

**MEKE GÖLÜ VE KONYA ACIGÖL'ÜN PROKARYOTİK
ÇEŞİTLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Miyesser AYCAN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak-2012

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1005F109



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Miyesser Aycan'ın "Meke Gölü ve Konya Acıgöl'ün Prokaryotik Çeşitliliğinin Araştırılması" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 17.01.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Yard.Doç.Dr.M.Burçin MUTLU
Üye: Prof.Dr.Merih KIVANÇ
Üye : Prof.Dr. Kıymet GÜVEN
Üye : Doç.Dr. Elif KORCAN
Üye: Doç.Dr.Ahmet ÇABUK

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunu'nun
.....tarih vesayılı kararıyla
onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MEKE GÖLÜ VE KONYA ACIGÖL'ÜN PROKARYOTİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Miyesser AYCAN

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman. Yard.Doç.Dr. Mehmet Burçin MUTLU

2012, 144 sayfa

Bu çalışmada, Meke Gölü ve Acı Göl'ün (Konya) prokaryotik çeşitliliği araştırılmıştır.

Meke Gölü ve Acı Göl'den (Konya) 2010 yılı Ağustos ayı ve 2011 yılı Nisan ayında örnekler alınmıştır. İzolasyon Medyum A, B, C, D, E ve %12, %18, %23 MGM'de gerçekleştirilmiştir. Besi ortamlarından elde edilen saf kolonilerden 16S PCR yapılmış ve 16S PCR ürünlerine amplifiye ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA) uygulanmıştır. PCR ürünlerinin saflaştırılması ile nükleotid dizisi belirlenmiştir ve Acı Göl'e ait 46 izolattan 4 farklı strain, Meke Gölü'ne ait 220 izolattan 13 farklı strain dizilenmiştir. 16S rRNA gen dizileri NCBI'da BLAST programı kullanılarak referans diziler ile karşılaştırılmıştır. BLAST sonuçlarına göre, Acıgöl'den Bacteria domainine ait *Halomonas*, *Marinobacter*, *Idiomarina*, *Thalassospira*, Meke Gölü'nden Bacteria domainine ait *Salinibacter*, *Salinivibrio*, *Halomonas*, *Idiomarina* ve *Marinobacter* ve Archaea domainine ait *Halorubrum* belirlenmiştir.

Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) populasyon dinamiklerini çalışmak, zenginleştirme kültürlerini izlemek ve rRNA operon kopya sayısını belirlemek gibi çeşitli amaçlar için uygulanmıştır. DGGE'de zenginleştirme kültürlerinde Meke Gölü'ne ait *Halorubrum* sp. ve *Haloterrigena limicola* kültür edilebilir türler olarak belirlenmiştir. Meke Gölü'ne ait Ağustos ve Nisan ayı örneklerinden dominant türler belirlenmiştir. Dizi analiz sonuçlarına göre Bacteria domainine ait kültüre alınmamış *Salinibacter* sp. ve Archaea domainine ait kültüre alınmamış Archaea üyesi Ağustos ayı örneğinde dominant olarak belirlenmiştir. Benzer olarak Archaea domainine ait kültüre alınmamış bir Archaea üyesi ve Bacteria domainine ait kültüre alınmamış bir üye Nisan ayı örneğinde dominant olarak tanımlanmıştır. rRNA operon kopya sayısını belirlemeye yönelik 11 bakteriyel izolatin DGGE sonuçları, bazı bakteriyel türlerin birden fazla rRNA kopya sayısına sahip olduğunu göstermiştir.

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) hem Acıgöl hem de Meke Gölü örnekleri için uygulanmıştır. Meke örneklerinde Archaea dominant olarak belirlenmiş, Acı Göl'de ise sadece bakteriyel floresan ışımaya alınmıştır.

Acı göl ve Meke Gölü'nün prokaryotik çeşitliliği ilk kez karakterize edilmiştir ve bazı strainlerin varlığı Türkiye'de ilk kez gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meke Gölü, Acı Göl, ARDRA, DGGE, FISH.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION of PROKARYOTIC DIVERSITIES MEKE LAKE and KONYA ACI LAKE

Miyesser AYCAN

Anadolu University Graduate School of Sciences

Biology Department

Supervisor: Asist. Prof.Dr. Mehmet Burçin MUTLU

2012, 144 pages

In this study, prokaryotic diversity of Meke Lake and Acı Lake (Konya) was investigated.

Samples were taken from the Meke Lake and Acı Lake (Konya) on August 2010 and April 2011. Isolation was performed on Medium A, B, C, D, E and %12, %18, %23 MGM. 16S PCR was carried out for pure to colonies on media and amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) was applied the 16S PCR products. The nucleotid sequences of the purified PCR products were sequenced and 4 different strains in 46 isolates for Acı Lake and 13 different strains in 220 isolates for Meke Lake were identified. 16S rRNA gene sequences were compared with reference sequences at NCBI using BLAST. According to the BLAST results, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Idiomarina*, *Thalassospira* in Bacteria domain for Acı Lake, *Salinibacter*, *Salinivibrio*, *Halomonas*, *Idiomarina* and *Marinobacter* in Bacteria domain and *Halorubrum* in Archaea domain for Meke Lake were identified.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was performed on samples for purposes that were studying population dynamics, monitoring enrichment cultures and determining rRNA operon copy number. Enrichment cultures of DGGE showed that there are *Halorubrum* sp. and *Haloterrigena limicola* in Meke Lake as culturable species. Dominant species were identified on August and April samples of Meke Lake by DGGE. Sequence analysis showed existence of uncultured *Salinibacter* sp. was dominant in Bacteria domain and uncultured archaeon was dominant in Archaea domain for August sample. Similarly, uncultured archaeon was dominant in Archaea domain and uncultured bacterium was dominant in Bacteria for April samples. 11 bacterial isolates were used for determination of rRNA operon copy number on DGGE and results showed that some of bacterial species have 16S operon copy number more than one.

Fluoresceine in situ hybridization (FISH) was used both Acı Lake samples and Meke Lake samples. The community was dominated by Archaea on the Meke samples. Acı Lake was showed only bacterial fluorescent hybridization.

Prokaryotic diversity of Acı Lake and Meke Lake was first time characterized and existence of some strains were showed first times in Turkey.

Keywords: Meke Lake, Acı Lake, ARDRA, DGGE, FISH.

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma imkanı sağlayan, çalışmalarımın her aşamasında önerileri ile beni yönlendirip desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Yard.Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya;

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Merih KIVANÇ, Prof. Dr. Kıymet GÜVEN, Doç. Dr. Nalan YILMAZ ve Yard. Doç. Dr. Meral YILMAZ'a ve bölümün olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Ali Yavuz Kılıç'a;

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardım ve dayanışmalarından ötürü öncelikle Dr. Rasime DEMİREL hocama ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına;

Bana her konuda destek olan ve fedakarlıklarını esirgemeyen annem, babam, kardeşlerim ve arkadaşlarıma;

En içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Miyesser AYCAN

Ocak, 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ	1
1.1. Halofillerin Tarihi.....	1
1.2. Dünya'daki ve Türkiye'deki Tuzlu ve Alkali Ortamlar.....	2
1.2.1. Büyük Tuz Gölü.....	2
1.2.2. Ölü Deniz.....	3
1.2.3. Wadi Natrun Gölü.....	4
1.2.4. Mona Gölü.....	5
1.2.5. Tuz Gölü.....	5
1.2.6. Denizli Acıgöl.....	6
1.2.7. Solar Tuzlalar ve Tuz Madenleri.....	6
1.3. Çalışma Alanları.....	7
1.3.1. Meke Gölü.....	7
1.3.2. Konya Acıgöl.....	8
1.4. Hipersalin Çevrelerin Özellikleri.....	9
1.5. Halofilik Mikroorganizmaların Özellikleri.....	9
1.6. Halofilik Mikroorganizmalar.....	11
1.6.1. Halofilik Mikroorganizmaların Taksonomisi.....	11
1.6.1.1. Archaea.....	12
1.6.1.2. Bacteria.....	16
1.6.1.3. Eukarya.....	20
1.6.2. Yüksek Tuzlu Çevrelere Adaptasyon.....	21

1.6.2.1. İnorganik Katyonlar.....	21
1.6.2.2. Organik Çözünür Maddeler.....	22
1.6.3. Halofilik Mikroorganizmaların Hücresel Yapıları.....	25
1.6.4. Halofillerin İdentifikasyonu.....	26
1.6.4.1. Ribozomal RNA	27
1.7. Kültür Bağımlı ve Kültür Bağımsız Prokaryotik Çeşitlilik Analizleri.....	28
1.7.1. Amplifiye Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA).....	31
1.7.2. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE).....	33
1.7.3. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH).....	36
1.7.4. Çift Tarafı İşaretli Prob Kullanılan Floresan in situ Hibridizasyon (DOPE-FISH)	37
1.8. Halofillerin Biyoteknolojik Potansiyelleri ve Uygulama Alanları.....	37
1.9. Halofillere Astrobiyolojik Bakış.....	44
2. MATERYAL VE METOD	46
2.1. MATERYAL.....	46
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	46
2.1.1.1. Medyum A.....	46
2.1.1.2. Medyum B.....	46
2.1.1.3. Medyum C.....	47
2.1.1.4. Medyum D.....	47
2.1.1.5. Medyum E.....	48
2.1.1.6. Medyum Has.....	48
2.1.1.7. %0 MGM.....	49
2.1.1.8. %3 MGM.....	49
2.1.1.9. %6 MGM.....	49
2.1.1.10. % 12 MGM.....	50
2.1.1.11. %15 MGM.....	50
2.1.1.12. %18 MGM.....	51
2.1.1.13. %23 MGM.....	51
2.1.1.14. % 25 MGM.....	51
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar.....	52

2.1.2.1. %30'luk Tuzlu Su.....	52
2.1.2.2. 50X TAE.....	52
2.1.2.3. 5X TBE.....	53
2.1.2.4. 10X PBS.....	53
2.1.2.5. %80'lik DGGE Stok Solusyonu.....	53
2.1.2.6. Denatürant içermeyen DGGE Stok Solusyonu.....	54
2.1.2.7. İn Situ Hibridizasyon Tamponu.....	54
2.1.2.8. FISH için Yıkama Tamponu	54
2.2. METOD.....	55
2.2.1. Alan Seçimi ve Örneklerin Toplanması.....	55
2.2.2. Örneklerdeki Toplam Tuz Değerinin, pH'ların ve Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi.....	56
2.2.3. Su Örneklerinden Halofilik Mikroorganizma İzolasyonu.....	56
2.2.4. Mikroskopik İnceleme.....	57
2.2.5. İzolatların Tuz ve Sıcaklık İsteklerinin Belirlenmesi.....	57
2.2.6. Örneklerin Kültür Bağımlı ve Kültür Bağımsız Prokaryotik Çeşitlilik Analizleri.....	57
2.2.6.1. İzolatların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Archaea–Bacteria Ayrımının Yapılması.....	57
2.2.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	59
2.2.6.3. Amplifiye Edilmiş Ribosomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA).....	60
2.2.6.4. Genomik DNA İzolasyonu.....	61
2.2.6.5. Zenginleştirme Kültürleri, Su Örnekleri ve Bacteria İzolatlarının Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE)	62
2.2.6.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	65
2.2.6.7. PCR Ürünlerinin Dizi Analizleri ve Gen Analizleri.....	66
2.2.6.8. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH)	67
2.2.6.9. DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) ile Boyama.....	68
2.2.6.10. DOPE-FISH (Çift Tarafı İşaretli Prob Kullanılan Floresan	

in situ Hibridizasyon).....	69
3.BULGULAR	70
3.1. Alan Seçimi ve Örneklerin Toplanması.....	70
3.2. Örneklerdeki Toplam Tuz Değerinin, pH'ların ve Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi.....	71
3.3. Su Örneklerinden Halofilik Mikroorganizma İzolasyonu	72
3.4. Mikroskopik İnceleme.....	76
3.5. İzolatların Tuz ve Sıcaklık İsteklerinin Belirlenmesi.....	77
3.6. Örneklerin Kültür Bağımlı ve Kültür Bağımsız Prokaryotik Çeşitlilik Analizleri.....	78
3.6.1. İzolatların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Archaea- Bacteria Ayrımının Yapılması ve Agaroz Jel Elektroforezi.....	78
3.6.2. Amplifiye Edilmiş Ribosomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA) ve PCR Ürünlerinin Dizi Analizi.....	80
3.6.3. Genomik DNA İzolasyonu.....	90
3.6.4. Zenginleştirme Kültürleri, Su Örnekleri ve Bacteria İzolatlarının Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE) ve Dizi Analizleri.....	91
3.6.5. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve DAPI (4',6' -diamidino-2-fenilindol- dihidroklorür) Boyama.....	107
3.6.6. DOPE-FISH (Çift Tarafı İşaretli Prob Kullanılan Floresan in situ Hibridizasyon)	110
4.TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	111
KAYNAKLAR	134

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Meke Gölü'nün görüntüsü (Ağustos 2010).....	7
1.2. Konya Acıgöl'ün görüntüsü (Ağustos 2010).....	8
1.3. 16S rRNA geni karşılaştırmalarına göre oluşturulan yaşam ağacı (Oren 2008).....	11
1.4. Kültür bağımlı ve kültür bağımsız moleküler çalışmalarda izlenecek yol (Muyzer ve Smalla. 1998)	30
1.5. DGGE işleminin akış şeması (Muyzer 1999b)	34
2.1. Meke ve Acıgöl'ün uydu görüntüleri (maps.google.com/).....	55
2.2. Meke Gölü örnekleme noktası.....	56
2.3. Acıgöl örnekleme noktası.....	56
3.1. Acıgöl örnekleme bölgesi uydu görüntüsü (maps.google.com/).....	70
3.2. Meke Gölü örnekleme bölgesi uydu görüntüsü (maps.google.com/).....	70
3.3. Acıgöl örnekleme noktası.....	71
3.4. Meke Gölü örnekleme noktası.....	71
3.5. Acıgöl örneği Medyum B'de ve Meke örneği %18 MGM'de gelişme gösteren koloniler	73
3.6. Acıgöl ve Meke Gölü örneklerinden elde edilen beyaz-opak-kırmızı-pembe renkteki kolonilerin pasajlanması	73
3.7. 'i' ve 'f' olarak adlandırılan saf izolatların agar üzerindeki görüntüleri	74
3.8. 'a' ve 'b' olarak adlandırılan saf izolatların agar üzerindeki görüntüleri.....	74
3.9. 'h' ve '3' olarak adlandırılan saf izolatların agar üzerindeki görüntüleri.....	75
3.10. '4' ve '5' olarak adlandırılan saf izolatların agar üzerindeki görüntüleri ...	75
3.11. 'i' ve '20' olarak adlandırılan saf izolatların Gram boyamaları	76
3.12. 'c' ve 'h' olarak adlandırılan saf izolatların Gram boyamaları	76
3.13. '3' ve '5' olarak adlandırılan saf izolatların Gram boyamaları	77
3.14. Acıgöl Nisan örneği Bacteria spesifik primer setleri ile 16S PCR jel görüntüsü (1 kb Marker: Fermentas GeneRuler™).....	79
3.15. Meke-Acıgöl Ağustos örneği Archaea ve Bacteria spesifik primer setleri ile 16S PCR jel görüntüsü (1-14: Archaea; 15-29: Bacteria 1 kb Marker: Fermentas GeneRuler™).....	79

