımı, içeri ve dışarı doğru iyon taşınımı, besinler, hücre dışı çevre hakkında bilgi sağlayan sensörler ve transducerları ve daha pek çok bileşeni içermektedir. Retinal iyon pompaları bakteriyorodopsin ve halorodopsin pek çok halofilik archaeada sitoplazmik zarda bulunur.

Halobacteriaceae üyeleri lipidlere eter bağlarıyla bağlanan, dallanmış 20 karbonlu (fitanil), bazende 25 karbonlu (sesterpanil) zincirlerinden oluşan archeaya özgü lipidlere sahiptir. Halobacteriaceae familyasında çoğu polar lipid yapısını oluşturan dieter kor lipid 2,3-di-O-phytanyl-*sn*-glycerol (C₂₀-C₂₀) dür. Bununla beraber bazı türler asimetrik 2-O-sesterterpanyl-3-O-phytanyl-*sn*-glycerol içerir (C₂₅-C₂₀) (Şekil 2.10) Bazı durumlarda (C₂₅-C₂₅) 2,3-di-Osesterterpanyl-*sn*-glycerol bulunur.

C_{20} - C_{20} , C_{25} - C_{20} ana lipidlerin dağılımı türden türe değişir. Haloalkalifilik strain SP8'in lipidlerinin % 9'u C_{20} - C_{20} , % 85'i C_{25} - C_{20} ve % 6'sı C_{25} - C_{25} dir. C_{20} - C_{20} ve C_{25} - C_{20} oranı büyüme koşullarına da bağlıdır. *Natronobacterium gregoryi* ve *Natrialba magadii* artan tuz koşullarında büyütüldüğünde lipidlerdeki C_{25} - C_{20} oranı artar.



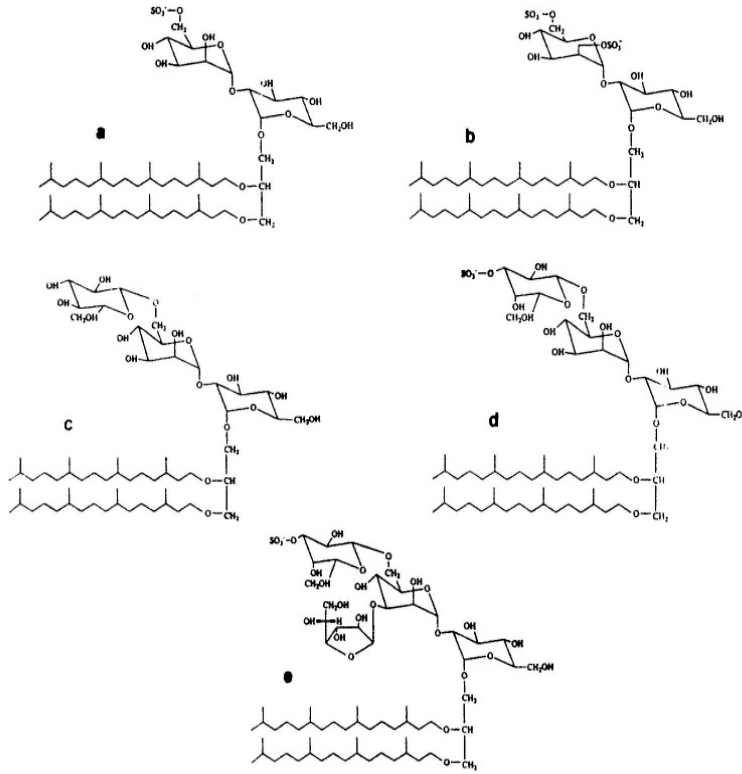
Şekil 2.10. Halobacteriaceae familyasındaki ana lipid yapıları (a) C_{20} - C_{20} 2,3-di-O-phytanyl-*sn*-glycerol (b), 2-O-sesterterpanyl-3-O-phytanyl-*sn*-glycerol (C_{25} , C_{20}) (c) 2,3-di-O-sesterterpanyl-*sn*-glycerol (C_{25} , C_{25}) (Oren 2002).

Hidrofobik izoprenoid zincileri tamamen doymuş olmasına karşın, Antartika Deep Lake'den izole edilen ve 4°C'nin altında gelişen *Halorubrum lacusprofundi*'de doymamış fitanil zincileri bulunur. Karbon zincirlerindeki çift bağlar düşük sıcaklıklarda membran akışkanlığını kontrol edebilmek için önemlidir.

Fosfolipid, sülfolipid ve glikolipid içeren polar lipidlere *Halobacteriaceae* familyasının çeşitli temsilcilerinde rastlanır. Bütün bilinen türler PG ve Me-PGP'nin dieter türevlerini içerir.

Fosfotidilgliserosülfat (PGS) çoğunlukla nötrofilik türlerde mevcuttur, alkalifilik türler ise bunların olmayışıyla karakterizedir.

Halobacteriales ordosu üyelerinde çeşitli glikolipidler tanımlanmıştır (Şekil 2.11). Bunlar di-, tri-, tetraglikozil dieter lipidlerini içerir.



Şekil 2.11. Halobacteriales ordosunda görülen glikolipid yapıları a) *Haloferax* ve diğer türlerden S-DGD-1 b) *Natrionalba asiatica* S₂-DGD-1 c) *Haloarcula* TGD-2 ve d) S-TGD-1 e) *Halobacterium* S-TeGD

Halobacteriaceae familyasında nötral lipidler toplam lipid içeriğinin % 10'unu oluşturur (Oren 2002).

- Karetenoidler
- Kinonlar
- C20 izopirenoid lipidleri: geranilgeraniyol
- Nötral gliserol fitanil eterleri

2.3.5. Depo Materyalleri

Halobacteriaceae'nin bazı üyeleri depo polimeri olan PHA (poli- β -hidroksialkanoat) dır. *Haloferax mediterranei* asetat varlığında ve fosfat açlığında büyütüldüğünde büyük oranda PHA depolamaktadır. *Halobacterium salinarum*'da fosfor deposu olarak inorganik fosfat akümüasyonu mevcuttur (Oren, 2002).

2.4. Halofillerin Biyoteknolojik Potansiyelleri

Halotolerant veya halofilik mikroorganizmalar biyoteknolojinin çeşitli alanlarında potansiyel uygulamalara sahiptir. Bakteriyorodopsinin teknik uygulamalarının bazıları holografik depo materyali, uzaysal ışık modülatörleri, optik hesaplama ve optik hafıza olarak kullanımıdır. Biosürefektanlar ve ekzopolisakkaritler petrolün mikrobiyolojik geri kazanımı konusunda ilgi görmektedir. Diğer kullanışlı biyomalzemeler enzimlerdir örneğin; yüksek tuzda aktif olan yeni izomerazlar ve hidrolazlardır (Margesin and Schinner, 2001).

Diğer ekstremofillere nazaran daha kolay kültüre edilebilmeleri, aseptik koşullara olan ihtiyacın az olması halofilleri çok çalışılan ekstremofilik bir grup olarak ortaya çıkarmaktadır. Ekstremofillere alınan patentlerin %20'si halofillerle ilgilidir (Horikoshi and Grant, 1998).

2.4.1. Bakteriorodopsin

Bakteriorodopsin ışık aracılığı ile membrandan iyonların geçişine olanak sağlayan retinal bir pigmenttir. Bakteriorhodopsin dışarı e^- pompalayarak enerji elde edilmesini gerçekleştirir. Daha önce de belirtildiği gibi Halobacteria karanlıkta da iyi büyüyebildiği için bu sistemlerin bulunması zorunlu değildir. Halobacteria hakkında yapılan yayınların %10'u bu pigmentle ilgilidir. Bacteriopsin'inin yedi helixi kromofor retinali sarar ve bu protonlanmış şif bazıyla 216. lizine kovalent bağlıdır ($-CH=NH^+-CH_2-$). Bir ışık fotonunun adsorbsiyonu retinalde yapısal bir değişikliğe neden olur. Bu ise 85. konumdaki aspartat sayesinde şif bazından bir protonun kaybına yol açar. Retinalin sitoplazmaya bakan kısmında 96. konumdaki Aspartat protonun tekrar alınımına olanak sağlar ve retinal birkaç milisaniyede tekrar eski konumuna dönüşür (Şekil 2.12). Halorhodopsin mekanizmasında da retinal proteinlerle iyon translokasyonu arasında benzer bir mekanizma mevcuttur. Düşünülen bazı uygulamalar:

1. Fotoelektrik üretimi
2. Deniz suyundan tuzun uzaklaştırılması ile ilgili çalışmalar henüz uygulama alanı bulmamıştır

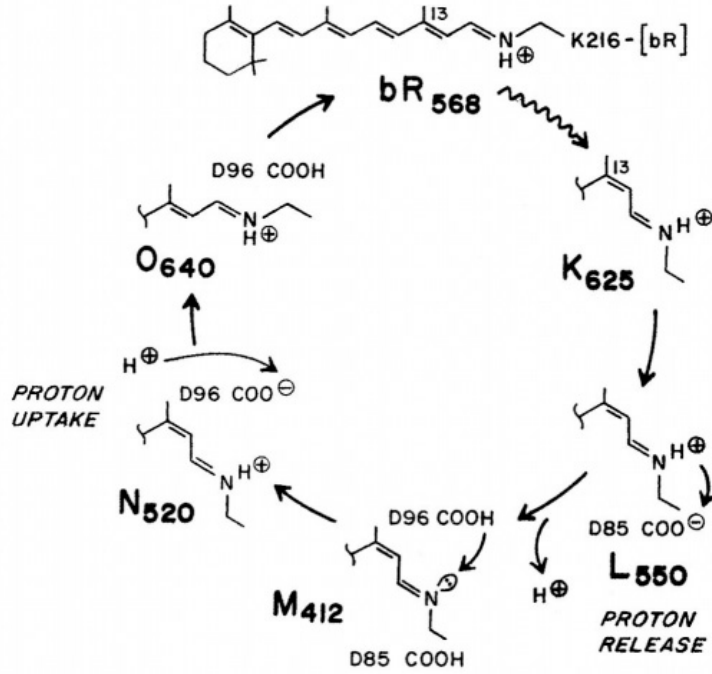
3. Halorhodopsinin Cl^- belirlenmesinde bir biyosensör olarak kullanımı

Bakteriorhodopsin molekülünün en ilgi çeken uygulaması ise elektronikte olmuştur.

Molekül foton döngüsü esnasında mor-yeşil arasında renk değiştirir. Bu renk dönüşümü klasik fotografik filmlerdekine benzer bir yol ile bilgi saklama ve bilginin işlenmesinde kullanılan bir halografik ortamın geliştirilmesinde kullanılabilir. Bu tip materyaller katı yüzeylerde immobilize edilebilir ve bakteriorhodopsin içeren membranlar ticari olarak üretilmektedir. Bu şekilde üretilen filmler banyo edilmesine gerek olmadığı gibi birçok kez kullanılabilir. Ayrıca özel uygulamalar için kinetiği değiştirilmiş mutant kromoforlarda dizayn edilebilir (Horikoshi and Grant, 1998).

Bakteriorhodopsindeki yapısal değişiklik aynı zamanda bir yük ayrımı ile de sonuçlanır, bu durum uygun bir elektrod ile algılanan bir elektrik sinyalinin oluşmasına neden olur. Bu teknoloji ile elektrik yerine ışık ile kapanıp açılabilen mikroçiplerin yapımında da kullanılabilir ve bu molekül aşırı ısı ve pH değişimlerinde kararlıdır. Uzun vadeli birkaç kullanım alanı ise;

- 1- Holografik teknoloji ile endüstriyel robotların görme yeteneklerinin artırılması
- 2- Işık enerjisinin elektrik enerjisine dönüştürülmesidir.



Şekil 2.12. Bakteriorodopsinin fotodöngüsü ve proton yer değişiminin mekanizması
(Krebs and Khorona, 1993)

2.4.2. Biyopolimerler

Bazı araştırmacılar *Alcanigenes eutrophus* PHA'sına göre *Halobacteria* PHA'sının daha avantajlı olduğunu belirlemişlerdir. Ancak şu an PHA üretimi ekonomikliği nedeniyle *A. eutrophus* ile daha avantajlıdır. Bakteriyel polihidroksialkanoatlar canlıya uygundur, ameliyat ipliği yapımında avantajları vardır.

Halobacteria petrol geri kazanımının arttırılmasında bir yardımcı olarak uygun sıvısal özelliklere sahip potansiyel polimerlerinde üreticisidir. Bu polimerler kısmen karakterize edilmiştir, ancak bu

polimerlerin büyüme ortamına bağlı olarak glukoz, galaktoz ve mannoz içeren oldukça yüksek oranda sülfatlanmış ve asidik karakterde olabileceği belirtilmektedir. Polimer sadece yüksek tuz konsantrasyonlarına değil sıcaklığa ve pH'ya da dayanıklıdır.

2.4.3. Tıp

84 k-DA bir *Halobacteria* proteini kanser hastalarında myc onkogene karşı üretilen antikorları saptamak için kullanılmaktadır. Şaşırtıcı şekilde halobakteriyel protein *E. coli*'de üretilen myc proteininden daha etkilidir. Etkinin temeli ise halobakteri ile ökaryotların bakterilere göre daha yakın evrimsel benzerlikleridir (Horikoshi and Grant, 1998).

Halobacterium GRB-1, ökaryotik tip DNA topoizomerazları ve girazları etkileyen yeni anti-tümör taramasında kullanılabilen bir plazmid içermektedir.

Lipozomlar, tıpta ve kozmetikte bileşiklerin vücuttaki spesifik bir hedef bölgeye aktarımı için kullanılır (Margesin and Schinner, 2001). Eter bağlı archaeal lipidler kimyasallara ve esterazlara karşı yağ asidi türevlerinden daha dayanıklıdırlar (Margesin and Schinner, 2001; Horikoshi and Grant, 1998). Eter lipozomları fosfolipaz A2 ve B' ye dayanıklı ayrıca açık havada en az 60 gün saklanabilir (Margesin and Schinner, 2001) . Archaeal lipozomların (archaeosomes) mikrobiyal ve viral kontaminatları otoklavlamayla uzaklaştırılabilir (Horikoshi and Grant, 1998).

Epipodophyllotoxin VP16, ökaryotik DNA topoizomeraz II inhibitörüdür ve ökaryotların yanı sıra *Halobacterium*'da DNA-protein kovalent bağıyla DNA iplik kırıklarını indükler. Bu da ökaryotik proteinler üzerinde aktif olan antitümör ilaçlarının ön incelenmelerinde halofilik archaeanın kullanılabilirliğini önermektedir (Oren, 2002).

Halofilik archaeanın bazı insan membran proteinlerinin ifadesi için uygunluğu kanıtlayabilmektedir; insan β_2 -adenoreseptörü , yedi transmembran heliks proteini bakteriopsin regülatör elementlerinin kontrolü altında adenereseptörlerin ifadesi için, ifade vektörü kullanılarak *Halobacterium salinarum*'da klonlanmıştır (Söhlemann et al., 1997).

2.4.4. Dengeleyici Çözgen

Ozmolitler; proteinlerdeki su katmanının etken bir stabilizatörüdür. Oldukça yüksek oranda etkili stres koruyucusu olup, dolapta saklanması mümkün olmayan aşılarda ve ekstrem koşullarda çalışan endüstriyel enzimler için stabilizatörlerdir. Bazı enzimlerin dengeleyici çözgen varlığında ısıtma, dondurma ve çözmeye karşı korumalı olduğu gösterilmiştir. Kullanılan dengeleyici çözgen ve araştırılan enzime bağlı olarak ısı veya dondurma ile koruma derecesinde büyük farklılıklar vardır. Genel bir kural konmadan önce mutlaka korunacak olan bileşik sınıfı ve dengeleyici çözgen çeşitleri arasında bir korelasyon kurulması şarttır (Horikoshi ve Grant, 1998).

2.4.5. Enzimler

Çoğu halofilik enzimler 1M NaCl altında ki konsantrasyonlarda inaktif ve denatüre olur. Yüksek tuz konsantrasyonlarında çözünebilir olduklarından standart kromatografik prosedürlerin kullanımını zorlaştırır (Margesin and Schinner, 2001).

Halofilik enzim stabilitesinin, aktivitesi ve çözünürlüğünü belirlemeye yönelik çalışmalar yoğun olmasına karşın halofilik extremozimlerin potansiyel kullanımına dair gelişim azdır. Haloarchaeal extremozimler tuza son derece dayanıklı olmalarının yanı sıra çevrelerindeki uzun süreli yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı yani termotolerantlardır. Dahası, halofilik enzimler tuzla zenginleştirilmiş koruma kalkanına sahiptir ki, düşük su aktivitesi, yüksek organik solvent seviyelerinde katalitik aktivitelerini sürdürmektedirler. Bu özellikler birçok uygulama için ilgi çekicidir. Bununla beraber haloarchaea ait ticari değere sahip extremozim örnekleri vardır (Eichler, 2001) . Laboratuvar kullanımı açısından halofilik archaea *Halococcus* cinsine ait bir türden elde edilen restriksiyon enzimine dair patent alınmıştır (Oren, 2002).

Çoğu halofilik archaea yüksek tuzda aktivite gösteren amilaz, amiloglukozidaz, proteaz ve lipaz gibi ekzoenzim üretir. Bu tür enzimler yüksek tuz varlığında parçalanması gereken makromoleküller için bir kullanım alanı oluşturur (Oren, 2002).

Düşük tuzda aktivitesini kaybeden pek çok haloarchaeal proteaz örneğine karşın, *Natronomonas pharaonis* tarafından üretilen 61 °C'de

pH 10'da optimum aktiviteye sahip kimotripsinojen B-benzeri proteaz, 3mM kadar düşük tuz konsantrasyonunda işlevini sürdürmektedir. Bu özellikler bu tür ekstremozimlerin deterjan katkı maddesi olarak kullanışlı olduklarını öne sürmektedir (Eichler, 2001).

Siklofilin tip peptidil proлил *cis-trans* izomeraz üretimi *Halobacterium salinarum* genomundan gen çoğaltımı kullanılarak patentlenmiştir (Oren, 2002).

Ilımlı halofil olan *Halomonas meridiana* DSM 5425'den ekstraselüler amilaz kodlayan gen, *AmyH*, izole edilmiş klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu gen *Halomonas elongata*'da fonksiyoneldir ve *E. coli*'de klonlandığında *H. meridiana* ve *H. elongata*, *Bacillus licheniformis*'den ısı kararlı alfa amilaz üretebilmiştir. Bu sonuç göstermiştir ki; *Halomonas* cinsi üyeleri heterelog ekstraselüler enzim üretimi için *E. coli* benzer şekilde kompetan hücre olarak kullanılabilir (Margesin ve Schinner, 2001).

Biyoteknoloji endüstrisi için; endonukleazlar hariç diğer enzimler uygulamalarda pek önem görmemiştir. Halofil enzimleri daha çok bilimsel çalışmalarda gen kaynağı olarak kullanılmış ve enzim ile ilgili genler değişik vektörlerde ifade edilerek yapı-fonksiyon ilişkileri incelenmesinde kullanılmıştır (Horikoshi and Grant, 1998).

2.5.Enzimlerin Halofilik Adaptasyonları

2.5.1.Halofilik Enzim Nedir?

Yunanca kökenli *hals*; tuz ve *phile* ise sevmek anlamına gelmektedir ve halofilik fonksiyon için tuza olan ihtiyacı ifade eder. Halofilik enzimler toplandıkları organizmanın halofilliğine veya aktiviteleri, stabiliteleri ve çözünübilirlikleri için gerekli tuza göre tanımlanırlar (Madern et al., 2000).

2.5.2.Halofilik Proteinlerin Aminoasit Kompozisyonu

Yapılan aminoasit kompozisyonu tayinleri göstermiştir ki; halofilik enzimler halofilik olmayan homologlarına göre daha fazla asidik aminoasit kompozisyonuna sahiptir. 26 çözünübilir protein üzerinde yapılan istatistiksel çalışmalar da bunu desteklemiştir ve düşük lizin içeriği, hidrofobik rezidülerde artış (Gly, Ala, Val) ve alifatik rezidülerde azalma gözlenmiştir.

Halofilik proteinler yüksek sitoplazmik KCl konsantrasyonlarında stabil ve çözünübilir olmalarını sağlayan spesifik mekanizmalar içerir. Bu adaptasyon mekanizmaları çözgen etkileşimlerine ve halofilik proteinlerin 3 boyutlu yapılarına aktarılır. Stabilitate ve aktivite tamamen çözgen çevresine bağlı olan protein dinamiği ile ilişkilidir. Nötron fırlatımıyla oluşan tuz durumunun fonksiyonu gibi halofilik protein dinamiği halen araştırma konusudur (Madern et al, 2000).

2.5.3. Halofilik Enzim Çözünürlüğü

Halofilik enzimler hayli konsantre NaCl çözeltilerinde çözünebilir, buda klasik kromatografik yöntemlerin uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Sepharose 4B matrix kolonunda proteinleri sabitlemek için yüksek amonyum sülfat (AS) konsantrasyonu, elusyonları için azalan amonyum sülfat konsantrasyonu gradienti kullanılır, bu yöntem şimdilerde çeşitli halofilik proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Halofilik proteinlerin *E. coli*'de ekspresyonu yapıldığında, amonyum sülfat konakçı proteinlerin çoğunu çöktürür ki bu saflaştırma için bir avantajdır (Madern et al, 2000).

2.5.4. Ekstraselüler Proteazlar

Proteazlar anormal proteinlerin parçalanması transkripsiyon faktörlerinin işlenmesinde farklılaşmada hücre döngüsü regülasyonunda ve apoptoziste yer alırlar. Ek olarak biyoteknolojik ve endüstride önemli uygulamaları vardır. Proteolizis bakterilerde ve ökaryotlarda çok çalışılmış olmasına rağmen archaeadaki protein parçalanması çok az bilinmektedir. Bir çok archaea çoğu hücrenin ölümüne neden olabilecek koşullarda yaşayabilmektedir, buda onları temel mikrobiyoloji ve enzimolojinin biyoteknolojiye uygulanmasında proteaz kaynağı yapmaktadır.

Birçok haloarchaea proteolitik enzim salgılar. Bu hücre dışı proteazlar saflaştırılmış ve çizelge 2.1'de karakterize edilmiştir. Bu proteazlar 40-66 kDa'dur ve nötrofilik haloarchaea olan *Halobacterium salinarum* (*H. halobium*), *Nab. asiatica* ve *Haloferax mediterranei* ve R4 'den izole edilmiştir. Bu proteazların çoğu yapısal stabilize için yüksek

tuz konsantrasyonuna bağımlıdır ve yüksek tuz, bazık pH ve 50°C veya daha yüksek sıcaklıkta optimum aktivite gösterir (De Castro et al., 2005).

Haloarchaeadan izole edilen proteazların tümü serin proteazdır ve çoğu subtilisin benzeri serin proteaz alt ailesi S8A ile ilişkili görülmektedir. Bunu destekleyen kanıt serin proteaz inhibitörleriyle enzim aktivitesinin düşmesidir (PMSF (fenilmetil sülfanil florid, diizopropil florofosfatlar) ve subtilisin-spesifik inhibitörleri (streptomyces subtilisin inhibitörü, ovomucoid)).

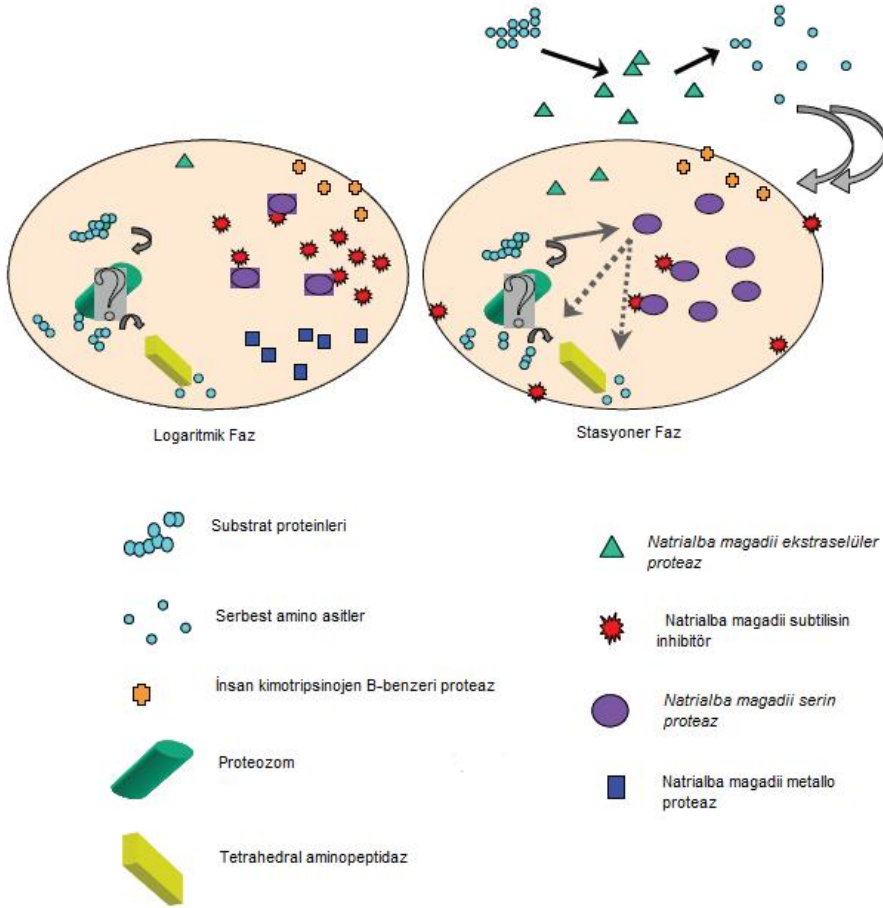
Son zamanlarda, stasyoner faz kültüründen değişik tipte 130kDa'luk (*Ncc. occultus*) serin proteaz saflaştırılmıştır. *Ncc. occultus*'un proteazının öncül ve aktif formları hücrede ve kültür ortamında tespit edilmiştir. EP aktivasyonu otokatalik olabilir bununla beraber bu proses için stasyoner faz hücrelerinin olduğu ortamda bazı faktörler gereklidir (Şekil 2.13). *Ncc. occultus* EP'ları diğer halofilik archaeanın ekstraselüler proteazları ile birkaç biyokimyasal özelliği paylaşır. Bunlar; serin proteaz inhibitörlerine duyarlılık, kimotripsin benzeri aktivite, aktivite ve stabilite için yüksek tuza bağımlılıktır (De Castro et al., 2005).

Haloarchaeaların ortama ekstraselüler proteaz salgılama mekanizmaları hakkında tam bir bilgi yoktur ancak protein sekresyonu için genellikle sekresyon (sec) ve twin-arjinin-transport (Tat) yollizleri tespit edilmiştir. *İn silico* analizler ise *Halobacterium sp.* NRC-1'de ana protein sekresyonunun Tat yoliziyle olduğunu desteklemiştir. Tat yol izinin kullanımı haloarchaealar için bir avantajdır çünkü yüksek KCl konsantrasyonuna sahip sitoplazmik ortamda proteinlerin katlanıp yüksek NaCl içeren dış ortama salınımına imkan sağlamaktadır. (De Castro et al., 2005).

Çizelge 2.1. Haloarchaeadan izole edilen hücre dışı proteazlar

Haloarchaeon	Proteaz, Nükleofil Aktif Bölge	Optimum			Substrat, aktivite	M_r (kDa)	Bileşik (+/-)	Protein sekansı *
		NaCl (M)	Temp (°C)	pH				
<i>Haloerobacterium</i>								
<i>Haloerobacterium salinarum</i> IM	TE	3-4	TE	8	Kazein, jelatin	TE	TE	TE
<i>Haloerobacterium salinarum</i> P-535	Subtilisin benzeri, Ser	> 2	37	8-9	Azokazein, CL	41	(-) PMSF, DPP, SSI ve diğerleri	TE
<i>Haloerobacterium salinarum</i> ATCC43214	Ser	4	TE	TE	Gly in P'1	66	(-) PMSF	TE
<i>Haloerobacterium TuA4</i>	ESR4, Ser	> 0.3	TE	TE	Azokazein	60	(-) PMSF, DPP, leupeptin	TE
<i>Halobacterium</i> 172 P1	Halolizin 172P1 veya FII proteaz, Ser	2	75-80	10.7	Azokazein, CL	46	(-) PMSF, chymostatin	A42605
<i>Halobacterium mediterranei</i> VKM-B 1538	Halolizin ; Ser	> 2	55	8-8.5	Insulin β -zincir, CL	41	(-) PMSF, DPP, ovomucoid	N-term. sekans
<i>Halobacterium mediterranei</i> ATCC3350 (strain R4)	Halolizin R4, Ser	3-4.3	TE	TE	Azokazein, CL	41	(-) PMSF, chymostatin	S71451
<i>Haloalkalifilium</i>								
<i>Haloalkalifilium strain A2</i>	Ser	> 0.3	50	9	TE	49	(-) PMSF, DPP	TE
<i>Nitrospira occulta</i>	EP, Ser	1-2	60	7-9	Azokazein, Jelatin CL	130	(-) PMSF, chymostatin	TE
<i>Nitrospira magadii</i>	Halolysin, Ser	1.5	60	8-10	Azokazein, Jelatin CL	45	(-) PMSF, DPP, chymostatin, SDS, üre guanidine HCl; (+) DTT, 2-mercaptoethanol	AAV 66536

CL : Kimotripsin benzeri aktivite, TE : Tayin edilememiştir



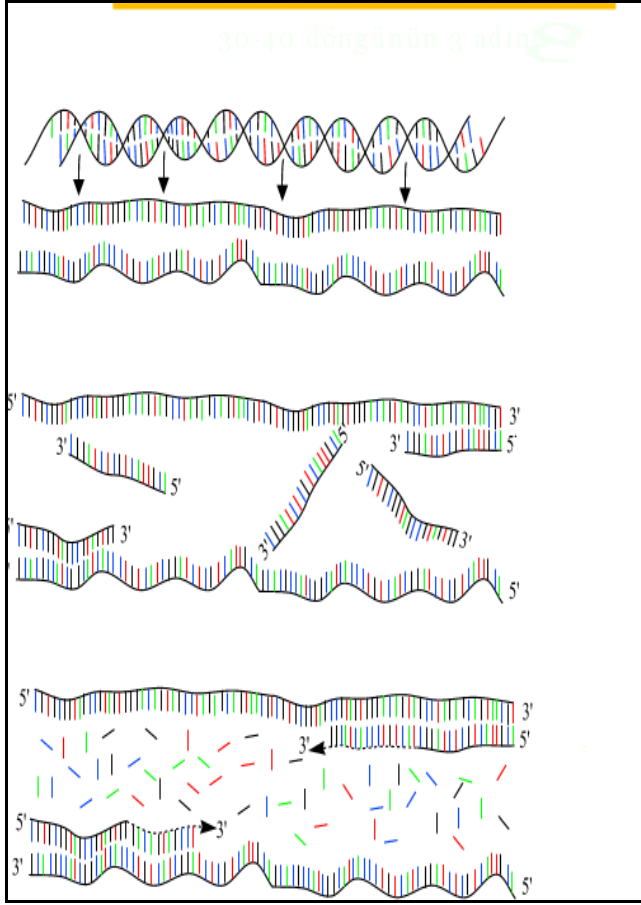
Şekil 2.13. Farklı büyüme koşullarında proteolitik enzimlerin şematik sunumu(De Castro, 2006)

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Amplimer olarak da denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle

melezlenirler. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksi trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentzlenmiş olur. Bir PCR dönüğü denatürasyon, primerin bağlanması, uzama olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar (Şekil 2.14). Potansiyel olarak her dönüğün % 100 verimle gerçekleştiği varsayılırsa, örneğin 20 dönü sonucu 2^{20} kat ürün meydana gelir.