3.16. Acıgöl Ağustos ayı Bacteria ürünlerinin <i>MboI</i> enzimi ile Kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™).....	80
3.17. Acıgöl Nisan ayı Bacteria ürünlerinin <i>MboI</i> enzimi ile kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™).....	81
3.18. Acıgöl Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının <i>MboI</i> enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası (İzolatlar sırası ile; g, f, i ve 20).....	81
3.19. Meke Gölü Ağustos ayı Archaea ürünlerinin <i>MboI</i> enzimi ile kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™).....	83
3.20. Meke Gölü Nisan ayı Archaea ürünlerinin <i>MboI</i> enzimi ile kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™).....	84
3.21. Meke Gölü Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Archaea izolatlarının <i>MboI</i> enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası (İzolatlar sırası ile; a, b, c, 10, 11, 12 ve 13).....	85
3.22. Meke Gölü Ağustos ayı Bacteria ürünlerinin <i>MboI</i> enzimi ile kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™).....	87
3.23. Meke Gölü Nisan ayı Bacteria ürünlerinin <i>MboI</i> enzimi ile kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™).....	87
3.24. Meke Gölü Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının <i>MboI</i> enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası (İzolatlar sırası ile; h, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7).....	88
3.25. Acıgöl ve Meke Ağustos ve Nisan su örneklerinden genomik DNA izolasyonu(A1: Acıgöl Ağustos, M1: Meke Ağustos, A2: Acıgöl Nisan, M2: Meke Nisan su örnekleri; 1 kb DNA Marker, Bioron).....	90
3.26. Meke ve Acıgöl Ağustos örnekleri %12, %23 MGM ve Medyum B, D, E ortamlarından genomik DNA izolasyonu (A: Acıgöl, M: Meke, 1 kb Plus DNA marker, İnvitrogen).....	91
3.27. Meke Ağustos ayı kültürlerinden elde edilen DNA'lardan Archaea İçin DGGE-16S PCR jel görüntüsü (1 kb Plus DNA marker: İnvitrogen).....	92

3.28. Meke ve Acıgöl Ağustos ayı kültürlerinden elde edilen DNA'lardan Bacteria için DGGE-16S PCR jel görüntüsü (M: Meke, A:Acıgöl 1 kb Plus DNAMarker: İnvitrogen).....	92
3.29. Meke Archaea örneklerinden DGGE jeline yüklenecek 16S PCR ürünlerinin hesaplanması için elde edilen jel görüntüsü (Low Mass DNA Ladder; İnvitrogen).....	93
3.30. Meke ve Acıgöl Bacteria örneklerinden DGGE jeline yüklenecek 16S PCR ürünlerinin hesaplanması için elde edilen jel görüntüsü (M: Meke, A: Acıgöl Low Mass DNA Ladder; İnvitrogen).....	93
3.31. Meke Ağustos ayı kültürlerinden Archaea DGGE jel görüntüsü.....	94
3.32. Meke ve Acıgöl Ağustos ayı kültürlerinden Bacteria DGGE jel görüntüsü (M: Meke, A: Acıgöl).....	95
3.33. Meke Ağustos ayı kültürler için Archaea DGGE jelinden kesilen bantların re-PCR jel görüntüsü.....	95
3.34. Meke Ağustos ayı zenginleştirme kültürlerinden Archaea DGGE jelinden üretilmiş olan benzerlik dendogramı (3: %23 MGM, 5: <i>S.ruber</i> Medyum, 1: Medyum E, 2: Medyum D, 4: Medyum B, 6: Medyum C).....	98
3.35. Meke ve Acıgöl Ağustos ayı zenginleştirme kültürlerinden Bacteria DGGE jelinden üretilmiş olan benzerlik dendogramı (7 ve 10: Medyum C, 12 ve 13: %18 MGM, 5: Medyum D, 8: <i>S.ruber</i> Medyum, 3 ve 4: Medyum E, 9: %25 MGM, 6: %23 MGM, 11: %6 MGM, 1 ve 2: %12 MGM, A:Acıgöl, M: Meke Gölü).....	99
3.36. Meke Ağustos ayı Archaea ve Bacteria DGGE jel görüntüsü.....	100
3.37. Meke Nisan Ayı Archaea ve Bacteria DGGE jel görüntüsü.....	103
3.38. Acıgöl Ağustos ayı DGGE Bacteria jel görüntüsü.....	106
3.39. Acıgöl Ağustos ve Meke Nisan aylarında elde edilen Bacteria izolatlarından (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,g, f, i ve 20) elde edilen DGGE jel görüntüsü.....	106
3.40. Eub 338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Acıgöl Ağustos ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan diplokok şekilli Bacteria hücreleri).....	107

3.41. Eub 338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Ağustos ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan uzun çubuk şekilli Bacteria hücreleri)	107
3.42. Arc344 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Ağustos ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan basil ve disk şekilli Archaea hücreleri)	108
3.43. Arc915 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Ağustos ayı Örneği (Ok ile işaretlenmiş olan basil şekilli Archaea hücreleri).....	108
3.44. Ehb412 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Ağustos ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan uzun basil şekilli Bacteria hücreleri).....	108
3.45. Eub 338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Acıgöl Nisan ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan vibrio şekilli Bacteria hücreleri).....	109
3.46. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Nisan ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan uzun çubuk Bacteria hücreleri)	109
3.47. Arc344 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Nisan ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan disk şekilli Archaea hücreleri)	109
3.48. Arc915 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Nisan ayı Örneği (Ok ile işaretlenmiş olan disk şekilli Archaea hücreleri)	110
4.1. Dünya’da yayılış gösteren <i>Salinibacter</i> cinsine ait türlerin dağılımını gösteren harita (Anton ve ark. 2008).....	119

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Archaea domaini içerisinde yer alan bazı haloofilik cins ve türler.....	13
1.2. Bacteria domaini içerisinde yer alan bazı haloofilik ve halotolerant cins ve türler.....	17
1.3. Zwitteriyonik çözünenler ve hangi türlerde buldukları (Robert 2005)	23
1.4. Yüksüz çözünenler ve hangi türlerde buldukları (Robert 2005).....	24
1.5. Organik anyonik çözünenler ve hangi türlerde buldukları (Robert 2005)..	25
2.1. PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler.....	58
2.2. Çalışmada kullanılan FISH problemlerinin özellikleri.....	67
3.1. Acıgöl ve Meke Gölü'nün NaCl (%) ve pH değerleri.....	71
3.2. Acıgöl ve Meke Gölü'nün içerdiği element değerleri.....	72
3.3. Bazı Meke izolatlarının farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişim özelliklerinin belirlenmesi.....	77
3.4. Bazı Meke izolatlarının farklı sıcaklık değerlerindeki gelişim özelliklerinin belirlenmesi.....	78
3.5. Acıgöl Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının <i>MboI</i> enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin dizi analiz sonuçları.....	82
3.6. Meke Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Archaea izolatlarının <i>MboI</i> enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin dizi analiz sonuçları.....	85
3.7. Meke Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatların <i>MboI</i> enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin dizi analiz sonuçları.....	88
3.8. Meke Ağustos ayı kültürler için DGGE jelinden elde edilen bantların dizi analiz sonuçları.....	96
3.9. Meke Ağustos ayı DGGE jelinden elde edilen bantların dizi analiz sonuçları.....	101
3.10. Meke Nisan ayı DGGE jelinden elde edilen bantların dizi analiz sonuçları.....	104
4.1. Meke ve Acıgöl Bacteria zenginleştirme kültürlerinin DGGE'sine göre	

farklı besi ortamlarında elde edilen bantların sayısı.....	122
4.2. Meke Archaea zenginleştime kültürlerinin DGGE'sine göre farklı besi ortamlarında elde edilen bantların sayısı.....	124

1. GİRİŞ

Aşırı halofilik organizmalar yüksek tuz konsantrasyonuna uyum sağlamış olup 1.5 M ile 5.5 M arasında değişebilen tuz konsantrasyonlarında yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Aşırı halofilik organizmaların yaşam ağacında 3 domainde de temsilcileri bulunmakla birlikte yoğun olarak Archaea domaininde yer almaktadırlar. Bu organizmalar çoğunlukla tuz gölleri, tuzlalar, tuzlanmış et-balık gibi ürünlerde yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Bu organizmaların aşırı koşullara karşı oluşturdukları biyolojik sistemler, biyoteknolojik uygulama potansiyelleri nedeni ile alanında önemlidir.

Bu çalışma ile Konya ilinin Karapınar ilçesinde bulunan Meke Gölü ve Konya Acıgöl'ün prokaryotik çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda iki farklı zamanda (Ağustos 2010 ve Nisan 2011) alınan su örneklerinden saf kültür izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izolasyon sonrası elde edilen izolatların identifikasyonları moleküler yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Kültür bağımlı çalışmalar yanında kültür bağımsız çalışmalardan olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemleri kullanılarak kültüre edilemeyen organizmalar belirlenmiştir. Bu çalışma ile ilk kez Meke Gölü ve Konya Acıgöl'ün prokaryotik çeşitliliği ortaya konmuştur. Çalışma sonunda elde edilen izolatlar ileriki biyoteknolojik çalışmalara temel olması nedeniyle önem arz etmektedir.

1.1. Halofillerin Tarihi

Çok eski zamanlardan bu yana tuzlu sular kırmızı renkleri nedeniyle dikkat çekmekteydi. Tuz göllerinin rengi ile ilgili ilgi çekici tanım 1833 yılının Ağustos ayında Patagonya'daki El Carmen şehrine seyahati esnasında Charles Darwin tarafından yapılmıştır. Darwin, seyahati esnasında tuz gölü ile ilgili izlenimlerini anlatmakta ve tuz kristallerini parlak renkli kara benzetmekte, kıyılara doğru ise

buharlaşmadan dolayı kırmızımsı bir çamurun varlığından söz etmektedir. Darwin'den 60 yıl sonra ise Schweinfurth ve Lewin tarafından Mısır'daki Wadi Natrun Gölü kırmızı renginden dolayı 'the red' yani kırmızı göl olarak isimlendirilmiştir (Oren 2002a).

Halofilik organizmaların gözlemlenmesi ile ilgili ilk çalışma 1771 yılında Tripoli'de kırmızı renkli halofilik Archaea ile kontamine olmuş tuzun kullanılmasıyla ette gerçekleştirilmiştir. Pierce tarafından 1914 yılında ise ilk bakteri identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Halofillerin identifikasyonu ile ilgili ilk çalışma ise 1919 yılında Klebahn tarafından tuzlanmış balıktan yapılmıştır. 1920'li yıllarda halofillerle yapılan çalışmalar artmış ve bu organizmalara kırmızı rengi veren pigmentin karakterizasyonu yapılmıştır. Zorunlu anaerob halofilik bakteri olan *Bacteroides halosmophilus* 1937 yılında izole edilmiştir (Oren 2002a).

Halofillerle ilgili modern çalışmalar Norveç ve Kanada gibi tuzlanmış et ve balık ürünlerinden büyük kazanç sağlayan kuzey ülkeleri tarafından başlatılmıştır. 1950'lerde Norman Gibbons ve onun öğrencileri, Kanada'dan Donn Kushner ile Norveç'ten Helge Larsen hipersalin çevrelerdeki tuza uyumlu mikroorganizmaların varlığını ve buralara uyumlu tek grup olduklarını, biyolojileri ile birlikte doğru bir şekilde açıklamışlardır (Oren 2002a).

1.2. Dünya'daki ve Türkiye'deki Tuzlu ve Alkali Ortamlar

1.2.1. Büyük Tuz Gölü

Kuzey Amerika'nın Utah eyaletinde yer alan Büyük Tuz Gölü binlerce yıl önce oluşmuştur ve uçsuz bucaksız prehistorik Bonneville Gölü'nün bir kalıntısıdır. 122 km uzunluğunda ve 50 km genişliğinde olan Büyük Tuz Gölü hipersalin ve thalassohalin bir göldür. Gölün derinliği 4.3 metre olsa bile, derinliği su seviyesindeki değişikliklere göre farklılık gösteren sığ bir göldür. Su sıcaklığı da değişken olmakla birlikte -5 °C'den 35 °C'ye kadar çıkabilmektedir. Büyük Tuz Gölü'nün hiçbir okyanusla bağlantısı olmamasına rağmen, tuz kompozisyonu

deniz tuz kompozisyonu ile benzerdir ve toplam tuz miktarının %86'sını NaCl oluşturur. Yıllık 2.5 milyon tuz bu gölden elde edilebilmektedir (Gunde-Cimerman ve ark. 2005).

1955-1959 yılları arasında Büyük Tuz Gölü demiryolu geçidi yapımı ile birlikte iki izole ekosisteme bölünmüştür. İki bölüm arasında bağlantı dar bir kanalla sağlanmıştır. Göl ikiye ayrılmadan önce çözünmüş tuz miktarı 200 g/l kadardı. Güneydeki kısma Wasatch Dağı'ndan eriyen karlardan gelen tatlı su girmesi ile buranın salinitesi hızlı bir şekilde azalırken, kuzey kısmında ise tuzluluk oldukça artmıştır. Karşılaştırıldığında ise kuzey kısmında tuz artışına koştur olarak tuzluluk oranı 330-350 g/l'a kadar çıkarken güney kısmında tuzluluk 120-130 g/l'a kadar düşmüştür (Gunde-Cimerman ve ark. 2005).

Büyük Tuz Gölü'nün tuzluluğundaki bu değişiklikler içerdiği biyolojik özelliklerin de değişmesine neden olmuştur. 1960 ve 70'li yıllar öncesinde gölde kırmızı renk gözlemlenmezken bu yıllarda gölün kuzey kolunun halofilik Archaea'lar nedeniyle kırmızı görüldüğü tespit edilmiştir. Göldeki mikrobiyolojik çalışmalar 1970'li yıllarda derinlik kazanmıştır ve kırmızı renkli *Dunaliella salina* belirlenmiştir. Gölün güney kısmındaki salinite azalması ile zorunlu halofil olan *Dunaliella salina* yerine ortamda *Nodularia spumigena* yoğun olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca göl 3 yeni bakteri türüne ev sahipliği yapmıştır ki bunlar *Halomonas variabilis*, *Pseudomonas halophila* ve *Gracilibacillus halotolerans*'dır (Oren 2002a).

1.2.2. Ölü Deniz

Ölü Deniz 76 km uzunluğunda, 730 m derinliğinde İsrail ve Ürdün arasında yer alan tuzcul bir göldür. Ölü Deniz birçok mineral ve mikroelement içermektedir. Ölü Deniz'in tuz konsantrasyonları incelendiğinde diğer okyanus ve denizlerden 10 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu belirlemelere göre brom iyon konsantrasyonu yeryüzündeki tüm sulardan daha yüksek seviyededir. Ölü Deniz'de NaCl konsantrasyonu ise %12-18 arasında değişmektedir (Bentor 1961).

Ölü Deniz ile ilgili bilimsel çalışmalar Büyük Tuz Gölü ile karşılaştırıldığında nispeten daha geç gerçekleştirilmiştir ve canlı organizmalarla ilgili ilk rapor edilen çalışmalar ise halofillerle ilgili değildir. Ölü Deniz ile ilgili ilk çalışmayı Fransız bir bilim adamı olan M. L. Lortet, su ve sediment örneklerinin mikrobiyolojisini çalışarak gerçekleştirmiştir ve burada *Clostridium* cinsine ait patojenik organizmalara rastlamıştır. 1940'lı yıllarda ise Benjamin Elazari-Volcani ve Wilkansky farklı aerobik ve anaerobik bakterilerle, *Dunaliella*, tek hücreli alg ve birkaç protozoa bulmuşlardır (Oren 2002a). Daha sonraki yıllarda ise *Haloarcula marismortui*, *Haloferax volcanii*, *Halorubrum sodomense*, *Halobaculum gomorense* ve *Halobacterium salinarum* gibi halofilik arkeler izole edilmişlerdir. 1994-1995 yılları arasında da Ölü Deniz'de virüs benzeri partiküllerin varlığı belirlenmiştir (Oren 1999).