PCR verimini etkileyen önemli faktör DNA polimeraz enzimidir. Normalde enzim miktarı 20-30 PCR dönüğü sonucunda hedef dizi artışı ve termal denatürasyon nedeniyle sınırlayıcı bir etken haline gelir. Verimliliği azaltan bir diğer faktörde konsantrasyonu artan hedef dizilerin primer ile bağlanma yarışıdır (Temizkan ve Arda, 2004).



Şekil 2.14. PZR şematik gösterimi(<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

2.7.16S rDNA Dizi Analizi

16S rDNA dizi analizi, DNA örneklerindeki baz dizilerinin sırasını ortaya çıkarmak için kullanılan bir genetik şifre çözme yöntemidir. Otomatik DNA dizi analizinde, Sanger tarafından geliştirilen enzimatik sentez yöntemi gelişmiş bir kapiller sisteme uyarlanmıştır. Boya terminasyon işaretleme adı verilen bir metod kullanılarak farklı bazlarda (A, G, T, C) sonlanan DNA sentez ürünlerine floresan işaretli boyalar

eklenir. Elektroforez, örnekler bir kapillerden geçirilirken uygulanır. Floresan işaretli boyaları uyarmak için bir lazer, boyaların yaydığı ışığı toplamak içinse bir CCD kamera kullanılır. Böylece, lazer uyarımının ardından dört boya tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık tek kulvarda ayırdedilebilir. Floresan miktarlarının ölçülmesi ve yorumlanmasının ardından DNA örneğindeki baz dizisi saptanır (<http://www.iontek.com.tr/>).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan besiyerleri ve kimyasallar

Çalışma süresince kullanılan NaCl Riedel-de Haën, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Carlo Erba, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Panreac, K_2HPO_4 Panreac, NaOH Tekim, KCl Carlo Erba, NaHCO_3 Sigma, DNaz agar Merck, Azokazein Sigma(A 2765) firmalarından sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar ise analitik saflıktadır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kiti (FastStart Taq DNAPolimerase dNTPack) Roche firmasından temin edilmiştir.

Besiyeri 1. SW-25	<u>g/litre</u>
NaCl	202,5
MgCl_2	17,5
MgSO_4	24
CaCl_2	0,9
KCl	5
NaHCO_3	0,15
NaBr	0,065
Maya Özütü	5
Agar:	20

Ortam pH'sı 1N NaOH ile 7,2'ye ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Pastör fırınında 180 °C'de steril edilmiş petri kaplarına 20 ml dağıtılarak kullanıma hazırlanmıştır. Ekstrem halofilik mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmıştır.

Besiyeri 2. SW-20	g/litre
NaCl	162
MgCl ₂	14
MgSO ₄	19,2
CaCl ₂	0,72
KCl	4
NaHCO ₃	0,12
NaBr	0,052
Maya Özü	5
Agar	20

Besiyeri pH'sı 1N NaOH 7,2'e ayarlanır ve otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edilmiştir. Pastör fırınında 180 °C'de 1 saat steril edilmiş petri kaplarına 20 ml dağıtılarak kullanıma hazırlanmıştır. Ekstrem halofilik mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmıştır.

Besiyeri 3. Proteaz Üretim Ortamı **g/litre**

NaCl	202,5
MgCl ₂	17,5
MgSO ₄	24
CaCl ₂	0,9
KCl	5
NaHCO ₃	0,15
NaBr	0,065
İndükleyici ajan	% 1

Ortam pH'sı 7,2'ye ayarlandıktan sonra 250 ml'lik erlenlere 50 ml dağıtılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Besiyeri 4. Halofilik Nutrient Jelatin Ortamı

Nutrient Jelatin **g/100ml**

Et ekstraktı	3
Pepton	5
Jelatin	12

Tuz İçeriği:

NaCl	16,2gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,94gr
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,096gr
KCl	0,4gr

Ticari Nutrient Jelatinin 12 gr'ı 100ml içinde çözölüp 50 derecede eritilerek tüplere paylaştırılıp ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

3.1.2. Örneklerin toplanması ve hazırlanması

Denemede kullanılan mikroorganizmaların izole edildiği toprak örnekleri Kasım ayında İzmir Çamaltı Tuzlası'nın iki farklı bölgesinden toprak 10cm kadar kazılarak alınmıştır. Alınan örnekler, steril kavanozlara aktararak labaratuvara ulaştırılmıştır.

3.1.3. Antibiyotikler

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için Disk çapları 6mm olan OXOID marka Novobiyosin (NV, 5 µg), Eritromisin (E, 15 µg) , Streptomisin (S, 10 µg) , Basitrasin (B, 0,04 U) , Penisilin G (P, 10 IU), Amfisilin (AM: 10 µg) , Tetrasiklin (TE, 30µg) antibiyotikleri kullanılmıştır.

3.1.4. Kimyasal çözeltiler ve tamponlar

3.1.4.1. Tromsdorf ayırıcı

% 20'lik 100 ml kaynayan ZnCl₂ çözeltisi 150 ml su içindeki 4 gr. Nişasta karşımına yavaşça ilave edilip karıştırılır. Kaynatmaya, nişasta mümkün olduğu kadar çözünönceye dek devam edilir. Daha sonra distile su ile seyreltilir ve ya 2 gr. Çinko İyodür yada Potasyum İyodür ilave edilir. Bundan sonra hacim 1000 ml'ye tamamlanarak filtre edilir ve karanlıkta sıkı kapaklı şişelerde stoklanır (Tamer vd., 1989).

3.1.4.2. α -Naftol çözeltisi

α -Naftol 5gr; Etanol (% 95) 100ml

α -Naftol etanolde çözülerek hazırlanır (Tamer vd., 1989).

3.1.4.3. Kovaks ayırıcı

Para-dimetil Aminobenzaldehit 5 gr; Amil veya butil alkol 75ml; % 37'lik HCl 25ml

Para-dimetil aminobenzaldehit alkolde çözülür. Solüsyon su banyosunda hafifçe ısıtılır. Bütün içerikler çözüldükten sonra HCl dikkatlice dökülür ve karıştırılır (Tamer vd., 1989).

3.1.4.4. Tetrametil p-fenilen daimin dihidroklorid çözeltisi

1 gr Tetrametil p-fenilen Daimin Dihidroklorid 10 ml distile suda çözülür (Tamer vd., 1989).

3.1.4.5. Safranin Boyası

Safranin	0,125 gr
----------	----------

Etanol (% 95'lik)	5 ml
-------------------	------

NaCl	5 gr
------	------

Distile su	50 ml
------------	-------

Safranin etanolde çözülür, distile su ilave edilerek iyice karıştırılır ve filtre edilir.

3.1.4.6. Kristal violet

Kristal Viole	0,125 gr
Etil alkol (% 95'lik)	10 ml
Amonyum oksalat	0,4 gr
NaCl	5 gr
Distile su	40 ml

10 ml etanolde 0,125gr Kristal Violet ve 40 ml tuzlu distile suda 0,4 gr amonyum okzalat çözülür bu çözelti alkolde çözünmüş olan Kristal Violetet ilave edilir (Tamer vd., 1989).

3.1.4.7. Gram iyodür (Lugol)

İyot	0,17 gr
KI	0,33 gr
NaCl	5 gr
Distile su	50 ml

İyot ve KI havanda iyice karıştırılarak toz haline getirilir. Üzerine yavaş yavaş su ilave edilerek iyice karıştırılır (Tamer vd., 1989).

3.1.4.8. % 2 Asetik asit

Asetik asit	1 gr
NaCl	5 gr

Distile su 50 ml

3.1.4.9. Tris-EDTA borik asit tamponu, pH 8.3 (5X/litre)

Trizma-base 54 gr

Borik asit 27.5gr

0,5M EDTA pH 8.0 20 ml

600 ml’de tüm maddeler çözülür ve 1000 ml’ye tamamlanır

3.1.4.10. Agaroz jel

DNA izolasyonunda 0,8 gr, PZR için 1,5 gr agaroz (Sigma) tartılıp 1X TBE (100ml) tamponu içerisinde kaynatma yoluyla çözdürülmüştür. Elle tutulabilecek sıcaklığa (55-50°C’de) düştüğünde özel damlalığı içinde bulunan (0,625mg/ml) etidyum bromürden 50ml’ye 1 damla olacak şekilde ilave edilmiştir. Kenarları kaplanmış yüzeye dökülerek taraklar yerleştirilerek donması beklenmiş, daha sonra taraklar çıkarılıp jel tanka yerleştirilmiştir. DNA örnekleri; 5µl DNA 3 µl brom fenol mavis; PZR örnekleri için, 6 µl PZR örneği 4 µl brom fenol mavis olacak şekilde yükleme yapılmıştır.

3.1.4.11. Brom Fenol Mavis

Sukroz 4gr

Brom fenol mavis 25mg

Distile su 10 ml

3.1.4.12. Tris- HCl pH 7.0 50mM

Trizma base 6,057 gr

Distile su 1000ml

Tris 800 ml içinde çözülür konsantre HCl ile pH ayarlanır ve 1000'ye tamamlanır.

3.2. Yöntem**3.2.1. Halofilik mikroorganizmaların izolasyonu**

Tuzladan alınan toprak örneklerinin her birinden 5'er gr alınarak 250 ml'lik erlenlerde 50 ml 5 adet sıvı SW-25 içeren ortamlara (Nieto et al., 1989'a göre modifiye edilmiştir) aktarılıp 40°C'de 120 rpm'de 7 gün çalkalamalı inkübatörde inkübe edilerek mikroorganizmaların bu ortamda gelişmeleri sağlanmıştır.

7 gün sonunda, SW-20, SW-25 agar besiyerlerine çizgi ekim tekniğiyle ekim yapılmış, petriler 40°C'de 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. Petriler kurumayı engellemek için su dolu kaba yerleştirilmişlerdir. Petrilerde oluşan halofilik üyeler koloni ve pigmentasyon özelliklerine göre lup yardımıyla seçilmiştir (Hezayen et al., 2002).

Saflaştırma sonucunda elde edilen 14 izolata numara verilmiştir (1-14) ve daha sonraki uygulamalar için yatık SW-25 besiyerinde 40°C’de 7 gün inkübe edilmiş ve +4 °C’de stoklanmışlardır. Stoklar, aşırı pasajlamanın genetik kararsızlığa neden olmasından dolayı 2 ayda bir yenilenmiştir. Uzun süreli stoklama için gliserol ve liyofilizasyon yöntemleri uygulanmıştır.

3.2.2. Mikroskopik inceleme

İzolatların mikroskopik kontrolleri için Olympus faz-kontrast mikroskopundan yararlanılmıştır.

3.2.2.1. Gram Boyama

Gram Boyama Dussault (1955) Gram boyama yöntemine göre yapılmıştır. 7 günlük gelişmiş sıvı kültürlerden hazırlanan preparatlar % 2 asetik asitle fiske edildikten sonra % 0,25’lik kristal viole boyasıyla 3 dakika boyanmış, % 95’lik etanolle 6 sn muamele edilmiştir. Ardından safraninle 30 sn boyama yapılarak immersiyon objektifi ile ışık mikroskopunda incelenmişlerdir. Yıkamalar % 10 tuzlu su ile yapılmıştır.

3.2.3. Stoklama

3.2.3.1. Gliserolde stoklama

Distile su ile % 20 konsantrasyonda hazırlanan gliserol otoklavda 121°C’de 15 dk. steril edilmiştir. Aktive edilen izolatlar 5000 rpm’de 10dk santrifüjlenerek süpernatant atılmış kalan pellete steril gliserol

  zeltisinden 750  l aktararak ependorflar -20  C'deki derin dondurucuya konulmuştur.

3.2.3.2. Liyofilizasyon

% 20 konsantrasyonda steril skim-milk 105 C'de 5 dk     n üst üste tindalizasyon yöntemi ile steril edilmiştir. Ependorflara 400  l skim-milk 100 l aktif kültür aşılanmıştır. Ependorflar -20 C'de tutulmuştur soğuk etanole yerleştirilip şok dondurma yapılmıştır ve örnekler etanolden alınıp liyofilizatörde kurutulmuştur.

3.2.4. Büyüme gereksinimleri

Testlerde SW-25 agar ve sıvı ortamları kullanılmış ve ortam pH'ları 7,2' ye ayarlanmış ve otoklavda 121 C'de 15 dk steril edilmişlerdir. Cam malzemeler ise; 180 C'de 1 saat pastör fırınında steril edilerek kullanılmışlardır.

3.2.4.1. Optimum NaCl konsantrasyonları

% 0, 5, 8, 10, 15, 20, 25 ,30 NaCl konsantrasyonuna sahip petrilere spotlama (10 l) yapılmış ve 40 C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir.

3.2.4.2. Büyüme için gerekli minumum maya özütü konsantrasyonu

% 0, % 0.1, % 0.01, % 0,5 konsantrasyonlarında maya özütü içeren SW-25 sıvı ortamlarına aşılanan organizmalar 40 C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir.

3.2.4.3. Minimum Mg⁺² ihtiyacı

% 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 3.2 konsantrasyonlarında MgCl₂ içeren SW-25 agar ortamlarına (MgSO₄ yerine Na₂SO₄ eklenmiştir) aşılanan organizmalar 40°C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir (Montalvo-Rodriguez et al., 1997).

3.2.4.4. Tek karbon kaynağında büyüme

% 0,01 maya özütü içeren SW-25 agar ortamına ortamdan ayrı olarak 0,22µm por çaplı şırınga filtre ile steril edilen karbon kaynakları % 1 oranında eklenmiştir. pH 7,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15dk. otoklavlanmıştır. Organizmalar ekilerek 40°C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir(Gruber et al, 2004, Stan-Lotter et al, 2002, Montalvo-Rodriguez, 1998).

3.2.4.5. Farklı azot kaynağında gelişme

Maya özütü içermeyen SW-25 agar içerisine % 0,67 (w/v) karbon base ortamı, % 1 azot kaynağı eklenmiş (soya pepton, et özütü, NH₃Cl) pH 7,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15dk. otoklavlanmıştır. Organizmalar ekildikten sonra 40°C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir.

3.2.4.6. pH ve sıcaklık toleransı

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 pH'larda hazırlanan SW-25 sıvı ortamlarına organizmalar aşılansarak 40°C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. Yine SW-25 sıvı ortamlarına aşılansan organizmalar 20, 27, 37, 40, 50°C'de 7 gün inkübe edilmiştir (Xin et al, 2000; Hezayen et al, 2002).

3.2.5. Antibiyotik duyarlılık testi

SW-25 agar ortamlarına OD₆₀₀ ~1 olan organizmalardan petriye 100µl aktarılıp steril eküvyonla yayma ekimleri yapılarak antibiyotik diskleri (6mm çapında) steril pens yardımıyla dizilmiş 40°C’de 7 gün inkübe edilerek inhibisyon zon çapları değerlendirilmiştir (Birbir ve Sesal, 2003, Montalvo-Rodriguez et al, 1998, Birbir ve ark, 2007) . 8mm altında inhibisyon zonuna sahip olanlar dirençli olarak değerlendirilmiştir (Asha et al, 2005). Tip tür olarak *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 kullanılmıştır.

3.2.6. Hücre Dışı Hidrolitik Ekstremozimlerin Taranması

3.2.6.1. Esteraz/Lipaz aktivitesi

SW-25 agar ortamına % 1 tween 80 eklenmiş ve organizmalar spotlanarak 40°C’de 7 gün inkübe edilmiştir. Koloni etrafında oluşan şeffaf zon esteraz aktivitesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

SW-25 agar ortamına 1ml rodamin B (% 0,001) ve 1 ml olive oil eklenmiş ve organizmalar spotlanarak 40°C’de 7 gün inkübe edilmiştir. U.V. altında portakal –kırmızı halo oluşumu gerçek lipaz aktivitesi için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Bhatnagar et al, 2005, Martin et al., 2003, Sanchez-Porro et al., 2003)

3.2.6.2. Amilaz aktivitesi

% 1 çözünür nişasta içeren SW-25 agar ortamına organizmalar spotlanarak ekilmiş ve 40°C’de 14 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon

sonunda petrilere lugol çözeltisi damlatılarak mavi renk oluşumu negatif sonuç, şeffaf zon ise pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Montalvo-Rodriguez et al, 1998, McGenity et al, 1998).

3.2.6.3. Selülaaz aktivitesi:

SW-25 agar ortamına 1 adet cellozyme tablet eklenmiş ve organizmalar spotlanarak 40°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Koloni etrafındaki renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Yaşa ve Kılınç, 2002).

3.2.6.4. DNaz

% 0,005 konsantrasyonda metil yeşili SW-25 ve DNaz agar içeren ortama katılmış ve besiyerine organizmalar spotlanarak 40°C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. Koloni etrafındaki sarı zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Elder et al., 1977).

DNaz agar: 4.2 gr 100 ml distile suya tartılıp mikrodalgada hafif kaynatılıp ve otoklavlanmıştır.

3.2.6.5. Jelatinaz

İğne ile ekimleri yapılan izolatlar 40°C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra 4°C'de 30 dakika bekletilip sıvılaşıma gözlenmiştir (Montalvo-Rodriguez et al., 1997).

3.2.6.6. Proteaz aktivitesinin taranması ve üretim koşulları

3.2.6.6.1. Proteaz aktivitesinin nitel taraması

Nitel proteaz aktivite taraması için, skim-milk ortamdan ayrı olarak üç gün üst üste 105°C’de 5 dk. tutularak otoklavlanmış ve SW-25 agar ortamına % 1 oranında eklenmiştir. İzolatlar 2 paralelli olacak şekilde spotlama yöntemiyle ekilmiş ve 40°C’de 7 gün inkübe edilmiştir. Kazein substratını parçalayarak açılma zonu oluşturan izolatlar proteaz üreticisi olarak değerlendirilmiştir (Kanlayakrit and Bovornreungroj , 2005).

3.2.6.6.2. Büyüme eğrisinin çıkarılması

Örnekler günlük olarak alınıp 10.000g’de santrifüjlenmiş, süpernatantları atılıp % 20 lik NaCl içeren steril solusyonla yıkanmış ve vortekslenip 600 nm’de ölçülmüştür (Kanlayakrit and Bovornreungroj., 2004, Kanlayakrit and Bovornreungroj, 2005).

3.2.6.6.3. Aktivite tayini

Proteaz aktivitesi sigma azokazein prosedürü modifiye edilerek tayin edilmiştir (Çizelge 3.1). Nitel aktivite taramasında tespit edilen 2 nolu izolat 10.000g’de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Üretim ortamı olarak % 0,5 maya özütü içeren SW-25 sıvı ortamı (pH 7.2) kullanılmış ve üretim 40°C’de 200 rpm çalkalamalı inkübatörde yapılmıştır. 1 Unit (U) aktivite reaksiyon koşullarında 440 nm’deki 0.01 birimlik absorbans artışı olarak belirlenmiştir. Daha sonraki aşamada besin, azot kaynaklarının ve NaCl konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine etkisi denenmiştir.

Çizelge 3.1.Azokazein proteaz aktivite ölçüm yöntemi

	Örnek	Kör
Azokazein (% 0.4, 2M NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.0)	500µl	500µl
40°C’de 10 dk inkübasyon		
Enzim	100µl	-
40°C’de 30 dk inkübasyon		
TCA (%20)	250µl	
Enzim		100µl
10.000g’de 10 dk santrifüj		
500 µl süpernatant		
NaOH (2M)	500µl	
440nm’de absorbans ölçümü		

Aktivite tayin hesabı şu şekilde yapılmıştır:

Aktivite(U/ml): $A_{440nm} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 10$

İnkübasyon süresi(dk)

3.2.6.6.4. Farklı besin ve azot kaynaklarının proteaz üretimine etkisi

Farklı besin ve azot kaynağı olarak maya özütü, NH_3Cl , pepton, üre, et özütü, tripton kullanılmış ve SW-25 büyüme ortamına % 1 oranında eklenmişlerdir. Üretim 40°C 'de 200 rpm'de gerçekleştirilmiştir (Vidyasagar et al., 2006).

3.2.6.6.5. NaCl Konsantrasyonlarının Proteaz Üretimine Etkisi

5M, 4,5M, 4M, 3,5M, 2M NaCl içeren SW broth üretim ortamlarında 40°C 'de 200 rpm'de üretilen 2 nolu izolatin aktivite tayini yapılmıştır (Vidyasagar et al., 2007, Kanlayakrit and Bovornreungroj 2005).

3.2.7. Biyokimyasal Testler

3.2.7.1. İndol Oluşumu

% 1 tripton içeren SW-25 sıvı ortamlarına organizmalar aşılanmış, 40°C 'de 7 gün inkübe edilmişlerdir ve tüplere 2-3 damla kovaks ayırıcı damlatılarak tüpün üst kısmında kırmızı halka oluşumu gözlenenler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Montalvo-Rodriguez et al., 1997.)

3.2.7.2. Nitrattan Nitrit Oluşumu

% 1 KNO_3 içeren SW-25 sıvı ortamlarına organizmalar aşılanmış, 40°C 'de inkübe edilmişlerdir. 5-10. günler arası tüplerden alınan 1 ml

örneğe 3 damla trommsdorf ayırıcı ve 1 damla sülfirik asit (1 kısım H_2SO_4 'e 3 kısım H_2O) damlatıldığında koyu mavi-siyah renk oluşumu nitrit varlığı için pozitif, nitrit negatif olan tüplere 1 damla alfa-naftol ve 2 damla konsantre sülfirik asit damlatıldığında koyu mavi-siyah renk oluşumu nitrat varlığı için pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Karaboz, 1988, Tamer ve ark., 1989, Birbir ve ark., 2004).

3.2.7.3. Nitrattan Gaz Oluşumu

% 1 KNO_3 içeren durham tüplü SW-25 sıvı ortamlarına organizmalar aşılanmış, $40^\circ C$ 'de 10 gün inkübe edilmişler ve durham tüplerinde gözlenen gaz oluşumu pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Karaboz, 1988, Tamer ve ark., 1989, Birbir ve ark., 2004).

3.2.7.4. Oksidaz Testi

SW-25 ortamında $40^\circ C$ 'de 7 gün inkübe edilen katı kültürlerden steril eküvyonla alınıp filtre kağıdına dokundurulup, % 1 lik tetrametil p-fenil diamin dihidroklorid çözeltisinden damlatılıp mavi renk oluşumu gözlenmiştir (Gerhardt et al. 1994, Tamer ve ark., 1989).

3.2.7.5. Katalaz Testi

SW-25 agar ortamında $40^\circ C$ 'de 7 gün inkübe edilen kültür üzerine % 3 lük H_2O_2 damlatıldı ve gaz çıkışı gözlemlendi (Montalvo-Rodriguez et al., 1997, Gerhardt et al. 1994, Tamer ve ark., 1989).

3.2.8. İzolatların Moleküler Tanıları

3.2.8.1. DNA izolasyonu

İzolatların DNA izolasyonu için The Halo Handbook-Protocols for haloarchaeal genetics (Dyall-Smith, 2006)'den modifikasyonlar yapılmıştır.

DNA izolasyonu için SW-25 besiyerinde 4 gün 40°C'de çalkalamalı olarak büyütülen örnekler kullanılmıştır. OD₆₀₀ ~ 1 olan örneklerden 1.5 ml alınıp steril ependorf tüplerine aktarılmıştır. Tüpler +4 °C'de 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatantları atılıp buz üzerine yerleştirilen tüplere 400 µl steril soğuk ultra saf su eklenmiş ve kısa süreli vorteksleme ile hücrelerin patlaması sağlanmıştır. Tüpler protein denatürasyonu için 70°C'de su banyosunda 10dk tutulmuştur. Tekrar +4 °C'de 12.000 rpm'de 10dk santrifüjlenmiş süpernatant alınıp 5µl RNAz (20µg/ml) eklenmiştir ve 37°C'de 30dk bekletilmiştir. 260nm/280nm oranıyla saflık kontrolü yapılmış oranları 1,5-1,8 arasında olanlar PZR için kullanılmıştır. 260nm ölçüm değeri PZR'da kullanılacak DNA miktarının analizi için kullanılmıştır. Çift zincirli DNA molekülleri için, 1 optik yoğunluk (OD) 50 µg/ml'ye karşılık geldiği için; aşağıdaki formülden yararlanılmış ve µg/ml DNA değeri bulunmuştur (Temizkan ve Arda, 2004).

DNA (µg/ml): $A_{260} \times 50 \times SF$

Elde edilen izolasyon ürünü, % 0,8'lik agaroz jelde 1saat 80V'da yürütülmüş süre sonunda jel bir transilüminatör üzerine alınarak UV ışığı

altında kontrol edilmiştir. Daha sonra -20 °C'ye kaldırılarak saklanmıştır. Tip tür olarak *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 kullanılmıştır.

3.2.8.2. PZR protokolü

PZR işlemi için; A21F 5'- TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3' forward ve U1492R 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACTT-3' reverse primerleri kullanılmıştır (Elshahed et al, 2004)

PZR için Roche firmasının FastStart Taq DNAPolimerase dNTPack kiti kullanılmıştır ve protokolü aşağıda çizelgelerde verilmiştir. Tip tür olarak *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. PZR protokolü

PCR MgCl ₂ 'li PZR tamponu 10x kons.	5 µl
G-C zengin solusyonu	10 µl
dNTP	1 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
FastStart Taq DNA Polimeraz (5U/µl)	0,4 µl
Steril Ultra Saf Su	27,6 µl
İzolat DNA'sı	5 µl

Çizelge 3.3. Thermalcykler protokolü

Sıcaklık	95 °C	95 °C	50 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Süre	5 dk	45 sn	1 dk	1,4 dk	7 dk	∞
Döngü Sayısı	1	35			1	

PZR reaksiyonu GeneAmp PCR system 9700 model thermalcyclery kullanarak gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında PZR rnleri % 1,5'luk agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

3.2.8.3. 16S rDNA Dizi Analizi

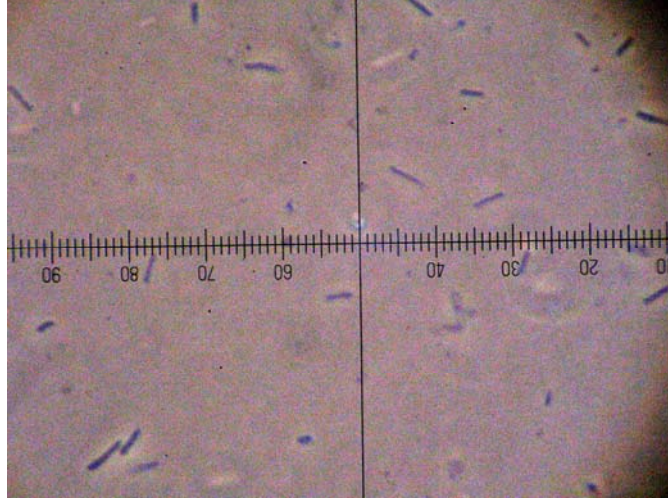
Dizi analizi Refgen (ODTÜ-Teknokent) tarafından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

4. BULGULAR

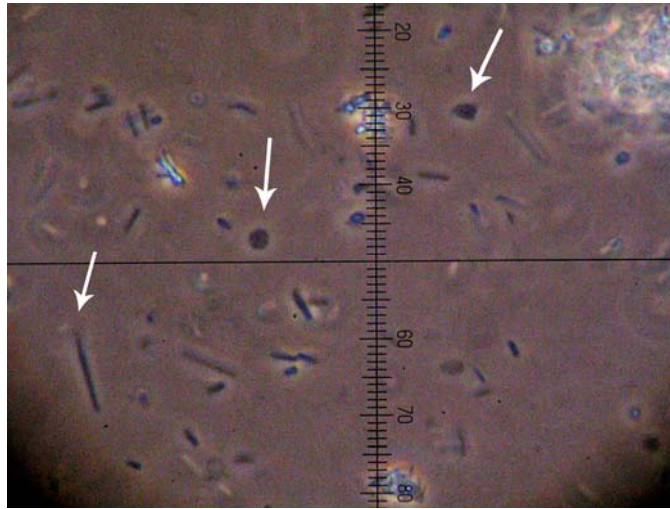
4.1.İzolatların Elde Edilmesi

Nötral pH'ya sahip toprak örneklerinden izolasyon sonucu 14 izolat elde edilmiştir. İzolatlar 2 ve 9 nolu izolatların kırmızı-mor, diğerler izolatların turuncu-kırmızı pigmente sahip oldukları gözlenmiştir. Gram boyama sonucu tüm izolatlar Gr (–) boyanmıştır. Faz-kontrast mikroskop sonucu 14 izolatın morfolojik şekli şöyle bulunmuştur:

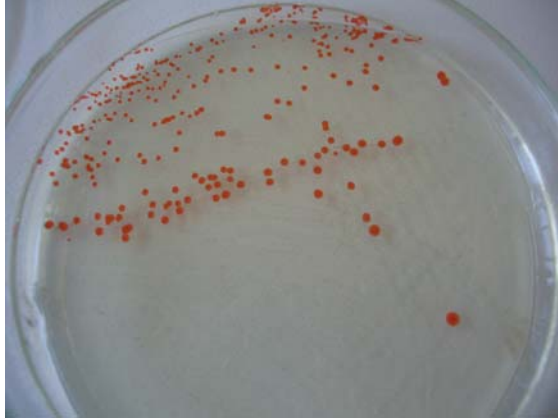
1. Basil
2. Basil
3. Pleomorfik
4. Pleomorfik
5. Pleomorfik
6. Pleomorfik
7. Pleomorfik
8. Basil
9. Basil
10. Pleomorfik
11. Basil
12. Basil
13. Pleomorfik
14. Basil



Şekil 4.1. 9 nolu izolatin Faz- kontrast görüntüsü



Şekil 4.2. 5 nolu izolatin Faz- kontrast görüntüsü



Şekil 4.3. 2 nolu izolatın petrideki görüntüsü

4.2.Büyüme İstekleri

4.2.1.Optimum NaCl Konsantrasyonu

Çizelge 4.1. Optimum NaCl Konsantrasyonu

İzolat No	NaCl Yüzdesi							
1	0	5	8	10	15	20	25	30
2	-	+	+	+	+	++	++	+
3	-	+	+	+	+	++	++	+
4	-	+	+	+	+	++	++	+
5	-	+	+	+	+	++	++	+
6	-	+	+	+	+	++	++	+
7	-	+	+	+	+	++	++	+
8	-	+	+	+	+	++	++	+
9	-	-	+	+	+	++	++	+
10	-	+	+	+	+	++	++	+
11	-	+	+	+	+	++	++	+
12	-	+	+	+	+	++	++	+
13	-	+	+	+	+	++	++	+
14	-	+	+	+	+	++	++	+

- : Gelişme yok, +: Gelişme iyi , ++: Gelişme çok iyi

4.2.2. Büyüme İçin Gerekli Minimum Maya Özütü Konsantrasyonu

Bütün izolatlar en düşük % 0,1 maya özütü konsantrasyonunda büyümüştür. Hiç maya özütü içermeyen ve % 0,01 maya özütü konsantrasyonunda büyüme olmamıştır. Bu veriden karbon kullanımı testinde yararlanılmıştır.