1.2.3. Wadi Natrun Gölü

Wadi Natrun Gölü Mısır'da yer alan, Nil nehrinden beslenen, deniz seviyesinin 23 metre aşağısında yer alan alkali bir göldür. Gölün pH değeri 11'dir. Sodyum, potasyum gibi elementler gölün temel katyonları iken magnezyum, kalsiyum gibi divalent katyonların oranı yüksek pH'da çözünme problemi nedeniyle çok düşüktür (Oren 2002a).

Wadi Natrun Gölü ötrofik bir sistemdir. İnorganik ve organik bileşikleri oldukça yüksektir. Fosfat konsantrasyonu 116-6830 μM , nitrat konsantrasyonu 53-237 μM , amonyum konsantrasyonu 2-461 μM ve çözülmüş organik karbon konsantrasyonu ise 136-1552 μM 'dir (Oren 2002a).

Wadi Natrun Gölü rengi mikroorganizma yoğunluğuna göre farklılık göstermektedir. Suyun rengi yeşil, kırmızı ve mor renklerini halofilik Archaea, fotosentetik mor bakteri, siyanobakteri ve yeşil alg yoğunluğuna göre değişmektedir (Oren 2002a).

Natronomonas pharaonis Halobacteriaceae familyasından ilk izole edilen türdür. *Methanosalsus zhilinae* ise anaerobik alkalifilik Archaea olması ile dikkat çekmektedir. *Halorhodospira halophila* ise ilk izole edilen kırmızı Archaea'dir (Oren 2002a).

1.2.4. Mono Gölü

Mono Gölü Kuzey Amerika'nın Kaliforniya eyaletinde yer alan hipersalin, alkalın bir göldür. Bu gölün pH'ı 9.8 iken tuzluluk oranı 84-94 g/l'dır. Mono Gölü meromiktik bir göl olduğu için gölün anoksik alt katmanı yüksek pH'lı toksik inorganik bileşikler olan sülfür ve amonyum biriktirir ve bu koşullar gölde var olan mikroorganizmaların aktivitelerini ve ekolojilerini etkilemektedir. Mono Gölü suyunda mevcut Na^+ oranı 29.5 g/l, K^+ oranı 1.5 g/l, Cl^- oranı 17.6 g/l, $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$ oranı 30.1 g/l'dir (Humayoun ve ark. 2003).

Mono Gölü'nde dominant olan organizmalar tek hücreli yeşil algler, birkaç diatom ve kok yapıdaki siyanobakterilerdir. Yeşil alglerden olan *Picocystis* cinsine ait türler ilk bulunan organizmalar olmakla birlikte 1967 yılında *Dunaliella* türlerine rastlanmış fakat sonraki çalışmalar ile bu sonuçlar doğrulanamamıştır. Mono Gölü'ünde bentik diatomlardan ise *Navicula crucialis*, *Nitzschia frustulum*, *Nitzschia latens*, *Nitzschia reimerii*, *Nitzschia monoensis* ve *Anomoeoneis sphaerophora* tespit edilmiştir. Mono Gölü'ünde yüksek arsenik konsantrasyon varlığı belirlenmiş ve bu konsantrasyona dayanıklı iki yeni *Bacillus* türü olan *Bacillus arsenicoselenatis* ve *Bacillus selenitireducens* izole edilmiştir. Moleküler kültür bağımsız çalışmalar ile birlikte gölde nitrifiye edici bakterilerin varlığı tespit edilmiştir (Oren 2002a).

1.2.5. Tuz Gölü

Ankara, Konya ve Aksaray il sınırları içerisinde yer alan Tuz Gölü 1665 km^2 'lik alana sahiptir ve böylece Türkiye'nin ikinci büyük gölü olma özelliğinin gösterir. Gölün en derin noktası 1.5-2 m derinliğindedir. Yaz mevsiminde ise gölün büyük bir kısmı kurumakta adeta tuz çözü görünümüne bürünmektedir ve tuz kalınlığı 5-30 cm'yi bulmaktadır. Gölün kimyasal bileşiminde sodyum klorür oranı, magnezyum klorür ve sodyum sülfat oranlarından oldukça yüksektir. Gölde tuz oluşumunun nedeninin uzun periyodik dönemler boyunca Na^+ ve Cl^- iyonların devamlı birikmesi sonucunda olabileceği açıklanmıştır (Mutlu 2006).

Tuz Gölü ile yapılan çalışmalarda *Halorubrum*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Haloquadrata*, *Haloterrigena*, *Salinibacter* cinslerine ait türler belirlenmiştir (Mutlu 2006).

1.2.6. Denizli Acıgöl

Acıgöl Burdur Gölü'nün 20 km batısında, Afyonkarahisar ve Denizli il sınırları içerisinde yer almaktadır. Denizden yüksekliği 836 m ve alanı 153 km²'dir. Derinliği mevsimlere göre değişmekle birlikte 150 cm ile 210 cm arasında değişmektedir. Acıgöl athalassohalin ve sığ bir göldür. Göl çevresindeki derelerden ve yeraltından beslenmektedir.

Gölde sodyum sülfat varlığı nedeniyle suyu acıdır ve buradan sodyum sülfat üretilmektedir. Ülkemizdeki sodyum sülfat üretiminin %90'ı Acıgöl'den sağlanmaktadır (Altınışalı ve Mezquita 2008).

1.2.7. Solar Tuzlalar ve Tuz Madenleri

Çamaltı Tuzlası ülkemizin deniz kaynaklı en büyük tuzlası olup tuz üretim merkezlerinden biridir. Bu tuzla İzmir iline 28 km uzaklıkta, Gediz nehri havzasına kurulmuştur. 1863 tarihinde İtalyanların kullanımında olan tuzla 1927 yılında ülkemiz kullanımına geçmiştir. Çamaltı Tuzlası 24.161.000 m² alana yayılmış buharlaştırma havuzları ve 3.158.000 m² alanı kaplayan kristalizasyon havuzlarına sahiptir (Koru 2004).

Tuzköy Tuz Madeni, Nevşehir'e 34 km, Tuzköy'e 2 km uzaklıkta yer almaktadır. Kaya tuzunun %35 Na⁺, %56 Cl⁻ ve %1.6 SO₄ içerdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile NaCl'ün yaklaşık 60 m derinde yer aldığını tespit edilmiştir. Tuzköy Tuz Madeni, topukların fazla yük sonucu çökmesi ve yer altı suyunun bu çöküşü hızlandırması sonucunda kapatılmıştır (Çakmar 2005).

1.3. Çalışma Alanları

1.3.1. Meke Gölü

Meke Gölü (Şekil 1.1) Konya ilinin Karapınar ilçesinde yer almaktadır. Karapınar ilçesi ise Konya'nın 95 km doğusunda, Konya-Ereğli Ovası'nın Obruk Platosu içine doğru sokulan Sultaniye Ovası'nın güneyinde, Karacadağ volkan dağıının batısında kurulmuştur (Önder ve Polat 2004).



Şekil 1.1. Meke Gölü'nün görüntüsü (Ağustos 2010)

Meke Gölü Karapınar-Ereğli yolunun 7. km'sinin 2 km iç kısmında yer alır. Gölün uzunluğu 800 m ve genişliği 500 m'dir. Deniz seviyesinden yüksekliği ise 981 m'dir. Meke Gölü çok sığ ve yüksek tuz oranına sahip bir göldür. Bu tuz oranı kurak mevsimlerde %32'lere kadar çıkabilmektedir. 1 litre göl suyunda 10.4 gr Na⁺, 3.9 gr K⁺, 0.3 gr Ca⁺², 120 gr Mg⁺², 200 gr SO ve 188 gr Cl⁻ varlığı tespit edilmiştir (Karaaslan 2010).

Meke Miyosen'de başlayan Kuarter'de devam eden volkanizmalar ile oluşan maarlara suların dolması ile oluşmuştur (Göçmez ve ark. 2000). Göl yeraltı

kaynak suyu ile beslenmektedir. Yeraltı suyunun yanlış kullanımı ve yüksek buharlaşma oranı ile göl kuruma tehlikesi ile karşı karşıyadır (Akköz ve ark. 2009).

Meke Gölü dünyada ender rastlanan bir oluşum olması ve görsel güzelliği nedeniyle “dünyanın nazar boncuğu” olarak anılmaktadır. Ayrıca Meke Gölü ve civarı barındırdığı endemik kuş türleri nedeniyle 1989 yılında doğal sit alanı olarak belirlenmiştir (Önder ve ark. 2004).

1.3.2. Konya Acıgöl

Acıgöl (Şekil 1.2) Konya'nın Karapınar ilçesinin doğusunda Adana–Konya anayolu üzerinde Konya'dan 108 km uzaklıktadır. Acogöl Meke Gölü'nde olduğu gibi Miyosen'de başlayan Kuarter'de devam eden volkanizmalar sonucunda, büyük bir volkanik patlama sonucu oluşmuştur. Deniz seviyesinden yüksekliği 985 m, yüzölçümü 1.2 km², derinliği 300 m'dir ve gölde sığ yer yok denecek kadar azdır. Gölün çevresi dik yamaçlarla ve volkanik küllerle kaplıdır. Gölün beslenmesi yeraltından sağlanmaktadır. Tuzlu ve karbonatlı olduğu için suyun tadı acıdır (Akköz ve ark. 2009).



Şekil 1.2. Konya Acıgöl'ün görüntüsü (Ağustos 2010)

1.4. Hipersalin Çevrelerin Özellikleri

Hipersalin çevreler tüm kıtalarda ve birçok ülkede bulunabilmektedir. Bu çevreler iki temel kategoriye ayrılır. Thalassohalin olarak adlandırılan göllerin tuz kompozisyonları deniz suyunun tuz kompozisyonuna benzemektedir ki sodyum ve klorid konsantrasyonları deniz suyu ile benzerdir. Deniz suyunun buharlaşması sonucu bu çevreler alkali ya da nötral olabilmektedir. Buharlaşma devam ettikçe alçı taşı gibi minerallerin çöktüğü belirlenmiştir. NaCl doyum noktasına ulaştığı zaman ise parlak kırmızı renkli kristalize göletler oluşabilmektedir (Oren 2002b).

Athalassohaline hipersalin çevreler deniz suyundan tamamen farklı bir tuz kompozisyonuna sahiptir. Böyle bir ortamda iki değerlikli katyonların (1.9 M Mg^{+2} , 0.4 M Ca^{+2}) konsantrasyonu tek değerlikli (1.6 M Na^{+} , 0.14 M K^{+}) katyonların konsantrasyonundan fazladır. Ayrıca pH nispeten daha düşüktür (Oren 2002b).

En iyi çalışılmış hipersalin ortamlardan Büyük Tuz Gölü ve Ölü Deniz karşılaştırılacak olursa Büyük Tuz Gölü'nün nispeten deniz suyuna benzer bir tuz konsantrasyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Ölü Deniz ise çok yüksek miktarda magnezyum tuzu içerir. Bu iki gölün pH'larına bakılacak olursa Büyük Tuz Gölü zayıf alkali iken Ölü Deniz zayıf asidiktir. Küçük hipersalin göletlerin kompozisyonları ise insan aktivitelerinden önemli derecede etkilenmektedir ve kimyasal ve biyolojik yapısı değişebilmektedir (Oren 2002b).

1.5. Halofilik Mikroorganizmaların Özellikleri

Tüm halofilik Archaea gram-negatiftir, ikiye bölünerek çoğalır, spor veya dinlenme safhası oluşturmazlar. Çoğu hareketsizdir. Çoğu enerji kaynağı olarak amino asitleri veya organik asitleri kullanırlar. Fakat optimum üreme için pek çok

üreme faktörüne ihtiyaç duyarlar. Halofilik organizmaların plazmidleri mevcuttur ve bu plazmidlerin doğal olarak meydana geldiği bilinen en büyük plazmidler arasında yer aldığı bilinmektedir (Madigan ve Martinko 2010).

Halofillerle ilgili genellikle gram negatiftir ve spor oluşturmazlar tanımı yapılsa bile halotolerant gruplar içerisinde gram pozitif boyama özelliği gösteren ve spor oluşturan türlerin varlığı belirlenmiştir. İlk kez 1972 yılında Onishi ve Kamekura Japonya'dan gram pozitif ılımlı halofilik bakteri olan *Micrococcus halobius*'u izole etmişlerdir. Sonraları Büyük Tuz Gölü'nden de spor oluşturan, gram pozitif türleri içeren *Halobacillus* cinsine ait türler izole edilmiştir (Ventosa ve ark 1998).

Tüm ekstrem organizmalar arasında kültüre alma açısından en kolay olan ekstrem grup halofillerdir. Çoğu pepton, maya özütü ya da tripton, birkaç tuz çeşidi ve NaCl varlığında kolayca kültüre edilebilmektedir. Büyük bir oranı aerobik olmakla birlikte sıcaklık istekleri 37-42°C arasında değişmektedir (Seckbach 1999).

Diğer ekstrem organizmalar arasında daha kolay kültür edilmelerine karşın ekstrem halofillerin izolasyonu bazı teknik zorluklar içerir. Yüksek tuz konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklığı tuzun çökmesine neden olabilmektedir. Böyle ortamda bulunan besiyeri kuruyarak azalmakta ya da salinitesi önemli derecede değişmektedir. Bu durum organizmanın gelişme oranını düşürmekte ve koşut olarak optimum tuz konsantrasyonunda daha yavaş gelişim yaratmaktadır (Rainey ve Oren 2006).

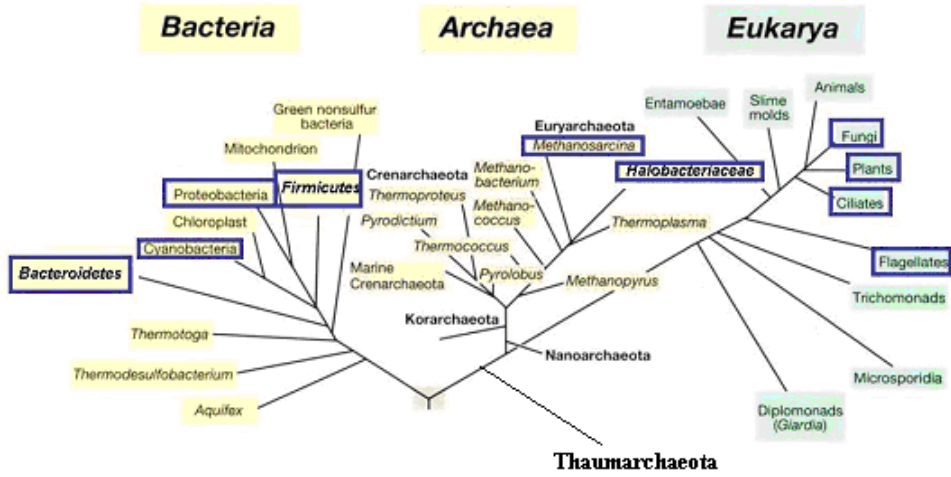
Halofilik mikroorganizmalar gelişmek için tuz gereksinimlerine göre kategorize edilir. Bu kategorizasyon zayıf, ılımlı ve ekstrem halofiller olarak gerçekleştirilmiştir. Zayıf halofiller %1-3 NaCl, ılımlı halofiller %3-15 NaCl ve ekstrem halofiller %15 ve daha fazlasında optimum gelişme gösterirler. Halotolerant bakteriler gelişmek için NaCl ihtiyaç duymasalar bile, yüksek tuz konsantrasyonlu ortamlarda gelişebilmektedirler. Halofil olmayan mikroorganizmalar ise %2'nin altındaki NaCl (0.2M)'da gelişim gösterirler.

Ayrıca birçok halofil ve halotolerant mikroorganizmanın tuz ihtiyacı ve toleransı çevresel ve besinsel faktörlere bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir (Kerker 2004).

1.6. Halofilik Mikroorganizmalar

1.6.1. Halofilik Mikroorganizmaların Taksonomisi

Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilen mikroorganizmalar küçük alt ünite ribozomal RNA karşılaştırmaları baz alınarak elde edilen yaşam ağacında Archaea, Bacteria ve Eukarya domainlerinde temsil edildiği belirlenmiştir (Şekil 1.3) (Oren 2008).



Şekil.1.3. 16S rRNA geni karşılaştırmalarına göre oluşturulan yaşam ağacı (Oren 2008)

1.6.1.1. Archaea

Archaea domaini içerisinde halofilik mikroorganizmalar üç familya içerisinde bulunur. Bu familyalar *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* ve *Methanosarcinaceae*'dir. *Methanospirillaceae* ve *Methanosarcinaceae* halofil olmayan temsilciler içerir fakat deniz suyundan hipersalin ortamlara kadar adapte olmuş durumdadırlar. *Halobacteriales* ordusu ise tamamen halofilleri içeren tek familya olan *Halobacteriaceae*'yi içerir. Bu familyadaki halofilik grup genellikle kırmızı pigmentli, aerobik olarak bilinir. Bu organizmalar Ölü Deniz, Büyük Tuz Gölü ve diğer birçok halofilik ve soda göllerinde dominant organizmalardır. Bu organizmaların varlığı ise tuzlu suyun kırmızı bir renk alması ile belirlenebilir (Gerday ve Glansdorff 2007; Oren 2002a).

Halobacteriaceae familyası ile ilgili çok çalışma yapılmıştır ve bu familyadaki türlerin gelişmek ve yapısal bütünlüğü için tuza bağımlı oldukları belirlenmiştir. *Halobacteriaceae* familyası ile ilgili çalışmalar ilk yıllarda az olduğundan dolayı bu familyanın çeşitliliğinin düşük olduğu varsayıldı fakat sonraları birçok yeni temsilcinin keşfi ile birlikte morfolojik ve fizyolojik çeşitliliğin arttığı gözlemlenmiştir (Gerday ve Glansdorff 2007).

Halobacteriaceae familyası 1970'lere kadar Bacteria domaini içerisinde adlandırılmıştır. Fakat *Halobacterium salinarum*'unun keşfi ile bu familyanın Archaea domaini içerisinde yer aldığı belirlenmiştir (Gerday ve Glansdorff 2007). Çizelge 1.1'de bu familyaya ait bazı cinsler ve onlara ait türler gösterilmiştir. Bu cinslerin dışında *Halosimplex*, *Halobiforma*, *Halomicrobium*, *Halosarcina*, *Halostagnicola*, *Haloalkalicoccus*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Halodaptatus*, *Haloquadratum*, *Halovivax*, *Halolamina*, *Halomarina*, *Salarchaeum*, *Haloarchaeum*, *Haloalkalophilum*, *Halobellus*, *Halogranum*, *Halonotius*, *Halorientalis*, *Halorussus*, *Natronoarchaeum* ve *Natronolimnobiuss* gibi 38 cinsin varlığı son yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Oren 2002a; Anonim 2011a)

Çizelge 1.1. Archaea domaini içerisinde yer alan bazı halofilik cins ve türler

Domain: Archaea, Filum: Euryarchaeota, Sınıf: Methanococci		
Ordo: Methanomicrobiales	Familiya: Methanospirillaceae	
Cins: Methanocalculus		
Tür	Habitat	Tuz Aralığı (g/l, optimum g/l)
<i>Methanocalculus halotolerans</i>	Fransa, Petrol Bölgesi	0-125; Opt. 50
Ordo: Methanosarcinales	Familiya: Methanosarcinaceae	
Cins: Methanohalobium		
<i>Methanohalobium evestigatum</i>	Kırım, Tuz Lagünü	150-300
Cins: Methanohalophilus		
<i>Methanohalophilus mahii</i>	Büyük Tuz Gölü Sedimenti	30-150; Opt. 120
Cins: Halomethanococcus		
<i>Halomethanococcus doii</i>	San Francisco, Solar Tuzla	100-200; Opt. 150-180
Sınıf: Halobacteria	Ordo: Halobacteriales	Familiya: Halobacteriaceae
Cins: Halobacterium		

Çizelge 1.1. (Devamı) Archaea domaini içerisinde yer alan bazı halofilik cins ve türler

<i>Halobacterium salinarum</i>	Tuz Gölleri	175-300; Opt. 175-290
Cins: <i>Haloarcula</i>		
<i>Haloarcula marismortui</i>	Ölü Deniz	Opt. 200-230
<i>H. quadrata</i>	Mısır	160-250; Opt. 200-250
Cins: <i>Halobaculum</i>		
<i>Halobaculum gomorense</i>	Ölü Deniz	60-150; Opt. 90-150
Cins: <i>Halococcus</i>		
<i>Halococcus morrhuae</i>	Tuzlanmış Balık	145-300; Opt. 200-260
Cins: <i>Haloferax</i>		
<i>Haloferax volcanii</i>	Ölü Deniz	60-260; Opt. 100-150
<i>H. mediterranei</i>	Tuzla, İspanya	Opt. 170
Cins: <i>Halogeometricum</i>		
<i>Halogeometricum borinquense</i>	Tuzla, Porto Rico	80-300; Opt. 270
Cins: <i>Halorhabdus</i>		
<i>Halorhabdus utahensis</i>	Büyük Tuz Gölü	90-300; Opt. 270
Cins: <i>Halorubrum</i>		

Çizelge 1.1. (Devamı) Archaea domaini içerisinde yer alan bazı halofilik cins ve türler

<i>Halorubrum saccharovororum</i>	Tuzla, Kaliforniya	90-300; Opt. 200-265
<i>H.sodomense</i>	Ölü Deniz	30-250; Opt. 100-150
<i>H.vacuolatum</i>	Magadi Gölü, Kenya	150-300; Opt. 200
Cins: Haloterrigena		
<i>Haloterrigena turcmenica</i>	Alkali toprak	Opt. 120
<i>H.thermotolerans</i>	Tuzla, Porto Rico	120; Opt. 175-200
Cins: Natrionalba		
<i>Natrionalba asiatica</i>	Kumsal toprağı, Japonya	120-300; Opt.200-240
<i>N.taiwanensis</i>	Taiwanese Solar Tuzla	120- ; Opt. 200
<i>N.magadii</i>	Magadii Gölü, Kenya	120-300; Opt. 200
Cins: Natrinema		
<i>Natrinema pellirubrum</i>	Tuzlanmış Deri	Opt. 200-250
Cins: Natronobacterium		
<i>Natronobacterium gregoryi</i>	Magadii Gölü, Kenya	120-300; Opt. 175
Cins: Natronococcus		
<i>Natronococcus occultus</i>	Magadii gölü, Kenya	80-300; Opt. 200-220

***Halobacterium* Cinsi**

Halobacterium cinsi üyelerinin hücreleri çubuk şeklinde ve hareketlidir. Optimum geliştiği NaCl 4-5 M iken, 3-5.2 M arasında da gelişim gösterebilmektedir. Optimum pH'ı nötral olarak belirlenirken, optimum üreme sıcaklığı 35-50°C arasındır. Kolonileri ise kırmızı pigmentasyon oluşturur (Dwarkin ve ark. 2001).

***Halorubrum* Cinsi**

Halorubrum cinsi üyeleri çubuk şeklinde ya da şekilsiz hücrelere sahiptir ve hareketlidir. Bu cinsteki üyelerin gaz vezikülleri yoktur. Optimum geliştiği NaCl 3.5-4.5 M iken 1.5-5.2 M arasında da gelişim gösterebilmektedir. Optimum pH'ı nötral olarak belirlenirken, optimum üreme sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. Kolonileri ise kırmızı pigmentasyon oluşturur (Dwarkin ve ark. 2001).

***Haloarcula* Cinsi**

Haloarcula cinsi üyeleri düzensiz çubuk şeklinde ve hareketlidir. Bu cinsteki üyelerin gaz vezikülleri yoktur. Optimum geliştiği NaCl 3.5-4.3 M, optimum pH'ı 7.4-7.5 olarak belirlenirken, optimum üreme sıcaklığı 40°C olarak belirlenmiştir. Kolonileri ise kırmızı pigmentasyon oluşturur (Torreblanca ve ark. 1986).

1.6.1.2. Bacteria

Çoğu bilinen halofilik ve halotolerant prokaryot Bacteria domainine aittir. Filamentliler, tek hücreliler ve siyanobakterilerilerin çeşitli komüniteleri 200-250 g/l üzerindeki tuz konsantrasyonlu tuzlalarda bulunmuştur. Siyanobakteri tabakasının aşağısında, fotosentetik mor sülfür bakterilerinin yoğun gelişimi görülmektedir. Bacteria domaini içerisinde ayrıca aerobik heterotrofik organizmaları içeren *Salinibacter* cinsi keşfedilmiştir. Bu grup çoğu halofil arkeye göre daha tuz bağımlıdır ve bu durum onların tüm mikroorganizmalar içerisinde en iyi tuza adapte olan grup olarak düşünülmüştür. Bacteria içerisinde bir ırk daha vardır ki bu ırk zorunlu anaerobiklerin bulunduğu *Halanaerobiales* ordosudur.

Bu fermentatif organizmalar 50-200 g/l tuzda optimum gelişirler ve hipersalin göllerde anaerobik sedimentlerdeki karbonhidratların ve diğer bileşiklerin anaerobik yıkımından sorumludur (Gerday ve Glansdorff 2007).

Çizelge 1.2'de Bacteria domaini içerisindeki halofilik ve halotolerant türlerin bir kısmı verilmiştir (Oren 2002a; Anonim 2011b).

Çizelge 1.2. Bacteria domaini içerisinde yer alan bazı halofilik ve halotolerant cins ve türler

Domain :Bacteria Filum: Cyanobacteria Sınıf I: Cyanobacteria		
Cins: <i>Halospirulina</i>		
Tür	Habitat	Tuz Aralığı (g/l, optimum g/l)
<i>Halospirulina tapeticola</i>	Tuzla, Meksika	30-200
Filum: Proteobacteria Sınıf: Alphaproteobacteria Ordo: Rhodospirillales		
Familya: Rhodospirillaceae		
Cins: <i>Rhodothalassium</i>		
<i>Rhodothalassium salexigens</i>	Tuzlu Su	50-200; Opt. 60-80
Cins: <i>Thallossospira</i>		
<i>Thallossospira xiamenensis</i>	Batı Pasifik Okyanusu	Opt. 100
SınıfII: Betaproteobacteria Ordo: Hydrogenophilales Familya: Hydrogenophilaceae		

Çizelge 1.2. (Devamı) Bacteria domaini içerisindeki bazı halofilik ve halotolerant cins ve türler

Cins: <i>Halothiobacillus</i>		
<i>Halothiobacillus halophilus</i>	Hipersalin Göl, Avustralya	240 ve üzeri; Opt.45-60
SınıfIII:Gammaproteobacteria Ordo: <i>Chromatiales</i> Familya: <i>Chromatiaceae</i>		
Cins: <i>Halochromatium</i>		
<i>Halochromatium salexigens</i>	Tuzla,Fransa	40-200; Opt.80-110
Familya: <i>Ectothiorhodospiraceae</i>		
Cins: <i>Halorhodospira</i>		
<i>Halorhodospira halophila</i>	Tuz ve Soda Gölü	75-350; Opt. 110-320
Ordo: <i>Oceanospirillales</i> Familya: <i>Halomonadaceae</i>		
Cins: <i>Halomonas</i>		
<i>Halomonas elongata</i>	Tuzla, Bonaire	35-300; Opt. 35-80
<i>H.eurihalina</i>	Tuzlu toprak, Tuzlalar	50-200; Opt. 75
<i>H.halophila</i>	Tuzlu Toprak	20-300; Opt. 75
<i>H.salina</i>	Tuzlu toprak, tuzlalar	25-200; Opt. 50
<i>H.magadiensis</i>	Doğu Afrika Soda gölü	0-200; Opt. 0-70
<i>H.maura</i>	Tuzla, Fas	10-150; Opt. 75-100
Cins: <i>Chromohalobacter</i>		

Çizelge 1.2. (Devamı) Bacteria domaini içerisindeki bazı halofilik ve halotolerant cins ve türler

<i>Chromohalobacter marismortui</i>	Ölü Deniz, Tuzlalar	10-300; Opt.100
Ordo: Alteromonadales Familiya: Alteromonadaceae		
Cins: Marinobacter		
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Akdeniz Deniz Suyu	5-200; Opt.35
Familiya: Idiomarinaceae Cins: Idiomarina		
<i>Idiomarina baltica</i>	Baltık Denizi	80-100; Opt. 30-60-
Ordo: Vibrionales Familiya: Vibrinaceae		
Cins: Salinivibrio		
<i>Salinivibrio costicola</i>	Salamura et, Tuzlu su	5-200; Opt.100
Sınıf: Bacteroidetes Ordo: Bacteroidetes Familiya: Rhodothermaceae		
Cins: Salinibacter		
<i>Salinibacter ruber</i>	Tuzla	Opt.200-300

***Salinibacter* Cinsi**

Salinibacter çubuk şekilli, genellikle kıvrılmış ve hareketli hücrelere sahiptir. Gram negatif olarak boyanan *Salinibacter*, çoğu halofilik ardeden daha fazla tuz konsantrasyonu içeren ortamlarda gelişmektedir (Ventosa 2004).

***Halomonas* Cinsi**

Gram negatif olarak boyanan *Halomonas* cinsi üyeleri beyaz-opak renkli pigmentasyon gösterirler. Optimum NaCl konsantrasyonu %3.5-20, optimum pH'ı 5-9.00 ve optimum gelişme sıcaklığı 4-45°C'dir (Vreeland ve ark. 1980).

1.6.1.3. Eukarya

Eukarya domaininde halofillere ait birkaç temsilci bulunmaktadır. 330 g/lit tuz bulunan tüm dünyadaki tuz göllerinde *Artemia* cinsine ait türler bulunmaktadır. Hipersalin çevrelerdeki Eukarya'yı en iyi temsil eden ve bir alg olan *Dunaliella*'dır. *Dunaliella* tek hücreli yeşil bir algdır ve Büyük Tuz Gölü ve Ölü Deniz gibi tuzcul ortamların primer üreticisidir. Bazı türleri büyük miktarda β -karoten depolar ve onların hücreleri yeşilden turuncu-kırmızı renge kadar değişebilir. Bazı *Dunaliella* türleri düşük tuzlu deniz habitatlarını tercih ederken bazıları ise *D.salina* gibi yüksek oranda NaCl içeren tuzlalarda gelişebilmektedir (Gerday ve Glansdorff 2007).

Başka bir yeşil alg ise *Picocystis salinarum*'dur. Bu 2 μ m'lik küçük organizma kristalize tuzlalardan elde edilen ilk organizmadır. Mono Gölü'nden elde edilen başka bir straini ise daha geniş bir tuzluluk konsantrasyonunda (0-260 g/lit) gelişebilmektedir (Oren 2002a).