4.2.3. Minimum Mg^{+2} İhtiyacı

Çizelge 4.2. Minimum Mg^{+2} İhtiyacı

İzolat No	$MgCl_2$ (gr/100ml)							
	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	3,2
1	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	3,2
2	+-	+-	+	+	++	++	++	++
3	+-	+-	+	+	++	++	++	++
4	+-	+-	+	+	++	++	++	++
5	+-	+-	+	+	++	++	++	++
6	+-	+-	+	+	++	++	++	++
7	+-	+-	+	+	++	++	++	++
8	+-	+-	+	+	++	++	++	++
9	+-	+-	+	+	++	++	++	++
10	+-	+-	+	+	++	++	++	++
11	+-	+-	+	+	++	++	++	++
12	+-	+-	+	+	++	++	++	++
13	+-	+-	+	+	++	++	++	++
14	+-	+-	+	+	++	++	++	++

+- : gelişme zayıf, + : gelişme iyi, ++: gelişme çok iyi

4.2.4. Tek Karbon Kaynağında Büyüme

Çizelge 4.3. Tek Karbon Kaynağında Büyüme

İzolat No	Karbon Kaynağı (%1)				
	Laktoz	Maltoz	Ksilitol	Arabinoz	Ksiloz
1	-	+	-	+	+
2	-	+-	-	-	+-
3	-	+-	-	+	-
4	-	+	-	+	+
5	-	+	-	+	+
6	-	+	-	+	+
7	-	+	-	+-	+
8	-	-	-	+-	-
9	-	+	-	+	+
10	-	+	-	+-	+
11	-	+	-	+-	-
12	-	+	-	+	+
13	-	+	-	+	+
14	-	+	-	+	+

- : Gelişme yok, +- : gelişme zayıf, +: Gelişme iyi

Denemeler çift paralelli yapılmıştır

İzolat No	Karbon Kaynağı (%1)				
	Fruktoz	Galaktoz	Asetat	Sitrat	Glukoz
1	+	+	+-	+	+
2	+	+	-	+	+
3	+	+	-	+	+
4	+	+	-	+	+
5	+	+	-	+	+
6	+	+	+-	+	+
7	+	+	-	+	+
8	+	+	-	+	+
9	+	+	-	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	-	+	+
12	+	+	+-	+	+
13	+	+	+-	+	+
14	+	+	-	+	+

- : Gelişme yok, +- : gelişme zayıf, +: Gelişme iyi

Denemeler çift paralelli yapılmıştır

4.2.5. Azot Kaynağı

Çizelge 4.4. Azot Kaynağı

İzolat No	Azot Kaynağı (%1)		
	Et Özütü	NH ₄ Cl	Soya pepton
1	+-	+-	+-
2	+	-	+
3	+	-	-
4	+	+-	+-
5	+	+-	+
6	+	+-	+-
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	+
10	+	+-	+-
11	+	-	-
12	+	+-	-
13	+	+-	+
14	+	-	+

- : Gelişme yok, +- : gelişme zayıf, +: Gelişme iyi

Denemeler çift paralelli yapılmıştır

4.2.6. pH ve Sıcaklık Toleransı

Tüm izolatlar pH 5-8 arasında gelişmiş, optimum gelişmeleri ise pH 7’de olmuştur. Sıcaklık toleransı denemesinde ise 27 ile 50 derece arasında gelişim gözlenmiş ancak optimum gelişim 37 ve 40°C’de gözlenmiştir. Ayrıca tüm izolatlar 20 derecede 1 haftalık inkübasyonda gelişme göstermemelerine rağmen 40°C’ye alındıklarında gelişmişlerdir.

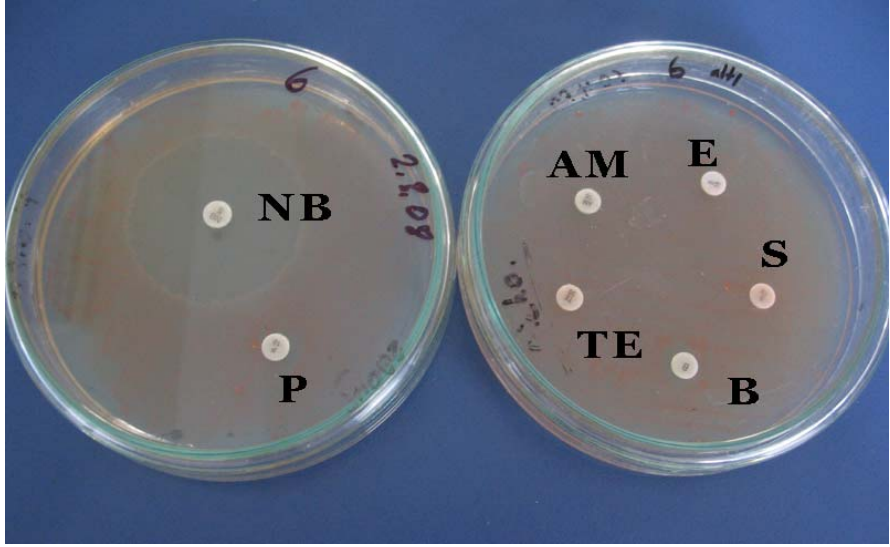
4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Rakamlar milimetre cinsinden verilmiştir. 8 mm altındakiler dirençli olarak değerlendirilmiştir (D) (Asha et al, 2005). 15 nolu organizma tip türdür.

Çizelge 4.5. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antibiyotik İzolat	NV	P	E	AM	TE	B	S
1	40	9,5	D	D	D	D	D
2	39	18	D	D	D	D	D
3	40	10	D	D	D	D	D
4	45	D	D	D	D	D	D
5	40	D	D	D	D	11	D
6	42	D	D	D	D	10,5	D
7	45	15,5	D	D	D	D	D
8	39	16,5	D	D	D	D	D
9	32	22	D	D	D	20	D
10	20	16	D	D	D	28	D
11	41	9,5	D	D	D	D	D
12	39	16,25	D	D	D	D	D
13	40	D	D	D	D	D	D
14	35	18	D	D	D	D	D
15	45	17	D	21,5	9	10	D

Novobiycin (NV, 5 µg), Eritromisin (E, 15 µg) , Streptomisin (S, 10 µg) , Basitrasin (B, 0,04 U) , Penisilin G (P, 10 IU), Amfisilin (AM: 10 µg) , Tetrasiklin (TE, 30µg)

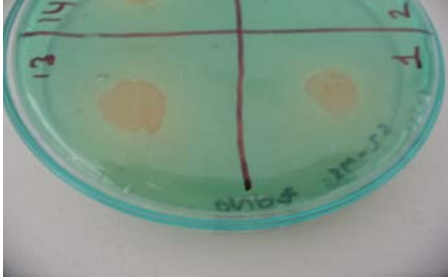


Şekil 4.4. 6 Nolu İzolatın antibiyotik denemesi

4.4.Hücre Dışı Hidrolitik Ekstremozimlerin Taranması

Çizelge 4.6. Hücre Dışı Hidrolitik Ekstremozimlerin Taranması

Enzim İzolat No	Esteraz	Lipaz	Amilaz	Selüloz	DNaz	Jelatinaz	Proteaz
1	-	-	-	-	+	-	-
2	+	-	-	-	+	-	+
3	+	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	-	+	-	-
5	-	-	-	-	+	-	+
6	-	-	-	-	+	-	-
7	-	-	-	-	+	-	-
8	+	-	-	-	+	-	-
9	+	-	-	-	+	-	+
10	-	-	-	-	+	-	-
11	+	-	-	-	+	-	-
12	-	-	-	-	+	-	-
13	-	-	-	-	+	-	-
14	+	-	-	-	+	-	+



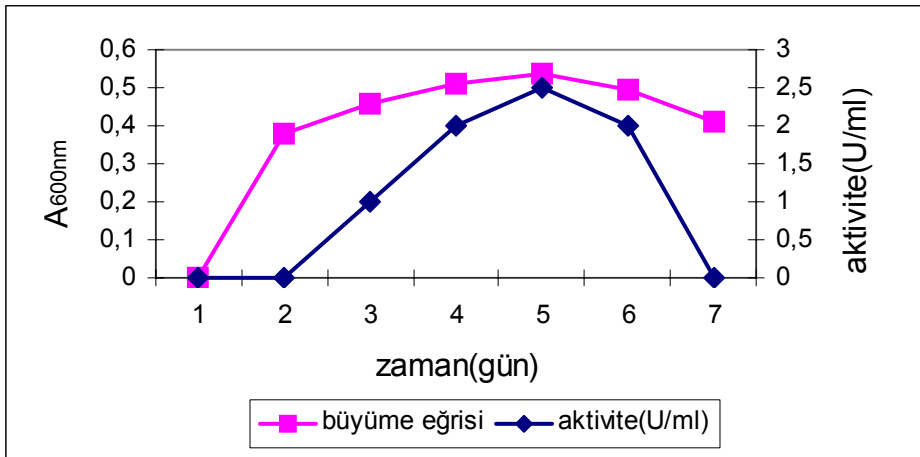
Şekil 4.5. DNaz aktivitesi



Şekil 4.6. Esteraz aktivitesi

4.5. Proteaz Aktivitesinin Taranması ve Üretim Koşulları

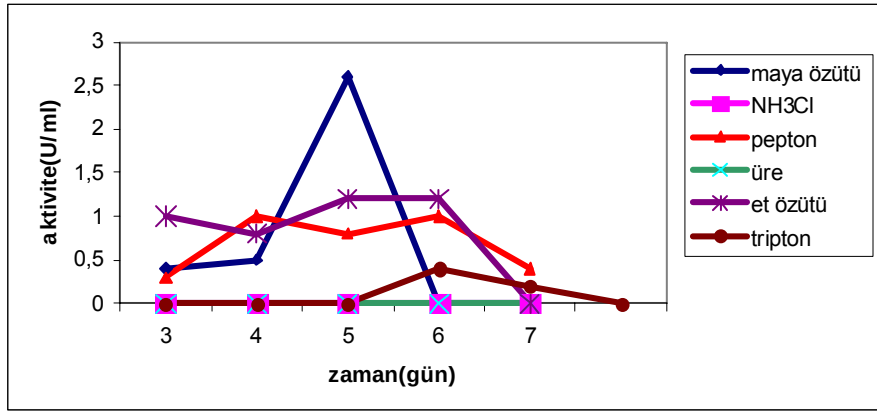
Proteazın nitel aktivite taramasına göre 2 nolu izolat seçilmiştir. İzolatın büyüme eğrisi çıkarılmış ve enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Aktivite ölçüm sonucu 4. gün 2U, 5. gün ise 2,5 U aktiviteye ulaştığı bulunmuştur (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. 2 nolu izolatın günlere bağlı büyüme eğrisi ve proteaz aktivitesi

4.5.1. Farklı Besin ve Azot Kaynaklarının Proteaz Üretimine Etkisi

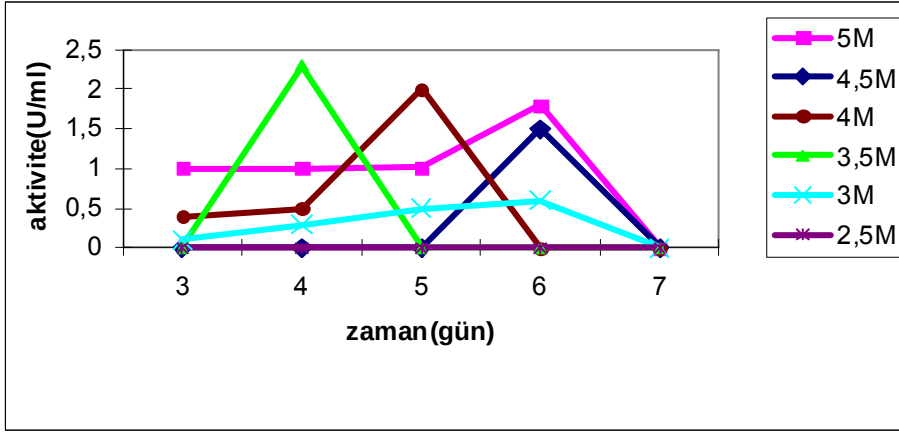
Farklı besin ve azot kaynaklarını içeren ortamda üretilen 2 nolu izolatin maya özütü içeren ortamda 2,6U ve et özütü içeren ortamda 1,2U aktivite gösterdiği, üre ve NH_3Cl 'de aktivite göstermediği görülmüştür (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Farklı besin ve azot kaynaklarının proteaz üretimine etkisi

4.5.2. NaCl Konsantrasyonlarının Proteaz Üretimine Etkisi

5M, 4,5M, 4M, 3,5M, 3M ve 2,5M NaCl içeren büyüme ortamında üretilen 2 nolu izolatin 3,5 M NaCl içeren ortamda 2,3U aktivite ve 4M NaCl içeren ortamda 2U aktivite gösterdiği 2,5M NaCl'de aktivite göstermediği görülmüştür (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. NaCl Konsantrasyonlarının proteaz üretimine etkisi

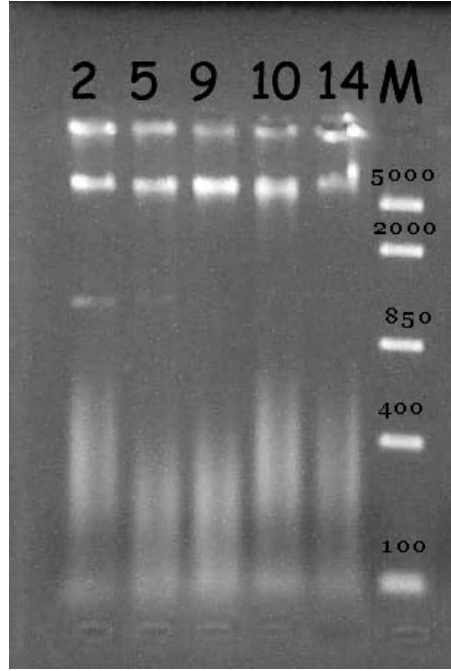
4.6.Biyokimyasal Testler

Çizelge 4.7. Biyokimyasal test sonuçları

İzolat No/ Test	İndol	Nitrattan nitrit oluşumu	Nitrattan gaz oluşumu	Oksidaz	Katalaz
1	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	+
6	+	-	-	-	+
7	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	+
9	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	+
11	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	+
13	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	+

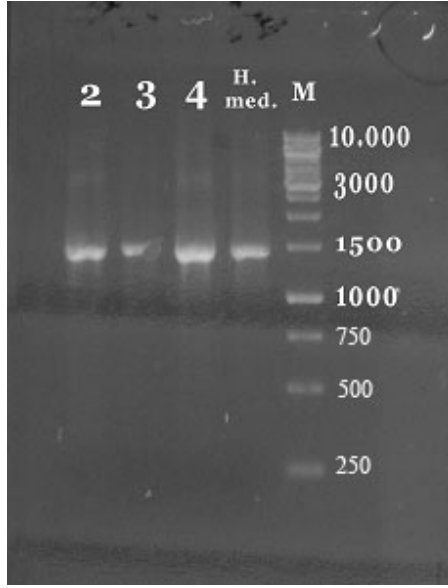
4.7.İzolatların Moleküler Tanıları

Materyal ve yöntemde belirtildiği gibi 14 izolatın DNA izolasyonları ve agaroz jelde saflık kontrolleri yapılmıştır (Şekil 4.10)