Diatomeler hemen hemen 150g/lit'lik tuz konsantrasyonunda gelişebilen organizmalardır. Diatomelerin tuz toleransı ile ilgili yapılan çalışmalarda 75 g/lit tuzluluk altında optimum geliştikleri belirlenmiştir (Oren 2002a).

Protozoonlara bakıldığında silliler, flagellalılar ve ameboid protozoalar araştırılmış ve halofilik ve halotolerant organizmaların varlığı belirlenmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonu çevrelerde avlanma mümkün olmasına rağmen, protozoonlar hipersalin çevrelerde çok bol bulunmamaktadır (Gerday ve Glansdorff 2007).

Diğer bir Eukarya grubu olan mantarlar ise yüksek tuzlu çevrelerde bol miktarda bulunmaz. *Trimmatostroma salinum* Adriatik'ten izole edilen ilk izolattır. *Hortea werneckii* gibi halofilik siyah mayalar doğal ekolojik niş olarak solar tuzlalarda bulunduğu tespit edilmiştir (Gerday ve Glansdorff 2007).

1.6.2. Yüksek Tuzlu Çevrelere Adaptasyon

Hücreler çevrelerindeki değişikliklere adapte olabilmek için dinamik ve önemli özelliklere sahiptir. Halofilik organizmalarda çevredeki artan NaCl'e karşı geliştirilen uyum bu şekilde hücre özellikleri ile sahip olunmaktadır. Dışsal NaCl artışına karşı oluşturulan adaptasyon üç domainde de sitoplazma içerisinde çeşitli küçük moleküllerin birikimi ile sağlanmaktadır. İnorganik katyonlar ozmotik dengede anahtar rol oynarken, tuz stresine bir cevap olarak uyumlu organik çözücülerde bu adaptasyonu gerçekleştirmektedir (Madigan ve Martinko 2010).

1.6.2.1. İnorganik Katyonlar

Sodyum, enzimlerin kofaktörü ve ozmotik dengede rol oynaması dolayısıyla yaşamın gerekli elementlerinden biridir. Fakat sodyum iyonlarının aşırı miktarı hücre için toksiktir ve sodyumun hücre dışına atılımı için çok fazla enerji tüketimi gerekmektedir. Hücrelerde daima sodyum konsantrasyonu hücrenin çevresine göre daha düşüktür, potasyum ise hücrede daha yüksek oranda bulunur (Madigan ve Martinko 2010).

Ekstrem halofilik arkeler üremeleri için yüksek miktarda sodyuma ihtiyaç duyarlar. Hücreler bu sodyumu genellikle yetişme ortamlarından alırlar (Seckbach 1999). Halofillerin tuz ihtiyacına yönelik yapılan çalışmalarda sodyum iyonunun yanında, kimyasal olarak yakın bir inorganik iyon olan potasyumada ihtiyaç

duydıkları belirlenmiştir. Böylece halofiller üremeleri için hem Na^+ a hem de K^+ a ihtiyaç duymaktadırlar (Madigan ve Martinko 2010).

Halofilik aerobik arke yüksek oranda K^+ ve Cl^- 'e sahip görünürken, bunların miktarları gelişme durumlarına önemli ölçüde bağlıdır. Bakterilerde ise yüksek oranda hücre içi K^+ gözlenmiştir. Örneğin *Salinibacter ruber*'de ozmotik denge için hücre içinde en temel bileşik K^+ 'dur. K^+ temel hücre içi katyon gibi görünmesine rağmen bazı hücreler magnezyumu yüksek oranda hücre içinde depolar. Bu depolama genellikle düşük çözünmüş organik karbon durumunda deniz bakterilerinde görülür ve besin miktarı arttıkça önemli oranda magnezyum hücre içinde azalır. Bundan da anlaşılıyor ki yüksek hücre içi magnezyum karbon sınırlamasının bir ölçütüdür (Seckbach 1999).

Halofilik organizmalar çevrelerinde bulunan yüksek orandaki sodyuma direnç gösterebilmek için birkaç mekanizma geliştirmişlerdir. Bunlardan ilki hücreden sodyumun uzaklaştırılmasına yönelik olarak plazma membranındaki sodyum pompalarıdır. İkinci mekanizma ise fosfolipid tabakadır ki bu tabaka iyonlara karşı geçirgenlik göstermez. Plazma membranının geçirgenlik kapasitesi sodyum ve diğer iyonlara karşı spesifik kanallar sayesinde olabilmektedir. Son mekanizma ise ekstrem halofillerde yüksek miktardaki sodyuma karşı hücresel enzimlerin nispeten toleranslı olmasıdır (Seckbach 1999).

1.6.2.2. Organik Çözünür Maddeler

Ozmotik dengede kullanılan organik moleküller polyollar, şekerler, aminoasitler ve türevleri, betainler ve ektoinlerdir. Bu organik moleküllerden bakteri ve ökaryotlar genellikle nötral yüklü çözünür maddeleri tercih ederken, arkeler negatif yüklü maddeleri tercih eder. İlginç olarak arkeler, bakteri ve ökaryotlar tarafından depo edilen nötral ve zwitteriyonik maddelerin birçoğunu modifiye ederek negatif yüklü yapma eğilimindedir. Ozmotik dengede kullanılan bu maddeler ya hücre tarafından sentez edilmekte ya da besi ortamından hücre

içine taşınmaktadır. Bu moleküllerin temel özelliği herhangi hücresel fonksiyonu inhibe etmezken, bireysel enzim aktivitelerini düzenlemektir. Bu davranış onların ‘uyumlu çözüdür’ olarak isimlendirilmesine yol açmıştır. Ayrıca bu bileşikler yüksek ozmotik şartlar altında hücrenin su kaybetme eğilimini, hücrenin çevresine göre pozitif su dengesini sağlayarak engellerler (Robert 2005).

Organik osmolitler üç genel kimyasal kategoriye ayrılır. Bunlar zwitteriyonik çözünenler, yüksüz çözünenler ve organik anyonik çözünenlerdir.

Protein biyosentezinin ara ürünü olan ve hücre içerisinde biriktirilen serbest aminoasitlerin ozmotik dengede rol oynadığı düşünülüyordu fakat bu ara ürünlerin düşünüldüğü gibi hücre içerisinde yüksek konsantrasyonda biriktirilmediği belirlenmiştir. Organik çözücü olarak aminoasitlerden türeyen birkaç zwitteriyonik molekül bakteri ve arke hücrelerinde sentez ve depo edilir. Örneğin ilk olarak *Halorhodospira halochlorins*'de belirlenmiş olan ektoin (1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid) halotolerant ve halofilik bakterilerde bol miktarda sentezlendiği belirlenmiştir. Çizelge 1.3'te bazı zwitteriyonik çözünenler ve hangi organizmalarda yaygın olarak buldukları gösterilmiştir (Robert 2005).

Çizelge 1.3. Zwitteriyonik çözünenler ve hangi türlerde buldukları (Robert 2005)

Zwitteriyonik Çözünenler	Halofilik/Halotolerant Organizma
Ektoin	<i>Chromohalobacter israelensis</i> ; <i>Halomonas elongata</i>
Betain	<i>Actinopolyspora halophila</i> ; <i>Halorhodospira halochloris</i>
Hidroksi ektoin	<i>Halomonas elongata</i> ; <i>Nocardioopsis halophila</i>

Genellikle ökaryotlarda ozmolit olarak tanımlanan polar moleküller halofilik bakterilerde varlığı nedeniyle onlarda da ozmolit olarak değerlendirilmektedir. Örneğin gliserol *Dunaliella*'da yaygın bir ozmolittir, ayrıca halotolerant maya olan *Debaryomyces hansenii* ve *Hortea werneckii* gliserol birikimi yaparlar. Çizelge 1.4'te bazı yüksüz çözünenler ve hangi organizmalarda yaygın oldukları gösterilmiştir (Robert 2005).

Çizelge 1.4. Yüksüz çözünenler ve hangi türlerde bulunduklar (Robert 2005)

Yüksüz çözünenler	Halofilik/Halotolerant Organizma
a-glukosilgliserol	<i>Microcystis firma</i>
Trehaloz	<i>Chromohalobacter israelensis</i> ; <i>Natrialba magadii</i>
a-mannosilgliseramid	<i>Rhodothermus marinus</i>

Hücre içi negatif potansiyele ve sıklıkla yüksek hücre içi K^+ a sahiptir. Organik negatif yüklü çözünenler yüksek hücre içi K^+ için denge sağlarlar. Bu yüzden *Halomonas elongata* gibi birçok bakteri ve arke ozmolit olarak organik anyonik çözünen olan L- α -glutamat kullanır. Çizelge 1.5'te bazı organik anyonik çözünenler ve hangi organizmalarda yaygın oldukları gösterilmiştir (Robert 2005).

Çizelge 1.5. Organik anyonik çözünenler ve hangi türlerde buldukları (Robert 2005)

Organik anyonik Çözünenler	Halofilik/Halotolerant Organizma
L-a-glutamat	<i>Halomonas elongata; Halobacterium</i> sp. NRC-1
b-glutamat	<i>Nocardiopsis halophila</i>
Hidroksibütirat	<i>Photobacterium profundum</i>

1.6.3. Halofilik Mikroorganizmaların Hücresel Yapıları

Halofiller fizyolojik biyokimyasal, moleküler ve genetik anlamda çok çeşitliliğe sahip değildir. Ancak morfolojik olarak dikkat çekici bir şekilde morfolojik özelliklere sahiptirler. Kırmızı kristalize sular incelendiğinde kare ve dikdörtgen hücrelerle karşılaşmaktadır. İlk kare arke Walsby tarafından Mısır'ın Sinai tuz havuzunda 1980'de tanımlandı. Daha sonraları ise tüm dünyada kristalize havuzlarda yaygın olarak bulunduğu tespit edildi. Bu organizmanın ışığı kırıcı gaz veziküllerine sahip olduğu belirlendi. Kare arkeler *Halobacteriaceae* familyasında gözlenmektedir ve filogenetik olarak *Haloquadratum* cinsine ait olduğu düşünülmektedir. Kare arkelerle ilgili herhangi bir kültüre alabilme işlemi çok yeni olduğundan fizyolojisi hakkında bilinenler çok azdır (Gunde-Cimerman ve ark. 2005).

Halofilik arkelerde birkaç türün hücre duvarının dışında polisakkarit kapsül bulundurduğu tespit edilmiştir. *Haloferax* cinsine ait türlerde bu polisakkarit kapsülün yaygın olduğu ve ana bileşik olarak mannoz içerdiği bilinmektedir. Halofilik bakteri olan *Halomonas eurihalina* hücre duvarında %45 heksoz ve %15 protein içermektedir (Oren 2002a).

Gaz vezikülleri birçok planktonik bakteri ve arke tarafından üretilir ve çözülmüş gazlar ile pasif difüzyon yoluyla organizmanın yüzdürme aracı olarak davranır. Gaz veziküllerinin hücre içerisindeki konumu faz-kontrast mikroskobu ile kolaylıkla belirlenebilir. Gaz vezikülünün dışı hidrofobik GvpA proteini ve hidrofilik GvpC proteinini içerir. Bilinen tüm bakteri ve arke gaz vezikül üreticileri silindirik şekilli gaz vezikülü sentezlerken sadece *H.salinarum* iğ şekilli gaz vezikülü içerir (Ventosa 2004).

Halobacteriales ordosu içerisindeki türlerin hareketli olduğu ve bu hareketin flagella ile gerçekleştirildiği bilinmektedir. Arke üyeleri sağa dönümlü flagella hareketi gerçekleştirir. Halofilik bakteri grubunda flagella ile hareket çok yaygındır ve sola dönümlü flagella hareketi belirlenmiştir (Oren 2002a).

Halofilik arkelerin sitoplazmik membranı lipidlerden ve proteinlerden oluşmaktadır. Solunum, elektron transportu, iyonların, besinlerin ve diğer bileşiklerin hücre içi ve dışına transportu burada gerçekleşirken, bakteriorhodopsin ve halorhodopsin iyon pompaları membran içerisinde yer alır (Oren 2002a).

1.6.4. Halofillerin İdentifikasyonu

Halofillerin identifikasyonu işlemlerinde hücre morfolojisi, boyanma özelliği gibi özelliklerin incelendiği fenotipik analizler, kimyasal analizler ve ribozomal RNA diziliminden elde edilen verilerden yararlanılan genotipik analizler gerçekleştirilmektedir.

Halobacteriales ordosunda yeni bir taksonun identifiye edilebilmesi için minimum standartlar belirlenmiştir. Bunlar;

- Koloni morfolojisi
- Hücre morfolojisi
- Hücre hareketi
- Koloni pigmentasyonu

- Gram reaksiyonu
- Hücre lizisini engellemek için gerekli tuz konsantrasyonu
- Minimum ve optimum NaCl ve Mg⁺² konsantrasyonları
- Gelişme için tuz konsantrasyonu aralığı
- Gelişme için 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
- DNA-DNA hibridizasyonu (sadece yeni tür tanımlarken) içermektedir (Oren ve ark. 1997).

1.6.4.1. Ribozomal RNA

Ribozomal RNA'lar, onların mükemmel evrimsel kronometre olmasını sağlayacak özelliklere sahiptir. Ribozomal RNA'lar oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın olan moleküllerdir ve tüm hücrelerde nükleotit dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içerirler. Prokaryotlarda 5S, 16S ve 23S olan üç çeşit ribozomal RNA vardır. 16S rRNA ribozomun küçük alt biriminin bir parçasıdır ve dizileme çalışmalarında odaklanılan birimdir (Madigan ve Martinko 2010).

Genel olarak organizmaların >%97 oranında benzer rRNA genlerine sahip olduğu kabul edilir. Ancak yakın ilişkili türler arasında 16S rRNA gen dizi

analizleri genellikle düşüktür. Böylece DNA-DNA hibridizasyonu veya diğer teknikler ile kesin tür tanımının yapılması gereklidir.

Mozaik rRNA genlerinin varlığı strainler ve türler arasında rRNA sistronlarının rekombinasyonunu ve horizontal transferin varlığını gösterir. Bu da bazı bakteriyel gruplar içerisinde filogenetik amaçlar için rRNA genlerinin kullanılabilirliğini sınırlandırır. Horizontal değişim, DNA homoloji değeri ve 16S rRNA gen benzerliği arasındaki uyumsuzluk yaratmaktadır (Vanechoutte ve Heyndricks 2001).

Filogeni ve taksonomide rRNA geninin kullanımındaki bir diğer problem bireysel genomlarda inter-operon dizi değişkenliğinin varlığıdır. Çoğu türde, bireysel hücrelerin genomu çoklu RNA operanlar ya da aleller içerir. Görünüşte genomda 16S rRNA geninin farklı alelleri farklı allellik dizi gösterebilir. Örneğin *Haloarcula marismortui* %5'ten daha fazla dizi değişikliği içeren iki 16S rRNA geni içerir. Çoklu kopyalı genlerin alelleri arasındaki dizi farklılığı, dizileme gerçekleştirilirken dizilemede belirsizliğe yol açar. Çünkü çoğaltım karışımı farklı dizilerin alelleri içerir. Bu belirsizlik filogenetik analize engel olmaktadır (Vanechoutte ve Heyndricks 2001).

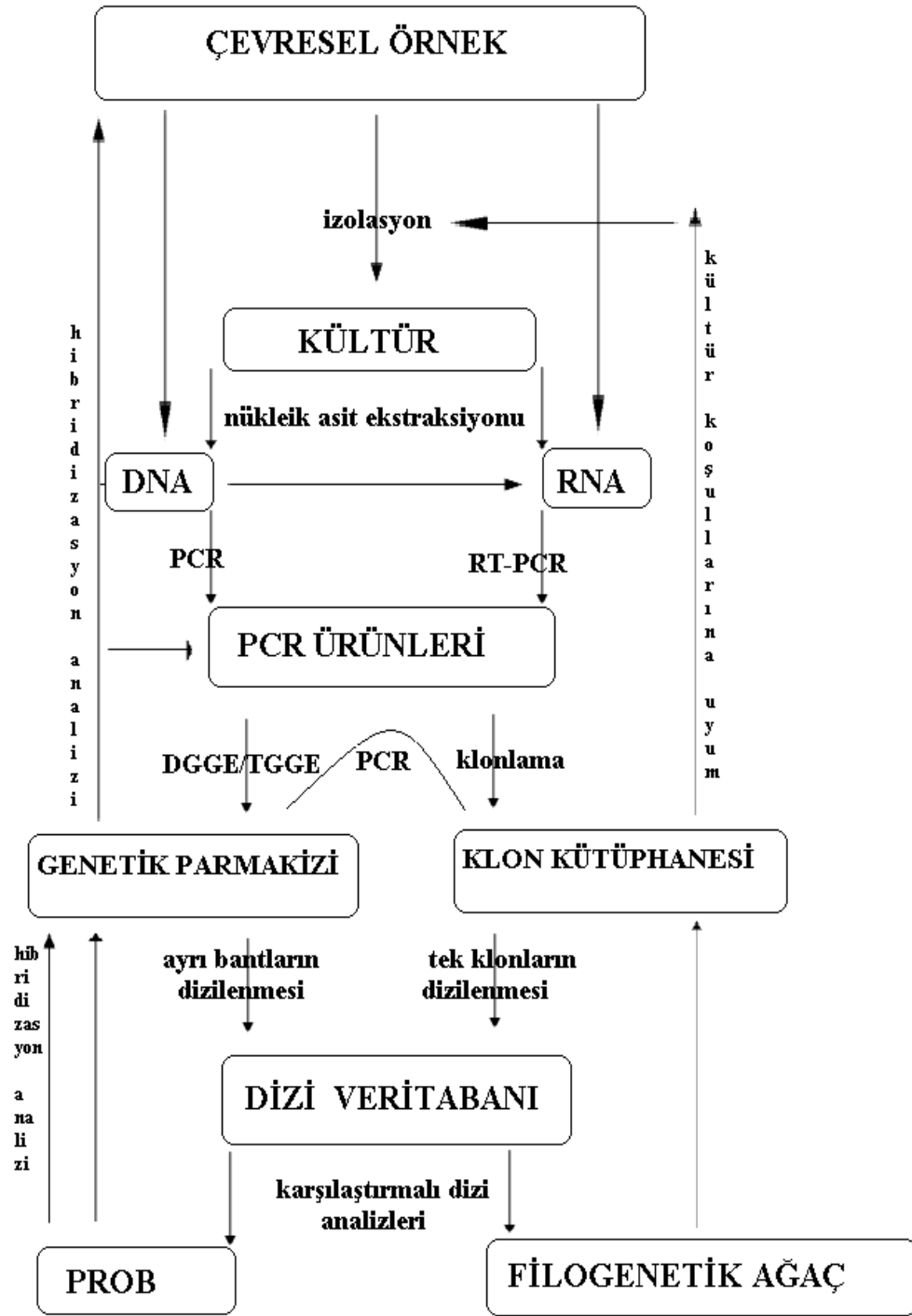
1.7. Kültür Bağımlı ve Kültür Bağımsız Çalışmalar

Mikrobiyal çeşitlilik ve onun doğadaki rolü hakkında bilgilerimiz oldukça zayıftır, çünkü geleneksel yöntemler olarak adlandırılan mikroskopi ve kültür yapma teknikleri mikroorganizmaların identifikasyonu ve sınıflandırmasını sınırlandırır. Mikroorganizmaların morfolojilerine bakarak onları sınıflandırmak oldukça zordur, çünkü onlar küçük, basit ve gruplandırma için güvenilir ve sağlam ayırt edici dışözelliklere sahip değildirler. Fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri ile sınıflandırma ise hemen hemen mümkün değildir. Çünkü doğadaki mikroorganizmaların %99'una yakını saf kültür olarak izole edilememektedir. Bu yüzden mikrobiyal çeşitliliği ve onun ekosistemdeki rolünü daha iyi anlamak için

mikrobiyal yaklaşımın yanında moleküler yaklaşımlarda gereklidir (Muyzer 1999a).

Moleküler biyolojik tekniklerin gelişimi genetik seviyede mikrobiyal çeşitlilik çalışmasına izin vermektedir. Mikroorganizmalar onların gen benzerliklerine göre gruplandırılır ve bu da onların evrimsel ilişkisini yansıtır. Doğal örneklerde mikrobiyal çeşitliliği keşfetme çalışmalarında en güçlü teknikler klonlama ve 16S rRNA dizilenmesidir. Ardışık populasyon değişikliklerini izlemek için klonlama tekniği çok zahmetli, zaman alıcı ve pahalı olması ile tercih edilmez. Hibridizasyon teknikleri ise spesifik oligonükleotid probalar kullanımı gerektirir ve bunlar ya çok spesifik grupları ya da çok genel populasyonları hedef alır (Muyzer 1999a).

Kültür bağımlı ve kültür bağımsız çalışmalarda Şekil 1.4'te gösterildiği gibi bir yol izlenebilmektedir. DGGE ile kompleks çevrelerde populasyonların varlığı ve fonksiyonu belirlenebilirken, takson spesifik probalar ile hibridizasyon analizi gerçekleştirilebilir. Ayrıca komünite üyeleri jellerden kesimi takiben dizileme veya saf kültürlerin izolasyonu ile dizilime işlemleri ile komünite hakkında bilgiler edinilebilmektedir (Muyzer ve Smalla 1998).



Şekil 1.4. Kültür bağımlı ve kültür bağımsız moleküler çalışmalarda izlenecek yol (Muyzer ve Smalla, 1998).

Hipersalin ekosistemlerde mikrobiyal çeşitlilik çalışmaları 1990'lu yılların ortasında Benloch ve arkadaşlarının İspanya, Alicante Santa Pola tuzlasındaki çalışmaları ile başlamıştır (Gerday ve Glansdorff 2007).

1.7.1. Amplifiye Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA)

Amplifiye ribozomal DNA restriksiyon analizi ya da PCR-RFLP analizi olarak bilinen ARDRA, rRNA genlerinin restriksiyon analizi olarak özetlenebilmektedir. Bu isim önceleri ribotiplendirme için kullanılmaktaydı fakat ribotiplendirmede prob olarak rRNA sistronları ile seçici restriksiyon fragment hibridizasyonunu içermesinin farkına varıldıktan sonra bu karışıklık ortadan kalktı ve ARDRA'nın rRNA genlerinin analizi olduğu gerçeği kabul edildi. (Vanechoutte ve Heyndricks 2001).

ARDRA hızlı bir genotipik tekniktir ve komünitelerdeki farklı türlerin varlığını belirlemek için kullanılabilir. Bu amaçla ARDRA birçok cins ve grupta türlerin ayrımının sağlanması için uygulanmıştır. Bu uygulamalarda biyokimyasal yöntemlerle tanımlanamayan türlerin ARDRA ile tanımlandığı belirlenmiştir (Vanechoutte ve Heyndricks 2001).

ARDRA kültüre edilmiş organizmaların kaynatılarak ya da alkalın muamelesi gibi basit bir DNA ekstraksiyonu yöntemi sonucu elde edilen DNA'nın PCR ile etkili bir şekilde çoğaltılmasına, sonrasında restriksiyon kesimine ve son olarak agaroz jel elektroforezi uygulamasına dayanan bir tekniktir. Az sayıda restriksiyon enzimi kullanılırken, çok miktardaki izolattın dizi polimorfizmi dizileme işlemine göre çok daha az zaman harcanarak yapılabilmektedir (Vanechoutte ve Heyndricks 2001).

ARDRA ile komünite çalışmalarında başka bir yol ise 16S rRNA geninin evrensel primerler kullanılarak direkt çoğaltılması, bu genin klonlanması ve klonların ARDRA ile profilendirilmesidir. Böylece komünitede var olan fakat kültür etme koşulları ile kültüre alınamamış türlerin de belirlenmesi mümkün

olmuştur. Sonuç olarak komünitenin doğru bir kompozisyonu için kültür edilemeyen türlerin tanımlanması direk çoğaltım ile güvenilir bir şekilde klonlama yoluyla elde edilebilmektedir (Vanechoutte ve Heyndricks 2001).

ARDRA'nın uygulanmasında en önemli adımlardan biri restriksiyon enzimlerinin seçimidir. Çoğaltılacak bölgenin uzunluğunun sınırlı olması nedeniyle, seçilecek olan enzimin baz dizisi önemlidir. Çok sayıda ve çok yakın bantları değerlendirme zor olacağından, enzim seçiminde DNA dizisini daha aralıklı kesebileceği düşünülen enzimler kullanılmalıdır. Bunun için tahmini türün 16S rRNA'sı deneysel olarak veritabanlarında, kullanılacak olan enzim ile kesilebilir (Vanechoutte ve Heyndricks 2001).

ARDRA'da önemli olan bir diğer konu ise agarozun kullanımı ve jelin konsantrasyonudur. 100-1000 baz çiftlik restriksiyon fragmentlerinin yüksek rezolusyonla ayrımı için %2'lik agaroz kullanımı tavsiye edilmektedir. Ayrıca paternlerin baz büyüklüğünün belirlenebilmesinde kullanılacak markırlarında önemi oldukça fazladır. ARDRA profillerinin manual olarak değerlendirilmesi yapılabileceği gibi bu amaç için GelCompar veya BioNumerics gibi yazılımlarda mevcuttur (Vanechoutte ve Heyndricks 2001).

Mozaik rRNA genleri filogenetik amaçlar için rRNA genlerinin kullanılabilirliğini sınırlandırır. Horizontal değişim, DNA homoloji değeri ve 16S rRNA gen benzerliği arasındaki uyumsuzluk yaratmaktadır. Örneğin yapılan çalışmalarda yüksek DNA homojisi ve biyokimyasal olarak tanımlanan türlerin 16S rRNA'larını restriksiyon kesimlerinde farklı profiller ortaya çıktığı belirlenmiştir (Vanechoutte ve Heyndricks 2001).

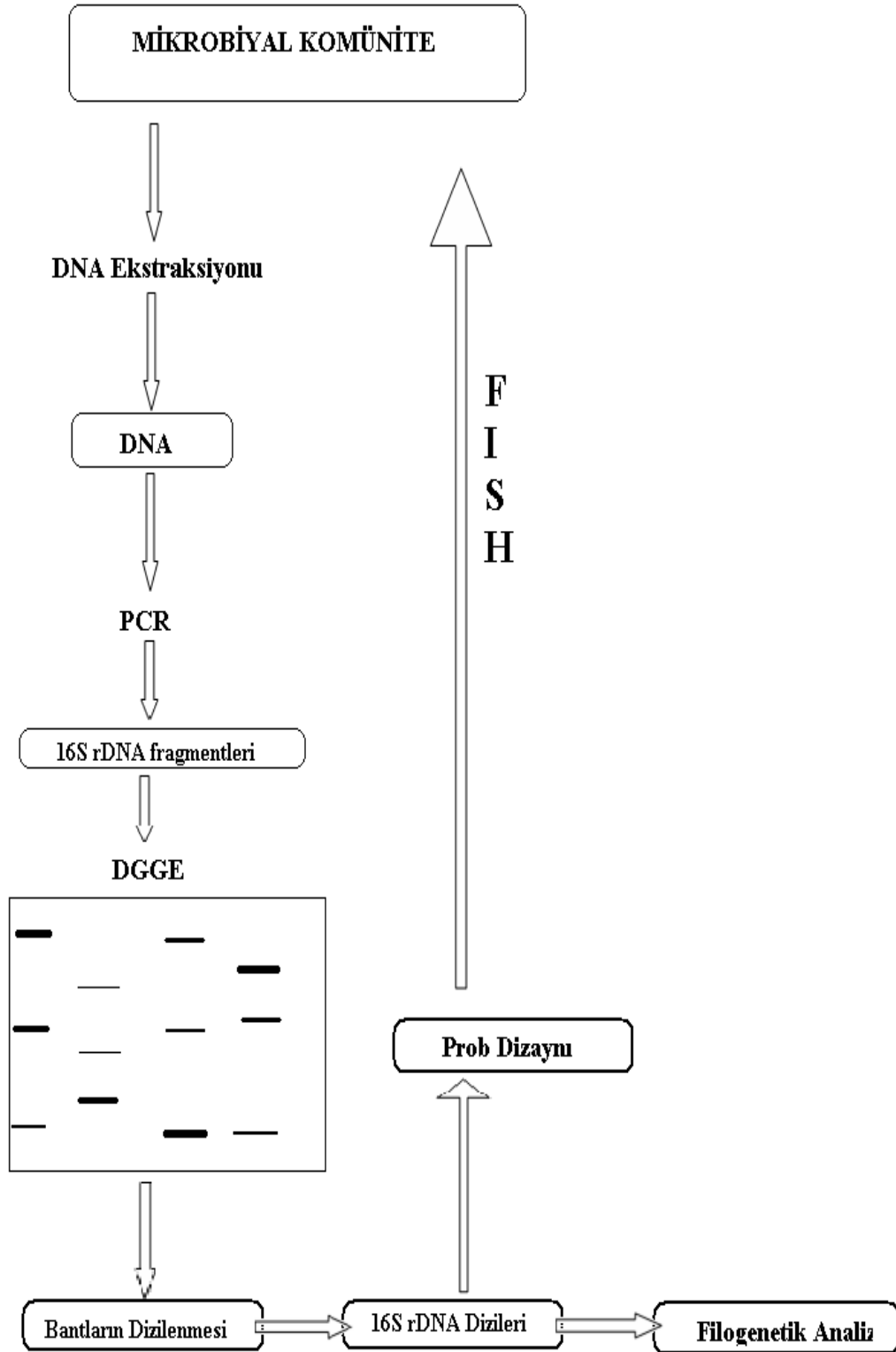
Mikro heterojenite ARDRA için tahmin problemlerine neden olur. Çünkü düşük kopya sayılı aleller restriksiyon bölgelerinde spesifik dizi farklılıklarına sahip olduklarından ek bantların oluşmasına neden olabilirler (Vanechoutte ve Heyndricks 2001).

1.7.2. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE)

Genetik parmak izi yöntemleri türlerin nükleik asitlerinin fiziksel ayırımına temel alan komünite çeşitliliğinin patern ya da profillerinin analizine dayanmaktadır. Bu parmak izi yöntemlerinden biri de DGGE'dir (Muyzer 1999a). 1993'te Muyzer ve arkadaşlarının tanımladığı genetik parmak izi tekniği olan DGGE mikrobiyal ekolojide etkin bir araç haline gelmiştir. PCR ürünü, mikroorganizmaların kompleks topluluğundan izole edilen genomik DNA ile sağlanır (Şekil 1.5) ve bu DNA'dan spesifik primerler ile 16S rRNA gibi moleküler markırlar çoğaltılır. PCR ürünü, DNA denatürantının doğrusal gradientinde farklı DNA moleküllerinin arasındaki dizi varyasyonunun çözülme davranışını etkilemesi ve böylece farklı dizilere sahip moleküllerin jelde farklı noktalarda göç hareketini durdurması sebebiyle poliakrilamid jel içerisinde ayrılır. (Muyzer 1999b).