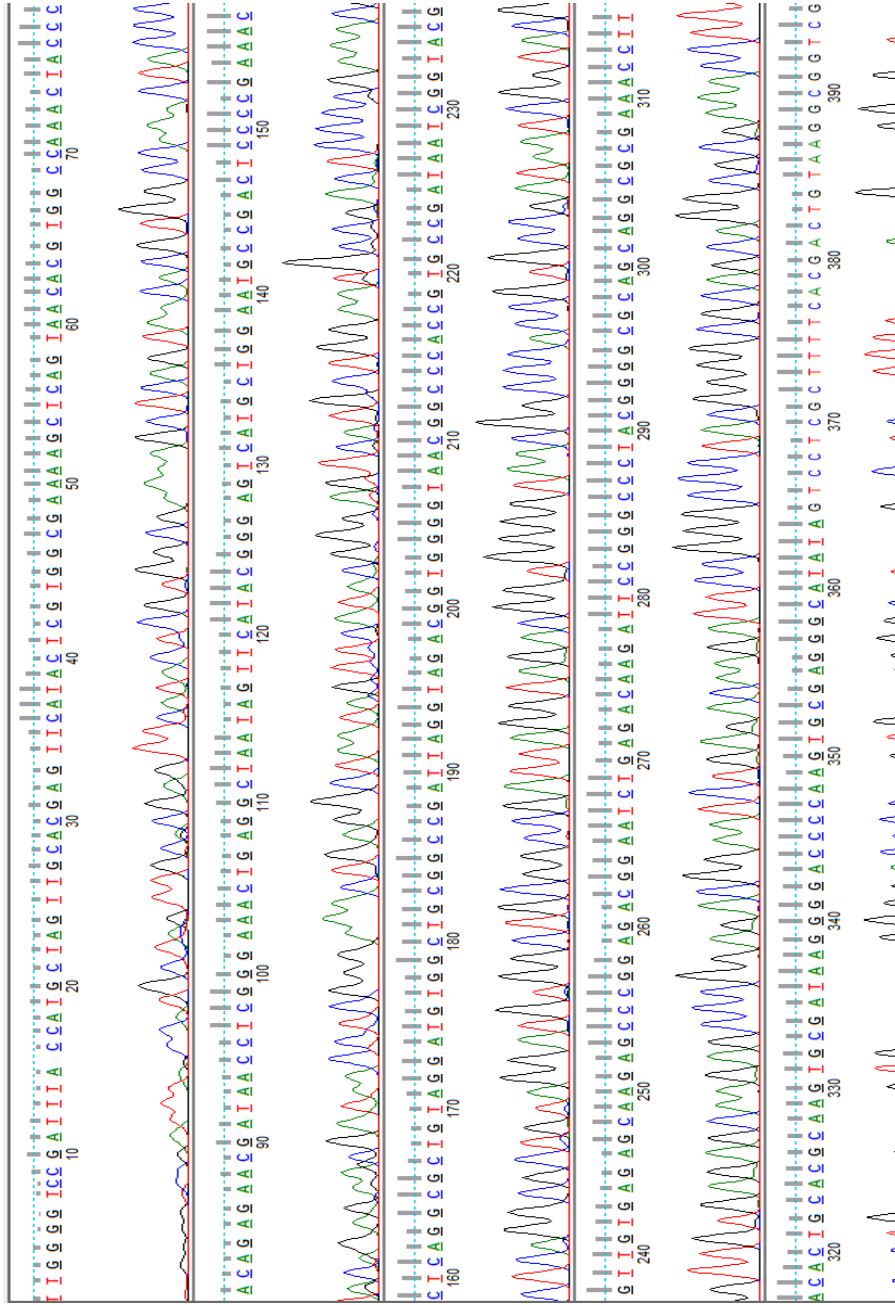
Şekil 4.10. 2, 5, 9, 10, 14 nolu izolatlara ait DNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü

Saflık kontrolleri yapıldıktan sonra DNA'lar ilgili primerle PZR'da çoğaltılmıştır. PZR ürünleri agarozda yürütüldükten sonra jel görüntülenmiştir (Şekil 4.11).

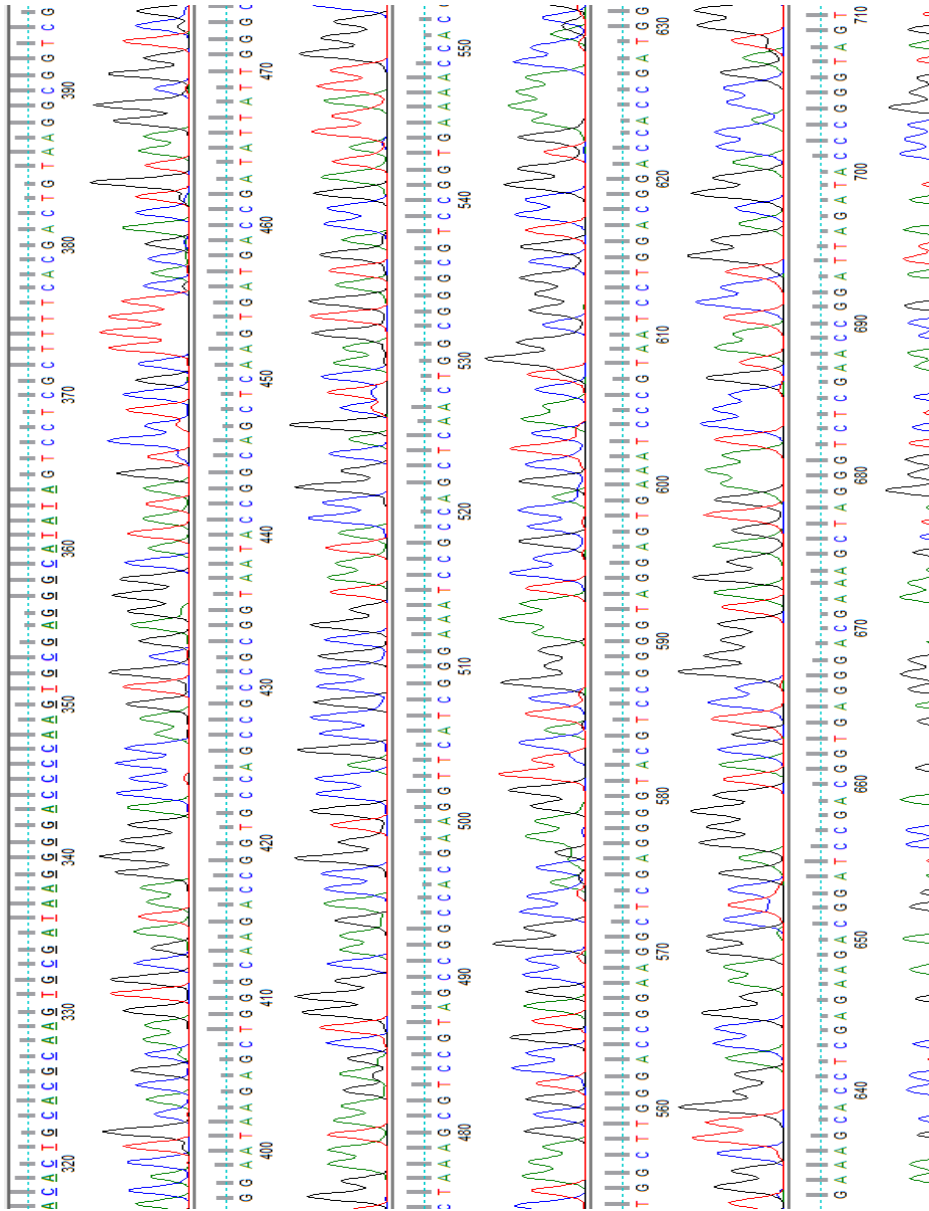


Şekil 4.11. 2, 3, 4 ve tip türe ait PZR jel görüntüsü

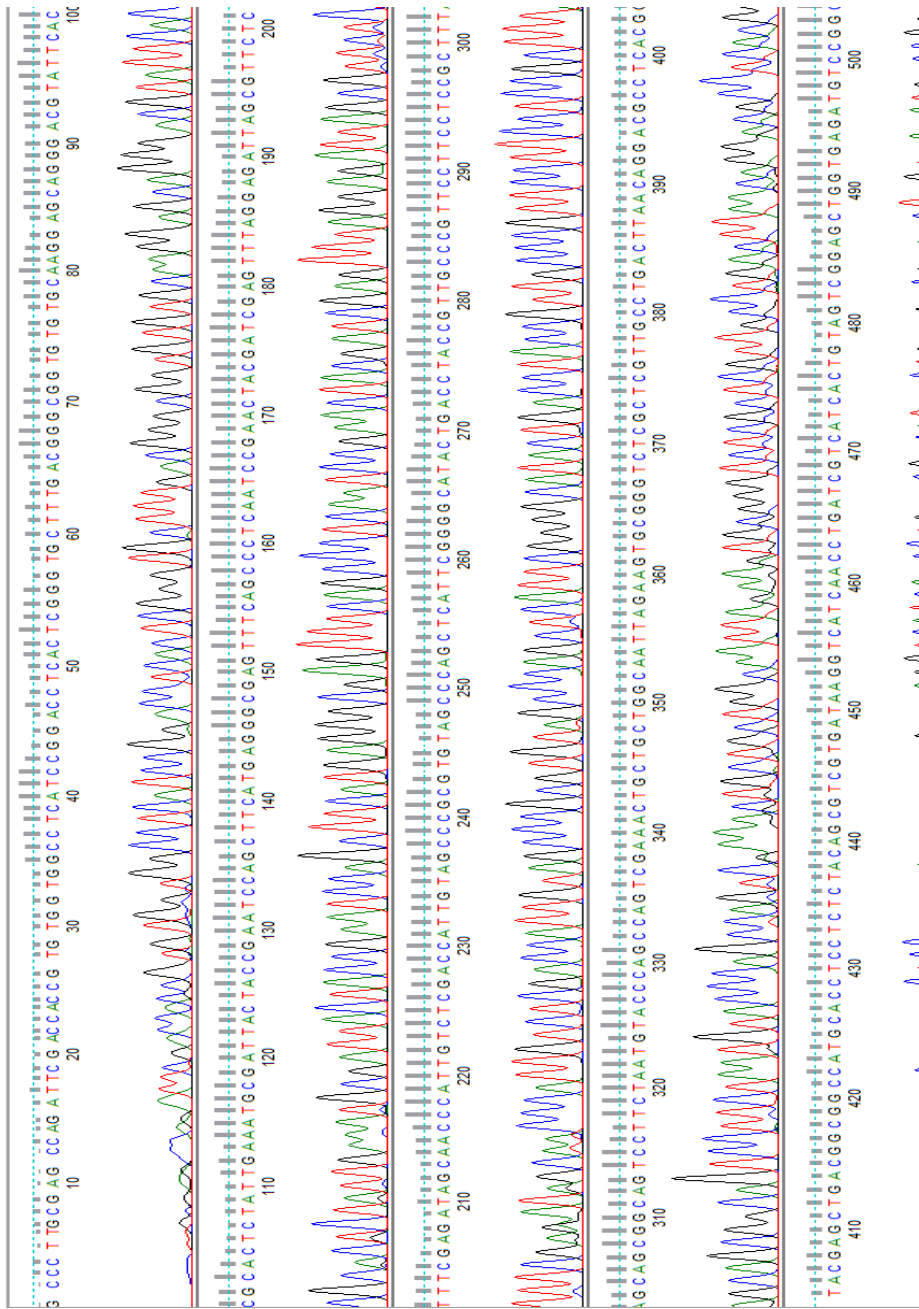
PZR ürünlerinin dizi analizleri sonucunda aşağıdaki baz dizileri elde edilmiştir.



Şekil 4.12. 7 nolu izolatin dizi analizi sonucu elde edilen Forward kromotogramı



Şekil 4.12. (Devamı)



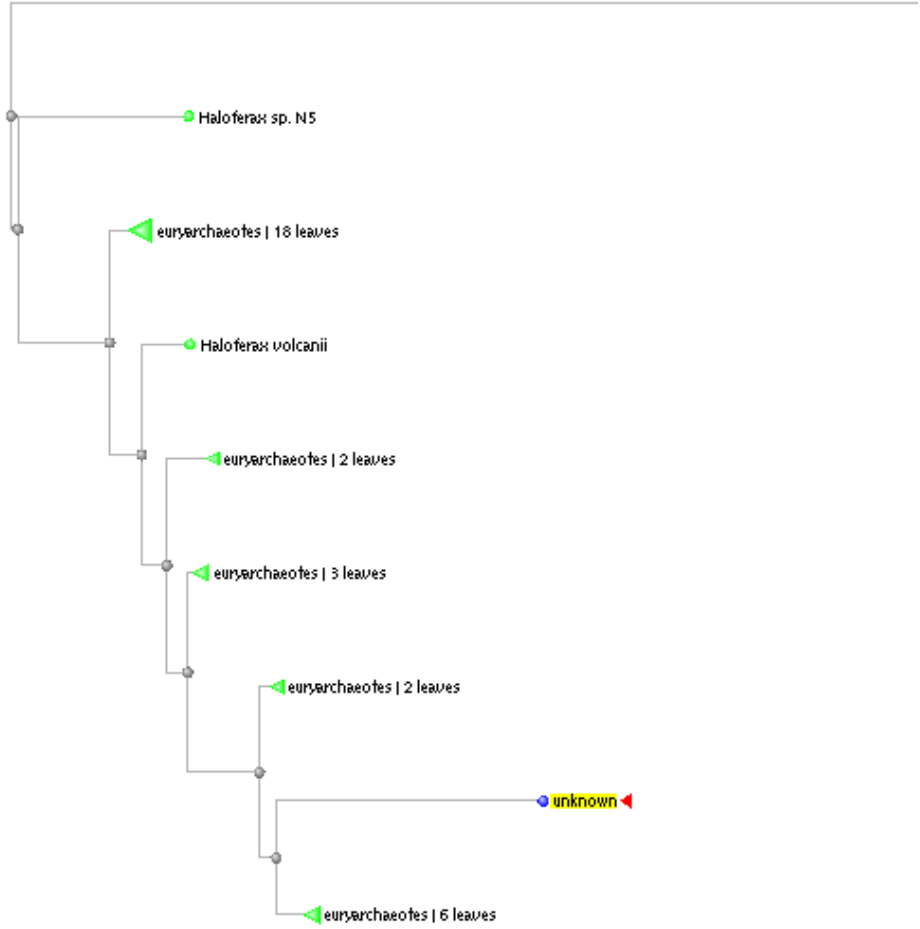
Şekil 4.13. 7 nolu İzolatın dizi analizi sonucu elde edilen Reverse kromotogramı

7 nolu izolatın forward ve reverse dizileri NCBI’da align edildikten sonra dizideki ortak bölgeler çıkarılıp aşağıdaki bölgeler elde edilmiştir.