DGGE'de DNA fragmentlerinin melting davranışlarını öğrenmek gereklidir. Farklı DNA fragmentlerinin en iyi ayırımını gerçekleştirmek için elektroforezin süresi ve gradientin optimizasyonu belirlemek gereklidir. Optimum gradient dikey gradient jellerde belirlenir. Dikey jeller denatürantın elektroforez boyunca soldan sağa doğru arttığı bir sistemdir. Örnekler jelin sol tarafından jele yüklenir ve 3 saat 200 voltajda yürütüldükten sonra boyanıp görüntülenir ve sigmoid bir eğri elde edilir. Jelin sol tarafındaki DNA molekülleri düşük denatürant konsantrasyonunda göçlerini durdurmaktadırlar. Diğer tarafta ise daha yüksek denatürantta denatüre olan DNA fragmentleri göç hareketlerini durdurmuşlardır. Böylece DNA fragmentlerinin optimum denatürant aralığı belirlenmiş olmaktadır (Muyzer ve Smalla 1998).

Elektroforezin optimum süresini belirlemek için ise paralel gradient elektroforezlerden yararlanılmaktadır. Paralel gradient jellerde denatürant alttan üste doğru artmaktadır. Aynı jelde birçok örneğin analizi yapılabilmektedir (Muyzer ve Smalla 1998).



Şekil 1.5. DGGE işleminin akış şeması (Muyzer 1999b).

DGGE’de kullanılan primerlerin bir tarafı –GC kelepçesine sahiptir. PCR primerinin 5’sonuna guanin ve sitozin eklenir ve bunlar PCR esnasında DNA fragmenti ile çoğalır. GC zengini diziler yüksek melting noktası oluştururlar ve böylece artan orandaki denatürant karşısında çift iplikli DNA’nın tamamen ayrılmasını engellerler. GC kelepçeleri 30-50 nükleotid uzunluğunda olabilmektedir. Alternatif GC kelepçeleri olarak adlandırılan kimyasal kelepçelerde mevcuttur ve psoralane gibi fotoaktif bileşikler primerin 5’sonuna her iki DNA ipliğine kovalent olarak bağlanır. Kimyasal GC kelepçesi her iki primerinde aynı uzunluğa sahip olmasını sağladığından dolayı bir avantajı olsa bile DGGE bantlarının yeniden çoğaltım aşamasında direk olarak bantların kullanılmaması dezavantajdır (Muyzer ve Smalla 1998).

DGGE’de DNA bantlarını görüntülemek için etidyum bromid ve SYBR Green I kullanılmaktadır. SYBR Green’in etidyum bromid göre avantajı arka plan boyamasının olmamasıdır. Böylece daha az dominant olan DNA fragmentleride belirlenebilmektedir. SYBR Green I’e göre daha hassas olan boyama ise gümüş boyamadır (Muyzer ve Smalla 1998).

DGGE tekniğinin en güçlü yanlarından biri jelden bantların kesilebilmesi ve ardından komünite üyelerinin filogenetik ilişkisini belirlemek için dizilenmesine olanak vermesidir. Ayrıca komüne profilleri bireysel bakteriyel populasyonların varlığını belirlemek için grup spesifik probalar ile hibridize edilebilmektedir (Muyzer 1999b).

Tekniğin sınırlamaları ise nispeten kısa DNA fragmentlerinin ayrımı gerçekleştirilebilmektedir. Başka bir limitasyon ise daima farklı dizilerin ayrımı gerçekleştirilememektedir. Bunun nedeni DNA fragmentleri arasında benzer melting noktasına sahip diziler olabilmektedir. Ek olarak komünite kompleksini tayin ederken, primerlerin bozulmasıyla ya da heterodubleks moleküllerin varlığıyla oluşan çift bantlar bu tayini zorlaştırmaktadır (Muyzer 1999b).

Bu teknik komüniteyi profillendirmek, mikrobiyal komüniteler içerisindeki populasyon dinamiklerini çalışmak, karışık populasyonlarda farklı özellik taşıyan gen ekspresyonu çalışmak, zenginleştirme kültürlerinin izlenmesinde, klon

kütüphanelerini incelemek için ve rRNA operon mikroheterojenitelerini tanımlamak için kullanılmaktadır (Muyzer 1999b).

1.7.3. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH)

Floresan in situ hibridizasyon (FISH)'un temelleri histokimyasal amaçlara yönelik olarak sentetik ve doğal boyaların kullanımı ile atılmıştır. Bu boyalar genellikle temel molekül kategorileri olan proteinleri, lipidleri, nükleik asitleri ya da karbonhidratları boyadıkları için spesifik değildir. 1960'larda nükleik asitlerin görüntülenmesi için eski yöntemlere alternatif olarak radyoışaretli proplar kullanıldı. Fakat izotop çürümesi nedeniyle probun spesifik aktivitesinin sürekli olmaması, radyografinin hassas ve çözünürlüğünün sınırlı olması ve radyoışaretli propların nispeten pahalı ve tehlikeli olması bu tekniğin dezavantajları olarak literatürlerde yer aldı (Levsky ve Singer 2003). 1989'da DeLong ilk kez floresan ışaretli oligonükleotidleri mikrobiyal hücrelerin belirlenmesinde kullandı. Radyoaktif proplarla karşılaştırıldığında floresan propların daha güvenli, çözünürlüğünün daha iyi olduğu belirlendi. Geçen on yıllarda hassasiyeti ve hızı FISH'i filogenetik, ekolojik, diagnostik ve çevresel çalışmalarda güçlü bir araç yaptı (Moter ve Göbel 2000).

Birçok bakteri ve mikroorganizmanın morfolojik ayrıntılarının bilinmemesindeki eksiklik onların tanımlanmasını zorlaştırıyordu. Geleneksel yöntemler zahmetli, zaman gerektirici ve yöntemsel ve istatistiksel hatalara meyilli durumdaydı. Bu yüzden ekosistemlerdeki mikroorganizmaların saymak ve tanımlamak için kültür etmekten kaçınılarak moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biride FISH'dir ki bu yöntem bakteriyel ribozomlardaki spesifik bölgelere uyumlu sentetik oligonükleotid propların hibridizasyonuna dayanır (Bottari ve ark .2006). Bu metotta ilk önce mikrobiyal hücrelerin uygun kimyasal fiksatif ile muamelesi gerçekleştirilir ve sonra oligonükleotid proplar ile solusyon içerisinde ya da lamel üzerinde hibridize edilir. Oligonükleotid proplar 15-25 nükleotitten oluşur ve 5' floresan boya ile kovalent olarak işaretlenir.

Hibridizasyondan sonra yıkama işlemleri gerçekleştirilir ve spesifik olarak boyanan hücreler epifloresans mikroskobu, konfokal taramalı mikroskobu ya da flow sitometri ile tanımlanır (Wagner ve ark., 2003).

FISH'de gerçekleşen problemler hatalı pozitif sonuç ve hatalı negatif sonuçlar olarak ikiye ayrılabilir. Hatalı pozitif sonuç alma problemindeki en önemlisi otofloresan özellikteki örneklerin incelenmesinde karşılaşılmaktadır. Maya ve küflerde, siyanobakterilerde, metanogenleri içeren Archaea gruplarında bu problemle karşılaşılmaktadır. Otofloresan sadece örnekten değil, örneği çevreleyen ortamdan da gelebilir. FISH'de karşılaşılan bir diğer problem ise spesifikite eksikliğidir. FISH'in doğruluğu ve güvenilirliği oligonükleotid problemlerin spesifikitesi ile yakından ilişkilidir ve bunların dikkatli bir dizaynı gerekir. Hatalı negatif sonuç almada ise yetersiz penetrasyon, düşük rRNA içeriği, floroforum yıkımı olarak sıralanabilir. Bakteriyel hücrelerin probu yetersiz penetre etmesi düşük sinyal yoğunluğu verebilir. Bu problem gram negatif bakterilerde yoğun olarak karşılaşılmazken, kalın hücre duvarlı gram pozitif bakterilerde bu problem ile karşılaşılmaktadır. Canlılarda düşük rRNA içeriği direkt olarak büyüme oranı ile ilişkilidir. Düşük fizyolojik aktivite düşük sinyal yoğunluğu ile negatif sonuç doğurabilir. Yavaş gelişen türler için Cy3 gibi parlak floresan ışık yayan problemler tavsiye edilir. Birçok florokrom eksitasyon ilerlerken hızlı bir şekilde yok olur ve bu fotomikrografide önemlidir. Bu problemi çözmek için dar bantlı filtre setleri kullanılması ve kararlı siyanin boyaları kullanılması önerilmektedir (Moter ve Göbel 2000).

FISH'in ilk uygulanması daha az çeşitlilik içeren bakteriyel simbiyotik ortamlarda olmuştur. Daha sonraki yıllarda ise birçok uygulama alanında kendine göstermiştir. Denizsel çevrelerde sülfat redükleyen bakterilerin, bakterioplanktonların araştırılmasında, nehir sistemlerindeki bakterilerin araştırılmasında, atık su arıtım çevrelerindeki nitrojen döngüsünde rol oynayan nitrit oksitleyen ve amonyum oksitleyen bakterilerin araştırılmasında, simbiyotik bakterilerin belirlenmesinde FISH kullanılmıştır (Amann ve ark. 2001).

1.7.4. Çift Tarafı İşaretli Prob Kullanılan Floresan in situ Hibridizasyon (DOPE-FISH)

DOPE-FISH yönteminde tek işaretli proplar yerine hem 3' hem 5' işaretli proplar kullanılmaktadır. Böylece FISH'in sınırlamalarından olan spesifikite problemi ortadan kaldırılmaktadır. FISH'de meydana gelen zayıf sinyaller 16S/23S gibi hedef moleküllerin hücrede düşük yoğunlukta olmasından kaynaklanmaktadır. FISH'in hassaslığını artırmak ve düşük ribozom içeriğine sahip organizmaların belirlenmesini gerçekleştirmek için çift tarafı işaretli proplar kullanılarak sinyal yoğunluğu artırılabilir. Ayrıca FISH'in hassasiyeti ve spesifitesi artmakta ve istenmeyen arka plan oluşumu azalmaktadır (Stoecker ve ark. 2010).

1.8. Halofillerin Biyoteknolojik Potansiyelleri ve Uygulama Alanları

Ekstrem çevrelere uyumun sonucu olarak halotolerant ve halofilik organizmalar birçok biyoteknolojik özelliğe ve bunların kullanımına yönelik ticari öneme sahiptir. Bakteriorhodopsinlerin sağladığı holografik bakteriorhodopsin filmleri gibi kompleks ürünlerden, biyopolimer gibi daha az kompleks ürünlere ve en basit anlamda fermente yiyeceklerin korunmasından halofilik organizmalar sorumlu tutulabilir (Margesin ve Schinner 2001).

Bakteriorhodopsin

Ekstrem halofilik arkeler bakteriorhodopsin adı verilen proton pompalarını içerir. Bakteriorhodopsin organizmaların proton biyoenerjetik prosesleri gerçekleştirmek için ışık enerjisini kullanmasını kolaylaştırır. Bakteriorhodopsinin termodinamik ve fotokimyasal kararlılığı onun fotoelektrik ve fotokimyasal uygulamalarda birçok kullanımına yol açmıştır. Bunlardan holografik görüntü depolama için optoelektronik materyel olarak, bilgisayar hafıza

yapılandırılmasında holografik bakteriorhodopsin filmi olarak kullanılır. Bilgisayar hafızası yapılandırılmasında bakteriorhodopsin kullanımı 'biyoelektronik' element olarak işlev görür ve böylece yüksek oranda bilgi saklanabilirken, tüm bilgiler aynı anda işlenebilir (Margesin ve Schinner 2001).

Bakteriorhodopsinin bu kullanımları dışında uzaysal ışık modulatörleri, ticari retina, nöral ağ, optik hesaplama, güneş enerjisini elektriğe çevirme ve biyokemo sensör uygulamalarını kapsar. *Halobacterium salinarum* ve *Halobacterium halobium* strain S9'dan elde edilen bakteriorhodopsinler ticari olarak satılmaktadır (Margesin ve Schinner 2001; Oren 2002a).

Organik Uyumlu Çözünenler

Ozmotik olarak aktif olan çözünen maddeler halotolerant ve halofilik organizmalar için pozitif su dengesini sağlar ve hücre metabolizması ile uyumludur. Hücreler artan NaCl konsantrasyonu gibi çevrelerindeki değişen duruma hızlıca adapte olma yeteneğindedirler. Hücreler artan dışsal NaCl konsantrasyonunu ayarlamak için sitoplazmalarında çeşitli küçük moleküller biriktirirler. K^+ gibi inorganik katyonlar ozmotik dengede ve ozmotik cevapta önemli rol oynarlar (Margesin ve Schinner 2001; Roberts 2005).

Ozmotik dengede rol oynayan moleküller şekerler ve türevleri, amino asitler ve türevleri, betainler ve ektoinlerdir. Bu çözünen maddeler biyomoleküllerin ve tüm hücrelerin dengeleyicisi, tuz antagonisti ya da stres koruyucu ajan olarak biyoteknolojik uygulamalarda artan oranda kullanılmaktadır. Bu moleküllerin ana özelliği bireysel enzim aktivitelerini düzenlemelerine rağmen hücre fonksiyonları inhibe etmemeleridir (Margesin ve Schinner 2001; Roberts 2005).

Ektoin

İlk olarak *Halorhodospira halochlorins*' de belirlenmiş olan ektoin (1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid) doğadaki en bol bulunan osmolit olmasının yanı sıra halotolerant ve halofilik bakterilerde bol miktarda sentezlendiği belirlenmiştir (Margesin ve Schinner 2001; Roberts 2005)..

Betain'den farklı olarak, ektoinler ve hidroksi ektoinler biyoteknolojik yollarla üretilebilir. Yeni bir biyoteknolojik süreç olan 'bakterial milking' ekstrem halotolerant olan *Halomonas elongata*'dan bu iki bileşiğin üretimi için kullanılmıştır. Bu organizmanın ektoin ve hidroksi ektoin üretimi ortamdaki tuzluluk ve sıcaklığa bağlı olarak değiştiği, tuzluluğun %15 üzerinde ve sıcaklığın 25 °C'in altında olduğu zaman sadece ektoin üretimi, daha yüksek tuz konsantrasyonunda ve daha yüksek sıcaklıkta hidroksi ektoin miktarında artış gözlemlendiği belirtilmiştir (Margesin ve Schinner 2001; Roberts 2005).

Ektoinler amilaz, lipaz, selüloz ya da proteaz gibi enzimlerin aktivitelerini dengelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca ektoin ve türevleri yaşlanma karşıtı olarak, kurumuş ya da tahriş olmuş cildin nemlendirilmesi için kozmetik sanayinde kullanılır. Ektoinin en ümit verici kullanımlarından birisi ise polimeraz zincir reaksiyonunda stabilizatör olarak kullanımındır (Margesin ve Schinner 2001).

Biyopolimerler

Biyosüpfektan üreten halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar yağ ile kontamine olmuş toprak ve su gibi salin çevrelerin iyileştirilmesini hızlandırıcı rol oynarlar. Biyosüpfektanlar yüzey gerilimini azaltma yoluyla, çözünürlüğü ve hareketliliği artırır ve böylece yıkımı tetikler (Margesin ve Schinner 2001).

Süpfektanların ilgili araştırmalara bakıldığında birçok endüstriyel kullanıma sahiptir ki bunlar madencilikte, kişisel bakım ürünlerinde, gıda endüstrisinde, yağ tanklarının temizlenmesinde ve biyolojik iyileştirmede ayrıca terapötik antimikrobiyal ajan olarak ve tarım antimikrobiyalleri olarak kullanımları mevcuttur (Litchfield 2011).