**TTGGGGTCCGATTTACCATGCTAGTTGCACGAGTTCA
TACTCGTGGCGAAAAGCTCAGTAACACGTGGCCAAACTAC
CCTACAGAGAACGATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATAG
TTCATACGGGAGTCATGCTGGAATGCCGACTCCCCGAAAC
GCTCAGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAG
ACGGTGGGGTAACGGCCCCACCGTGCCGATAATCGGTACGG
GTTGTGAGAGCAAGAGCCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAG
ATTCCGGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTA
CACTGCACGCAAGTGCGATAAGGGGACCCCAAGTGCGAGG
GCATATAGTCCTCGCTTTTTCACGACTGTAAGGCGGTCTGTG
GAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTA
ATACCGGCAGCTCAAGTGATGACCGATATTATTGGGCCTA
AAGCGTCCGTAGCCGGCCACGAAGGTTCATCGGGAAATCC
GCCAGCTCAACTGGCGGGCGTCCGGTGAAAACACGTGGC
TTGGGACCGGAAGGCTCGAGGGGTACGTCCGGGGTAGGA
GTGAAATCCCGTAATCCTGGACGGACCACCGATGGCGAAA
GCACCTCGAGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAG
CTAGGGTCTCGAACCGGATTAGATAACCGGGTAGTCCTAG
CTGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTGGCACAGGCTACGAGC
CTGTGCTGTGCCGTAGGGAAGCCGAAAAGCGAGCCGCCTG
GGAAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTAAAGGAATTGGCG
GGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGGGGTTTAATTGGA
CTCAACGCCGGAAATCTCACCACCTCCGACTACAGTGATG
ACAATCAGGTTGATGACCTTATCACGACGCTGTAGAGAGG**

AGGTGCATGGCCGCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCT
 GTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTTCTAATTGC
 CAGCAGCAGTTTCGACTGGCTGGGTACATTAGAAGGACTG
 CCGCTGCTAAAGCGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGT
 CAGTATGCCCCGAATGAGCTGGGCTACACGCGGGCTACAA
 TGGTCGAGACAATGGGTTGCTATCTCGAAAGAGAACGCTA
 ATCTCCTAAACTCGATCGTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAA
 CTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCGGTAGTAATCGCATTTC
 ATAGAGTGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACACC
 GCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCCACC
 ACACGGTGGTCGAATCTGGCTCGCAAGGGC

Elde edilen 1385 bp'lik bölge <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> adresindeki nucleotide BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) tarama sceneğine göre analiz edilmiştir. Sonuç olarak 1376/1385 bazlık benzerlik ile (Gap: 2/1385: % 0) 7 nolu izolat % 99 *Haloferax alexandrinus* olarak tanılanmıştır ve filogenetik ağaçtaki yeri tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



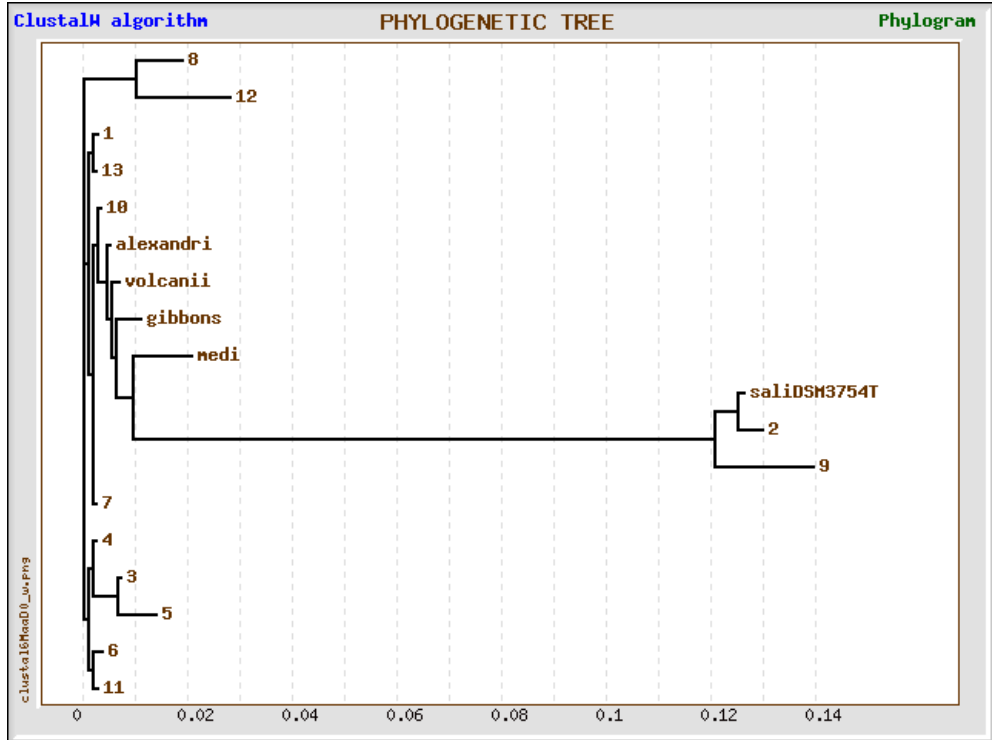
Şekil 4.14. 7 nolu İzolatın filogenetik ağaçtaki yeri

Diğer izolatlar için de aynı işlemler uygulanmıştır ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- 1 nolu izolat: % 99 *Haloferax alexandrinus*
- 2 nolu izolat: % 99 *Halobacterium salinarum R1 strain*
- 3 nolu izolat: % 99 *Haloferax sp. HSC4*
- 4 nolu izolat: % 99 *Haloferax alexandrinus*

- 5 nolu izolat: % 98 *Haloferax alexandrinus*
- 6 nolu izolat: % 99 *Haloferax alexandrinus*
- 7 nolu izolat: % 99 *Haloferax alexandrinus*
- 8 nolu izolat: % 97 *Haloferax YT 228*
- 9 nolu izolat: % 97 *Halobacterium salinarum*
- 10 nolu izolat: % 99 *Haloferax alexandrinus*
- 11 nolu izolat: % 99 *Haloferax alexandrinus*
- 12 nolu izolat: % 96 *Haloferax alexandrinus*
- 13 nolu izolat: % 99 *Haloferax alexandrinus*
- 14 nolu izolat: Forward diziye göre; Haloarchaeon sech4 16S rRNA kısmi sekans %97, Reverse diziye göre; *Halobacterium volcanii* 16S ribosomal RNA 99%

<http://www.genebee.msu.su/clustal/clustal.php> internet adresindeki Genebee ClustalW 1.83 kullanılarak izolatlar ve bazı diğer belirgin türler arasındaki akrabalığı ortaya koymak için filogenetik ağaç oluşturulmuştur.



Şekil 4.15. Tüm izolatların karşılaştırmalı filogenetik ağacı. alexandri : *Halobacterium alexandrinus*, volcanii: *Halobacterium volcanii*, gibbons: *Halobacterium gibbonsii*, medi: *Halobacterium mediterranei*, salidSM3754T: *Halobacterium salinarum* DSM3754T

5. TARTIŞMA

Dünyamızda çok zor şartlarda hayatlarını devam ettirebilen canlılar mevcuttur. Bu şekilde yüksek sıcaklık, yüksek pH, yüksek basınç gibi ekstrem koşullara dayanabilen canlılar genelde *Archaea* domaininde yer almaktadır. *Archaea*'nın bu zor şartlara dayanabilmeleri ise onların ileride biyoteknoloji alanında kullanılabilir olmalarını göstermektedir.

Bizim çalışmamızda ilk izolasyon aşamasında SW-20 ve SW-25 besiyerlerini kullanılmış ve ilk aşamada 14 günlük inkübasyonda ilk koloniler elde edilmiştir. İleriki izolasyon ve pasajlama aşamalarında iyi gelişimin olduğu görüldüğü için SW-25 besiyeri ile devam edilmiştir. İzolasyon sonucu 14 izolat elde edilmiş, izolatların ileriki testlerde kullanılmak için yatık ortamlarda 2 ayda bir pasajlamak suretiyle stoklamaları yapılmıştır. Bunun yanı sıra *Archaea* türlerinde genetik kararsızlığın varlığından dolayı uzun süreli saklama için hem liyofilizasyon hem de gliserolde stoklamaları yapılmıştır.

İzolatların tamamı Gram negatif boyanmıştır, bu da *Archaea*'nın genel özelliklerine uymaktadır.

İzolatların büyüme istekleri incelendiğinde NaCl konsantrasyonu olarak optimum % 20 ve % 25 tuz konsantrasyonlarında geliştikleri hiç NaCl içermeyen ortamda ise gelişmedikleri görülmüştür bu da izolatların Kushner' in yaptığı sınıflandırmaya göre (1978, 1993) türlerin ekstrem halofil olduğunu desteklemektedir. Ayrıca değişen NaCl konsantrasyonlarında konsantrasyon seviyesi arttıkça pigment

yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir buda pigmentin tuz koşullarına dayanıklılıkta rol aldığını göstermektedir (Kushner D. J., 1993).

Tek karbon kaynağı denemelerinde faydalanılmak üzere yapılan büyüme için gerekli minimum maya özütü konsatrasyonu denemesinde izolatların en düşük % 0,1 maya özütü içeren ortamda büyüdüğü % 0,01 maya özütü içeren ortamda büyümediği tespit edilmiş bu nedenle karbon kaynağı kullanımı denemelerinde bu veriden yararlanılarak % 0,01 konsatrasyonda ortama maya özütü eklenmiştir. Minimum Mg^{+2} ihtiyacı incelendiğinde izolatların en düşük % 0,1 w/v Mg^{+2} konsatrasyonunda geliştiği görülmüştür. Montalvo-Rodriguez (1997)'in yaptığı denemede ise bu oran % 0,005 olarak verilmiştir.

Tüm izolatlar pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 arasında hazırlanan ortamlara ekilmiş ve 5-8 pH'lar arasında gelişim gözlenmiş ancak optimum gelişim 7 ve 8 pH'larda gözlenmiştir bu da türlerin nötrofilik olduğunu ortaya koymaktadır bu sonuç moleküler tanı sonucu elde ettiğimiz türlerin özellikleriyle uyumludur.

İzolatların antibiyotik test sonuçlarında bütün izolatların novobiyosine duyarlı 5,6,9,10 nolu izolatların ve tip türün ise basitrasine duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Çoğu halofilik Archaea türleri novobiyosine ve basitrasine duyarlıdır. Novobiocin DNA gyrase inhibitörüdür (Holmes and Dyal Smith, 1991) ve duyarlı olan bakterilerde aynı hedef bölgeye etki etmektedir. Basitrasine ise kokkoid olmayan halofilik Archaea'da hücre duvarının içindeki sakkaritlerin bütünlüğünü bozarak inhibe eder (Wieland et al, 1980) ayrıca bu tip

organizmalarda lipid biyosentezini de inhibe edebilir. Diğer izolatların basitrasine duyarlı olmamalarının sebebi kullanılan basitrasinin düşük (0,04 U/disk) konsantrasyonda olmasından ya da transpozon etkinliği sonucu oluşmuş olabilecek bir dirençlilikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer literatürlerde kullanılan basitrasinin miktarı daha yüksektir (10U) (Birbir vd, 2003, Hezayen F, 2002, Birbir vd, 2004). Ayrıca tip tür de dahil olmak üzere 1,2,3,7,8,9,10,11,12,14 nolu izolatlar genelde Archaea'nın dirençli olmasının beklendiği penisilin G'ye duyarlı olduğu saptanmıştır. Bunun antibiyotik dirençliliği sağlayan genin plazmidle kaybindan kaynaklanabileceği bu nedenle plazmid izolasyonu ile ileri analizlere gidilmesi gerektiği düşünülmektedir. Ancak bütün izolatların beklendiği gibi streptomisine dirençli olduğu gözlenmiştir (Oren, 2006). Oren (2006) tarafından belirtildiği gibi bazı türler 100µg/ml konsantrasyonun üzerindeki eritromisine duyarlıdır. Denememizde kullanılan eritromisin konsantrasyonu 15µg'dır ve bu yüzden bütün izolatların eritromisine dirençli olduğu görülmüştür.

Biyokimyasal testler uygulanırken moleküler tanıya destek sağlayabilecek Oren et al, 1997'de belirtilen minimum testler uygulanmaya çalışılmıştır. Literatürde *Haloferax alexandrinus* strain TM ile yapılan çalışmada (Asker et al., 2002); nişasta, galaktoz, sitrat hidrolizi, nitrattan gaz oluşumu, kazein hidrolizi gerçekleşmediği, nitratin nitrite aerobik indirgenmesinin, indol oluşumunun, tween 80 ve jelatin hidrolizinin gerçekleştiği belirtilmektedir. Bizim izole ettiğimiz *Haloferax alexandrinus* türlerinde ise; TM strainindeki gibi nişasta, laktoz hidrolizi nitrattan gaz oluşumu gözlenmemiş fakat bazı *Haloferax alexandrinus* türlerimizde tween 80 hidrolizi ve kazein hidrolizi

gerçekleşmiştir ve bütün türler sitratı ve galaktozu parçalamıştır. İndol oluşumu ise sadece 6 nolu izolatta gözlenmiştir. Bununda strainler arası farklılığa bağlı olduğu düşünülmektedir. Bununla beraber *H. alexandrinus* ile yapılan mevcut çalışmaların çoğu pigment üretimiyle sınırlıdır bu da strainler arası olabilecek farklılıkları ortaya koyamamaktadır.

Halobacterium salinarum türleri ile yapılan bir çalışmalarda ise (Mormile et al, 2003) strain BBH 001 ile tip strain karşılaştırılmış ve fenotipik karakterlerde farklılıklar gözlenmiştir. Bununla ilgili tablo aşağıda verilmiştir:

Karakteristik	Strain BBH 001	<i>H. salinarum</i> DSM 671	Tip Tür
Gram reaksiyonu	–	–	–
Hücre şekli	Basil	Basil	Basil
Hareketlilik	–	+	+
Kapsül oluşumu	–	–	n.r. ^b
Dinlenme evresinin varlığı	–	–	–
Oksijen ihtiyacı	Aerobik	Aerobik	Genellikle aerobik
Üst sıcaklık limiti (°C)	40	55	55
Optimum NaCl (M)	3.5	3.5	4–5
pH optimum	7.5	7.0	Nötral
Nitrat indirgenmesi	–	–	–
Katalaz	+	+	+
Oksidaz	–	+	+
Nişasta hidrolizi	–	–	–
Jelatin hidrolizi	+	–	+
İndol üretimi	–	–	+ ^c /– ^d
metil red	–	–	n.r.
Voges proskauer	–	–	n.r.
Sitrat parçalanması	–	–	n.r.
DNAaz	–	–	n.r.
β- galaktosidaz	–	–	n.r.
Ureaz	–	+	–
Lizin dekarboksilaz	–	+	+
ornitin dekarboksilaz	–	+	+
arjinin dekarboksilaz	+	+	+

Bizim *Halobacterium salinarum* strain R1 ve *Halobacterium salinarum* olarak tanılanan 2 ve 9 nolu izolatlarımız ise; strain BBH 001 gibi oksidaz, nişasta, nitrat indirgenmesi negatif olarak bulunmuştur. Buna karşılık jelatin hidrolizi *H. salinarum* DSM 671 gibi negatif olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca Oren (2006) tarafından yayınlanan bir çalışmada *Halobacterium salinarum* türü ile ilgili olarak verilen sonuçlarda tek karbon kaynağında büyümenin olmadığı ancak ortama % 0,005 konsantrasyonda maya özütü gibi hem azot hem de büyüme faktörleri içeren besi yeri bileşenlerinin eklenmesi durumunda büyümenin gerçekleşebileceği belirtilmektedir.

Bizim izole ettiğimiz tüm türlerin de tek karbon kaynağında büyüebilmeleri ortam içerisine eklenen % 0,01 oranında ki maya özütü nedeniyle gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

Enzim aktivitesi denemelerinde, çoğu halofilik archaeadan proteaz aktivite denemelerinde olduğu gibi azokazein substrat olarak seçilmiş reaksiyon durdurucusu NaOH ile pH değişimi sağlanarak açığa çıkan renk oluşumu 440nm’de ölçülmüştür. Literatürde belirtildiği gibi ekstraselüler enzim geç exponansiyel fazda üretilmeye başlamış stasyonier fazda maksimum seviyeye ulaşmıştır (Elsztein et al, 2001, Paggi et al, 2003). Büyüme eğrisiyle paralel olarak gelişmenin en iyi olduğu günlerde enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. *Halobacterium sp* PB407 ile yapılan bir çalışmada (Kanlayakrit and Bovornreungroj, 2004) yine enzim aktivitesinin 4. ve 5. günde en yüksek olduğu gözlenmiştir.

NaCl konsantrasyonunun enzim üretimine etkisi incelendiğinde aktivitenin 3,5- 4M NaCl içeren ortamda yüksek olduğu gözlenmiştir. Yine Kanlayakrit and Bovornreungroj (2004) tarafından yapılan çalışmada da en yüksek aktivitenin 4M-5M NaCl içeren ortamda gözlemlendiği belirtilmiştir. Bu NaCl konsantrasyonu organizmanın optimum geliştiği konsantrasyonlardan biridir.

Farklı besin ve azot kaynaklarının enzim üretimine etkisi incelendiğinde en iyi üretimin maya özütünde olduğu görülmüştür. Bu durum maya özütünün kompleks bir besiyeri bileşeni olmasındandır. Maya özütü B vitaminlerinin iyi bir kaynağıdır.

Son yıllarda 16S rDNA dizi analizleri ile bakteriyel ve archaeal türlerin tanısı yapılmaktadır. İzmir-Çamaltı tuzlasından izole edilen 14 ekstrem halofilik izolatın 16S rDNA dizi analizi ile 1,4,6,7,10,11,13 nolu izolatlar % 99 oranında *Haloferax alexandrinus*, 5 nolu izolat % 98 oranında *Haloferax alexandrinus*, 12 nolu izolat % 96 benzerlik oranıyla *Haloferax alexandrinus*, 3 nolu izolat % 99 *Haloferax sp. HSC4*, 8 nolu izolat % 97 *Haloferax YT 228*, 2 nolu izolat % 99 *Halobacterium salinarum RI strain*, 9 nolu izolat % 97 *Halobacterium salinarum* olarak tanımlanmıştır. Ancak 14 nolu organizmanın Forward ve Reverse dizileri NCBI alignment aracıyla karşılaştırıldığında anlamlı benzerlik elde edilemediğinden forward ve reverse dizileri ayrı ayrı blastlanmıştır ve forward diziye göre % 97 Haloarchaeon sech4 16Sr RNA kısmi sekans, reverse diziye göre % 99 *Halobacterium volcanii* olarak belirlenmiştir.

İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole ettiğimiz izolatların çoğu *Haloferax alexandrinus* olarak tanılanmıştır. Bu izolat ilk olarak Mısır-Alexandria bölgesinden izole edilmiş ancak daha önce İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izolasyonu gerçekleştirilmemiştir. Bu bağlamda amaçlandığı gibi tuzlanın ve ülkemiz halofilik mikroorganizma biyoçeşitliliğine katkı sağlamıştır.

Halococcus cinsine ait bir türden elde edilen restriksiyon endonükleaz enzimine dair patent alınmıştır(United States Patent 4724209). İzolatlarımız tarafından üretilen DNaz enzimi de böyle bir uygulama için kaynak teşkil edebilir.

İzolatlarda rastlanan proteaz, esteraz gibi enzimlerin tuz koşullarına dayanıklılık oranları saptanarak deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilirlikleri aydınlatılabilir.

Halofilik mikroorganizmaların bu enzimlerin varlığı ile deri endüstrisinde, gıdalarda kalite düşmesine neden olduğu bir kez daha vurgulanmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alam, M., Claviez, M., Oesterhelt, D., Kessel, M.** 1984. Flagella and motility behaviour of square bacteria. EMBO J. 3:2899-2903
- Asker, D., Ohta, Y.** 2002 *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremelyhalophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt) International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 729:738
- Bhatnagar T., Boutaiba S., Hacene Hocine , Cayol J.-L., Fardeau M.-L., Ollivier B., Baratti J. C.** 2005 Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and hydrolase production. FEMS Microbiology Letters 248: 133-140
- Birbir M., Çallı B., Mertoğlu B., Bardavid R., Oren A. Öğmen M. Ogan A.** 2007 Extremely Halophilic Archaea From Tuz Lake, Turkey, and the Adjacent Kaldırım and Kayacık Salterns. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 309-316
- Birbir M., Ogan A., Çallı B., Mertoğlu B.** 2004 Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. World Journal of Microbiology & Biotechnology 20: 613–621
- Birbir, M., Sesal C.** 2003 Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey Turk J Biol 27: 7-22

KAYNAKLAR (devam)

- De Castro, R. E. Maupin-Furlow Julie A., Gimenez, M. I., Herrera Seitz M. K., Sanchez J. J.,** 2006 Haloarchaeal proteases and proteolytic systems. FEMS Microbiol Rev. 30:17–35
- Dussault H.P.,** 1955 An improved technique for stainin red halophilic bacteria. J. Bacteriol. 70: 484-485
- Dyall-Smith M.,** 2006 The Halohandbook- Protocols for Haloarchaeal Genetics, Version 6.01
- Eichler J.,** 2001 Biotechnological uses of archaeal extremozymes. Biotechnology Advances, 19:261–278
- Eisenberg H, Wachtel E J ,** 1987 Structural Studies of Halophilic Proteins, Ribosomes, and Organelles of Bacteria Adapted to Extreme Salt Concentrations. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry 16: 69-92
- Elder B. L., Trujillo I., Blazevic D. J.** 1977 Rapid Deoxyribonuclease Test with Methyl Green. Journal Of Clinical Microbiology, 6:312-313
- Elshahed M. S., Najar F. Z., A. R. Bruce, Oren A., A. D. Thomas, Krumholz R. Lee,** 2004 Survey of Archaeal Diversity Reveals an Abundance of Halophilic *Archaea* in a Low-Salt, Sulfide- and Sulfur-Rich Spring, Applied And Environmental Microbiology, Apr. 70: 2230–2239

KAYNAKLAR (devam)

- Elsztein C, Herrera Seitz MK, Sanchez JJ & De Castro RE** 2001
Autoproteolytic activation of the haloalkaliphilic archaeon
Natronococcus occultus extracellular serine protease. J Basic
Microbiol 41: 319–327
- Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R.**, 1994 Methods
for General and Molecular Bacteriology. P. 159-169
- Gruber C., Legat A., Pfaffenhueimer M, Radax C., Weidler G., Busse
H.-J., Stan-Lotter H.** 2004 *Halobacterium noricense* sp. nov., an
archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt
deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of
H. salinarum and emended description of *H. Salinarum*
Extremophiles 8:431–439
- Hamamoto, T., Takashina, T., Grant, W.D., Horikoshi, K.** 1988.
Asymmetric cell division of a triangular halophilic
archaeobacterium. FEMS Microbiol. Lett. 56: 221-224.
- Hezayen F. F., Tindall B. J.,2 A. Steinbüchel, Rehm B. H. A.** 2002,
Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma
haloterrestris* gen. nov., sp. nov., and transfer of
Natronobacterium nitratireducens to *Halobiforma nitratireducens*
comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary
Microbiology 52, 2271–2280

KAYNAKLAR (devam)

Holmes, M. L., and M. L. Dyll-Smith. 1991. Mutations in DNA gyrase results in novobiocin resistance in halophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* 173:642–648.

Horikoshi K., Grant W.D. 1998 *Ekstremophiles*, Wiley-Sons Inc. New York, 93-133

Horikoshi K., 1999 Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 735-750

<http://www.iontek.com.tr/>

<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

<http://earth.google.com>

Jannasch, H.W. 1957. Die bakterielle Rotfärbung der Salzseen des Wadi Natrun (Ägypten). *Arch. f. Hydrobiol.* 53: 425-433.

Jones B.E., Grant W.D., Collins N.C., Mwatha W.E. 1994 Alkaliphiles: Diversity and applications. In Priest F.G., Ramos-Cormenzana A., Tindall B.J.(eds) : *Bacterial Diversity and Systematics*. New York: Plenum Pres, pp 195-230

Kanlayakrit W., Bovornreungroj P. 2005 Isolation and Characterization of Salt-Loving Protease Producing Bacteria from Fish Sauce Samples. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 39: 88-97

KAYNAKLAR (devam)

- Kanlayakrit W., Bovornreungroj P.,** 2004 Production and Characterization of protease from an Extremely Halophilic Halobacterium sp. PB407 Takuji Oka and masatoshi Goto Natural sciences 38: 15-20
- Karaboz İ,** 1988. Toprak Mikrobiyolojisi Laboratuvar Kılavuzu, Ege Üniversitesi Fen. Fakültesi Teksirler Serisi, No. 80, Bornova-İZMİR
- Kim J., Dordick J. S.** 1997 Unusual Salt and Solvent Dependence of a Protease from an Extreme Halophile. Biotechnology and Bioengineering 55: 471- 479
- Koru, E.,** 2004. Çamaltı Tuzlası (İzmir, Türkiye) Ekosisteminde *Artemia* ve Önemi. EÜ Su Ürünleri Dergisi 21: 187-189
- Krebs, M.P., and Khorana, H.G.** 1993. Mechanism of light-dependent proton translocation by bacteriorhodopsin. J. Bacteriol. 175: 1555-1560.
- K. R. T Asha., Denslin A.J. Vinitha, Seghal G. Kiran, W.A. Manjusha, N. Sukumaran, Joseph Selvin** 2005 Isolation and Cultivation of Halophilic Archaea from Solar Salterns Located in Peninsular Coast of India. The Internet Journal of Microbiology. Volume 1, Number 2

KAYNAKLAR (devam)

- Kushner D.J.** 1978. Life in High salt and solute concentrations:halophilic bacteria. In Kushner D.J. (ed) Microbial Life In Extreme Environments. *London:Academic Pres*, 317-368
- Kushner D.J.** 1993. Growth and nutrition of halophilic bacteria in Vreeland RH Hochstein L (eds): The Biology of Halophilic Bacteria .*Boca Raton:FL CRC Press* ,pp 87-103
- Madern D., Ebel C., Zaccai G.** 2000 Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4: 91-98
- Margesin R., Schinner F**(2001 Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5: 73-83
- Martin S., Marquez M. C., Sanchez-Porro C., Mellado E., Arahal D. R. Ventosa A.** 2003 *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1383-1387
- Montalvo-Rodriguez, R., Vreeland, R. H., Oren, A., Kessel, M., Betancourt, C., Lopez-Gariga, J.** 1998. *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 48; 1305- 1312

KAYNAKLAR (devam)

- Montalvo-Rodriguez R., Ruiz-Acevedo A., Lopez-Garriga Juan** 1997 New Isolates of Extremely Halophilic Archaeobacteria (Halobacteria) from Puerto Rico and the Caribbean. *Caribbean Journal of Science*, 33:98–104
- Mormile M. R., Biesen M. A., Gutierrez M. C., Ventosa A., Pavlovich J. B., Onstott T. C. Fredrickson J. K.** 2003 Isolation of *Halobacterium salinarum* retrieved directly from halite brine inclusions. *Environmental Microbiology* 5: 1094-1102
- Nieto J. J., Fernandez-Castillo R., Marquez M. C., Ventosa A., Quesada E., Ruiz-Berraquero F.** 1989 Survey of Metal Tolerance in Moderately Halophilic Eubacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2385-2390
- Obayashi, A., Hiraoka, N., Kita, K., Nakajima, H., and Shuzo, T.** 1988. US Patent 4: 724,209, US Cl. 435/199.
- Oren A., Ventosa A., W. D. Grant** 1997 Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales* 47: 233-238
- Oren A.** 2002 Cellular Origin and Life in Extreme Habitats- Halophilic Microorganisms and their Environments. Joseph Sechbach (ed) Kluwer Academic Publishers, Volume 5

KAYNAKLAR (devam)

- Oren A.** 2006 The Order Halobacteriales. Dworkin, M. (ed.). The Prokaryotes: Chapter 8, 3: 113-164
- Paggi R. A., Martone, C. B., Fuqua, C. and De Castro, R. E.** 2003 Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon *Natronoccus occultus*. FEMS Microbiol Lett. 221: 49-52
- Pohlschröder M., Cuadros-Orellana S., Durrant L.R.** 2006. Isolation and characterization of halophilic archaea able to grow in aromatic compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57:151–154
- Roberts M. F.** 2005 Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic Microorganisms. Saline Systems, 1:5
- Rodriguez-Valera F., Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A.** 1981 Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. Microbial Ecology 7: 235-243
- Sanchez-Porro C., Martin S., Mellado E., Ventosa A.** 2003 Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J Appl Microbiol, 94:295-300
- Sara M., Sleytr U. B.** 2000 S-Layer Proteins. Journal of Bacteriology 182: 859-868

KAYNAKLAR (devam)

- Söhlemann P., Soppa, J., Oesterhelt, D., Lohse, M.J.** 1997. Expression of $\beta 2$ adrenoceptors in halobacteria. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 355: 150-160.
- Stan-Lotter H., Pfaffenhueimer M., Legat A., Busse H.-J., Radax C. Gruber C.** 2002 *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an archaeal isolate from a Permian alpine salt deposit International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52:1807–1814
- Steensland H., and Larsen, H.** 1971. The fine structure of the extremely halophilic cocci. Kong. Norske Vidensk. Selsk. Skr. 8: 1-5.
- Suitability Assay for azocasein as a substrate for trypsin ,**
sigma:http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/18160/Azocasein_substrate_trypsin.pdf
- Tamer A. Ü., Uçar F., Ünver E., Karaboz İ., Bursalıoğlu M., Oğultekin R.** 1989. Mikrobiyoloji Lab Klavuzu
- Temizkan G., Arda N.,** 2004 Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler BİYOGEM no:2, sy 102
- Terry J., McGenity, Renia T., Gemmell and William D. Grant** 1998 Proposal of a new halobacterial genus *Natrinema* gen. nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum* nom. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 48: 1187–1196

KAYNAKLAR (devam)

- Wieland, F., W. Dompert, G. Bernhardt, and M. Sumper.** 1980. Halobacterial glycoprotein saccharides contain covalently linked sulphate. *FEBS Lett.* 120:110–114
- Xin H., Itoh T., Zhou P., Suzuki Ken-ichiro, Masahiro K., Nakase T.** 2000 *Natrinema versiforme* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1297–1303
- Van den Burg B.** 2003 Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology.* 6:213–218
- Vidyasagar M., Prakash S.B., Sreeramulu K.** 2006 Optimization of culture conditions for the production haloalkaliphilic thermostable proteases from an extremely halophilic archaeon *Halogeometricum* sp. TSS101 *Letters in applied microbiology* 43: 385- 391
- Vidyasagar M., Prakash S., Jayalakshmi S.K., Screemulu K.** 2007 Optimization of culture conditions for the production of halothermophilic protease from halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101 *World J. Microbiol Biotechnol* 23: 655-662

Yaşı İ., Kılınç, A., 2002 Pamuk Liflerinden İzole Edilen Selülaz Üreticisi Fungusların Selülaz Aktivitelerinin Belirlenmesi, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 17 (3), 57-62

Yaşı İ., Bitlisli B. O., Karavana H. A., Başaran B., Sarı O., Birbir M. 2004.The Effect Of Conservation Defects On The Suede Quality Of Double-Face. Journal. of the American Leather Chemists Association JALCA, 99:494-501

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge KAHRAMAN

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul, 28.05.1981

Uyruğu : T.C.

Eğitim Durumu:

Üniversite	Akademik Kariyer	Bölüm/Branş	Yıl
Ege Ün.	Lisans	Biyoloji/Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji	2001-2005
Ege Ün.	Yüksek Lisans	Biyoloji	2005-...

Bilimsel Tebliğler:

- **Kahraman,Ö.**, Yaşa, İ., Tekin ,E., Koçyiğit,A., İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan İzole Edilen Ekstrem Halofilik Arkelerin Hücre Dışı Hidrolitik Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Moleküler İdentifikasyonu, 15. Biyoteknoloji Kongresi, 28-31 Ekim 2007, Antalya