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS) hücre duvarından dışarı doğru salgılanan karbonhidratlardır. EPS'lerin kompozisyonu homo ya da heteropolisakkarit olabilirken, farklı sayıda organik veya inorganik madde içerebilirler.

EPS'ler biyoteknolojik olarak tıp, eczacılık, gıda maddeleri, kozmetik ve petrol endüstrisinde potansiyeli nedeniyle biyoteknologlar tarafından büyük bir ilgiye sahiptirler (Ventosa 2004).

Halofilik ekzopolisakkarit üreticileri mikrobiyal olarak geliştirilmiş yağ iyileştirilmesinde kullanılan önemli bir kaynaktır. Emülsifer ve hareketlilik kontrolörü gibi hareket ederler. Petrolün aktif emülsiyonu *Halobacterium salinarum*, *Haloferax volcanii*, *Halobacterium distributum* ve *Halomonas* cinsi içerisindeki türlerde çalışılmıştır (Margesin ve Schinner 2001; Ventosa 2004).

Maksimum ekzopolisakkarit üretimi *Halomonas eurihalina* ve *H. maura* türlerinden elde edilmiştir. Bu türlerin patojeniteye sahip olmaması, kolay gelişmeleri, kolay elde edilebilir besin ihtiyaçlarına sahip olmaları ve yüksek tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerinde üremeleri nedeniyle kontaminasyon riskinin az olması gibi özellikleri ile biyoteknolojik olarak avantajlara sahiptir (Margesin ve Schinner 2001; Ventosa 2004).

Liposomlar tıpta ve kozmetik sanayinde, vücutta spesifik hedef bölgeye bileşiklerin taşınımı için kullanılırlar. Arkeal halofillerden eter bağlı lipidler yüksek kimyasal stabiliteye ve esterazlara karşı dirence sahiptir (Margesin ve Schinner 2001).

1999 yılında *Halobacterium cutirubrum*'dan elde edilen liposomun kullanımına yönelik patent alınmıştır. Bu liposomların medikal anlamda yarar sağlanacağı düşünülse bile günümüze kadar herhangi bir medikal uygulamada yer aldığı görülmemiştir (Litchfield 2011).

Lektinler seçici şeker bağlı proteinlerdir. Hücre tiplendirmede ve hücre yüzey araştırmalarında kullanılmaktadır. Lektinler kanserli hücrelerin deteksiyonu için hücre yüzey modifikasyonlarının indikatörü olarak kullanılırlar. Halofilik arkelere lektinler, arkeal tiplendirme ve hücre-yüzey karbonhidratlarının analizi için faydalı olabilmektedir. Fakat bu mikroorganizmaların yapısal bütünlüğü için yüksek tuzluluğa ihtiyaç duyduklarından dolayı henüz endüstriyel anlamda yararlanılmamaktadır (Margesin ve Schinner 2001).

Polihidroksialkanotlar (PHA) hücre içinde biriktirilen bakterial depo bileşikleridir. Halofilik organizmalarda PHB olarak adlandırılan Poly(b-hydroxybutyrate) biyoplastik daha çok çalışılmıştır. PHB'ler karbon ve enerji rezervi olarak iş görürlerken, genellikle oksijen, fosfor, azot, sülfür gibi besin sınırları altında meydana getirilir (Quillaguaman ve ark.2005).

PHB üretiminde halofillerin en önemli avantajlarından biri kontaminasyon riski olmadan basit tuz göletlerinde kolayca kültüre edilebilmeleridir. Buna karşın, PHB üretimi için organizmanın gelişim göstereceği besiyerinin nispeten pahalı olması dezavantajlarından biridir (Litchfield 2011).

PHB ile ilgili ilk patent 1996 yılında *Haloferax mediterranei*' den elde edilmiştir. Bu organizma distile suda kolayca lize edilmiş ve serbest kalan PHB granülleri kolayca toplanmıştır. PHB'nin bu kolay elde edilebilirliğine rağmen yaygın bir kullanıma sahip olamamıştır (Litchfield 2011).

Enzimler

Halofilik ve alkalifilik mikroorganizmalardan üretilen en yaygın ürünler endüstriyel enzimlerdir. Bu endüstriyel enzimler kullanım olarak geniş yelpazeye sahiptir ki bu kullanımlar çamaşır ve bulaşık deterjanları, gıda işleme endüstrisi sonucunda meydana gelen atıkların giderilmesidir. Bu enzimler hidrolazlar adı verilen içerisinde amilaz, proteaz ve lipaz gibi önemli endüstriyel enzim gruplarını içerir (Ventosa 2004).

Halofiller hidrolaz enzimine hem tuzu tolere edebilmeleri hem de çoğu halofilin termotolerant olması nedeniyle sahiptirler. Farklı tuz konsantrasyonlarında ılımlı halofillerin ekstraselüler hidrolaz üretimi ile enzimlerin izolasyonu sağlanmıştır. Hidrolaz enzimleri *Halomonas*, *Salinivibrio* ve *Chromohalobacter* gibi farklı cinslerde çalışılmış, ekstraselüler tuzu tolere eden enzim ürettikleri fakat yaygın bir endüstriyel kullanıma sahip olmadıkları belirlenmiştir (Sanchez-Porro 2003). Son zamanlarda ekstrem halotolerant *Bacillus* türlerinin hipersalin çevrelerde izolasyonu biyoteknolojik potansiyel olarak çok önemlidir Çünkü birçok *Bacillus* türü endüstriyel olarak önemli hidrolazlar üretmektedir (Margesin ve Schinner 2001).

Glikozid hidrolozlar karbonhidrat mekanizması ile ilişkili enzimlerin geniş bir grubudur. Haloarkealardan ilk amilaz 1969 yılında *Halobacterium sp.*'de çalışılmıştır. Bu enzim aktivitesi için yüksek oranda NaCl ve NaCl'ün artan oranında sıcaklık gerekmektedir. Enzim aktivitesi 70°C'de kaybolmaktadır (Litchfield 2011).

Türkiye'deki Tuzköy madeninden elde edilen 12 strainden 10 tanesi selüloz üretimi için pozitifken, Tween 80'a karşı hepsi aktiftir. Bu göstermiştir ki haloarkelerde lipaz ve esteraz aktiviteleri yaygındır (Birbir ve ark. 2004). Bugüne dek esteraz ve lipazların direkt endüstriyel kullanımı bulunmamaktadır (Litchfield 2011).

Besin Biyoteknolojisi

Halofilik organizmalar tuz varlığında çeşitli fermentasyon süreçlerinde önemli rol oynarlar. Bu organizmalar fermentasyonu katalizler, böylece karakteristik tat ve aroma meydana getirirler. *Lactobacillus plantarum*'un turşu üretiminde, *Halobacterium salinarum*, *Halococcus sp.* ve *Bacillus sp.* gibi türler Asya kıtasındaki çeşitli balık soslarında kullanılır. Ayrıca *Tetragenococcus halophila* %18'lik tuz konsantrasyonu ile Endonezya soya sosunda dominant mikroorganizmadır (Margesin ve Schinner 2001).

β -karoten besin endüstrisinde doğal besin renklendiricisi olarak kullanılmaktadır. Kozmetikte, multivitamin hazırlanmasında ve sağlıklı besin üretiminde önemli bir yere sahiptir. Ekstrem halofilik bakteriler yüksek tuz konsantrasyonunda karotenoid üretimi gerçekleştirirler (Margesin ve Schinner 2001).

Halosin

Halosinler halofilik arkelerden izole elden protein antibiyotiklerdir. 1982 yılında ilk rapor edildiklerinde *Haloferax mediterranei* agar üzerinde *Halobacterium salinarum*'um gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu ilk rapordan sonra farklı türlerin bu özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Oren 2002a). Fakat antibiyotiklerin araştırılmasında halosinler diğer antibiyotiklere

göre daha az dikkate alınmıştır. Bunun nedeni saflaştırılmış birçok halosinin *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *B.cereus*, *Sarcina luteus* gibi bakterilerde aktif olmamasıdır (Litchfield 2011). Ekolojik anlamda halosin üretimi besin ve diğer kaynaklar için mücadele eden arkelerin ekolojik olarak bir avantaja sahip olmalarını sağlamıştır (Oren 2002a).

1.9. Halofillere Astrobiyolojik Bakış

Astrobiyoloji, yaşamın orijinini astronomi, astrofizik gibi araştırma alanları ile birlikte çalışarak bulmaya yönelik interdisipliner bir araştırma alanıdır. Yeryüzündeki ekstrem nişler ile bazı karasal yerlerdeki fiziki ve atmosferik durumların karşılaştırmasından, bazı ekstremofillerin solar sistem ve ötesindeki ekstraterestial yaşam için aday olabileceği savunulur. Böylece güneş sistemindeki Mars, Jupiter'in uyduları (Europa) ve diğer gezegenlerde yaşam formları için model olarak ekstremofillerin anlaşılması ve çalışılması astrobiyoloji için değerlidir (Gunde-Cimerman ve ark. 2005).

Mars ile ilgili son çalışmalar Mars'ın geçmişte yüzeyinde su bulundurduğunu ortaya koymuştur. Sonraları atmosferin yok olmaya başlaması ile su buharlaşmış ve çözülmüş mineraller permafrost ve tuz kristallerindeki boşluklarda konsantre hale gelmiştir. Bu tür bir ortam halofil ya da ozmolitlerin gelişmesi için nispeten kolay bir ortamdır. Yüksek konsantrasyonda çözülmüş tuz içeren tuz kristali boşlukları osmolit veya halofillerin yaşam mücadelesi için uygundur. Ayrıca bu organizmaların soğuk çevrelerde de bulunabilme özellikleri ile Mars'ta var olabilecekleri öne sürülmektedir (Gunde-Cimerman ve ark 2005).

Permiyen ve Triassik dönemlerden kalma kaya tuzu birikintilerinden, ekstrem halofilik arkelere ait yeni türler izole edilmiştir. 16S rRNA amplifikasyonuna dayanan polimeraz zincir reaksiyonu ile tuz depozitlerinde haloarkeal komünite üyelerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki ekstrem kuraklık halinde bile mikrobiyal yaşam mücadelesi sürmektedir. Bu

görünen uzun ömürlülük tuzlu kuru çevrelerde haloarkelerin yaşamasıyla uzay yaşamı ile ilgili ve astrobiyolojik çalışmalara ilgi artmıştır. Mars'tan köken alan bazı meteoritlerde halitlere rastlanmıştır. Son yapılan çalışmalarda Mars'a ait birikintilerde konsantre tuzlu su varlığı belirlenmiştir (Gunde-Cimerman ve ark 2005).

Halococcus salifodinae strain Blp Avustralya'da yerin 650 m altındaki tuz madeninden elde edilen kaya tuzundan izole edilmiş ve yeni bir tür olduğu belirlenmiştir. Sülfür izotop çalışmalarına göre tuzun Permiyen ve erken Triassik dönemlerden (213-286 milyon yıl önce) kaldığı belirlenmiştir. Aynı bölgede yapılan araştırmalarda birkaç halococcal izolat daha elde edilmiştir. Sonraları ise *H.salifodinae*'ya benzer özellikte izolatlar İngiltere ve Almanya'dan elde edilmiştir. Bu izolatların aynı 16S rRNA gen dizilerine, benzer G+C içeriğine, benzer kompozisyona, benzer polar lipidlere, antibiyotik dirençliliğine ve enzimatik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Gunde-Cimerman ve ark 2005).

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Medyum A

NaCl	25 gr
KCl	5 gr
Mg ₂ .6H ₂ O	5 gr
NH ₄ Cl	5 gr
Maya Özütü	10 gr
Distile Su	1 lt

Besiyerinin pH'ı 7'ye ayarlanmış ve 15 dk 121 °C'de steril edilmiştir (Oren ve Litchfield 1999).

2.1.1.2. Medyum B

NaCl	200gr
KCl	1 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	20 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.02 gr
Tri-Na-sitrat	3 gr
Kazamino asit	7.5 gr
Maya Özütü	0.5 gr
Distile Su	1 lt

Besiyerinin pH'ı 7'ye ayarlanmış ve 15 dk 121 °C'de steril edilmiştir (Oren ve Litchfield 1999).

2.1.1.3. Medyum C

NaCl	175 gr
MgCl ₂ .6H ₂ O	20 gr
K ₂ SO ₄	5 gr
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.1 gr
Maya Özüdü	5 gr
Distile Su	1 lt

Besiyerinin pH'ı 7'ye ayarlanmış ve 15 dk 121 °C'de steril edilmiştir (Oren ve Litchfield 1999).

2.1.1.4. Medyum D

NaCl	206 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	36 gr
KCl	0.37 gr
CaCl ₂ .H ₂ O	0.5 gr
MnCl ₂	0.013 gr
Maya Özüdü	5 gr
Distile Su	1 lt

Besiyerinin pH'ı 7'ye ayarlanmış ve 15 dk 121 °C'de steril edilmiştir (Oren ve Litchfield 1999).

2.1.1.5. Medyum E

NaCl	125 gr
MgCl ₂ .6H ₂ O	160 gr
K ₂ SO ₄	5 gr
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1 gr
Maya Özüdü	1 gr
Kazamino Asit	1 gr
Nişasta	2 gr
Distile Su	1 lt

Besiyerinin pH'ı 7'ye ayarlanmış ve 15 dk 121 °C'de steril edilmiştir (Oren ve Litchfield 1999).

2.1.1.6. Medyum Has (Hypersaline artificial sea water)

NaCl	195 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	50 gr
MgCl ₂ .6H ₂ O	35 gr
KCl	5 gr
NaHCO ₃	0.25 gr
NaNO ₃	1 gr
CaCl ₂ .H ₂ O	0.5 gr
KH ₂ PO ₄	0.05 gr
NH ₄ Cl	0.03 gr
Tris-HCl (1M pH 7.4)	20 ml
Maya Özüdü	< 0.5 gr/l
Gliserol	< 0.5 gr/l
Distile Su	1 lt

Besiyerinin pH'ı 7'ye ayarlanmış ve 15 dk 121 °C'de steril edilmiştir (Bolhuis 2004).

2.1.1.7. %0 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum)

Distile su	967 ml
Pepton	5 gr
Maya Özütü	1 gr

Besiyerinin pH'ı 1 M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.8.%3 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi	100 ml
Distile su	867 ml
Pepton	5 gr
Maya Özütü	1 gr

Besiyerinin pH'ı 1 M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.9. %6 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi	200 ml
Distile su	767 ml
Pepton	5 gr
Maya Özütü	1 gr

Besiyerinin pH'ı 1 M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.10. % 12 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi	400 ml
Distile su	567 ml
Pepton	5 gr
Maya Özü	1 gr

Besiyerinin pH'ı 1 M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.11. %15 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi	500 ml
Distile su	467 ml
Pepton	5 gr
Maya Özü	1 gr

Besiyerinin pH'ı 1 M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.12. %18 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi	600 ml
Distile su	367 ml
Pepton	5 gr
Maya Özü	1 gr

Besiyerinin pH'ı 1 M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.13. %23 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi	767 ml
Distile su	200 ml
Pepton	5 gr
Maya Özü	1 gr

Besiyerinin pH'ı 1 M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.14. %25 MGM (Modifiye Geliştirme Medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi	833 ml
Distile su	134 ml
Pepton	5 gr
Maya Özü	1 gr

Besiyerinin pH'ı 1 M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir (Dyall-Smith 2004).

2.1.2.Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

2.1.2.1. %30'luk Tuzlu Su

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

Besiyerinin pH'ı 1 M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanmış, hacim 1000 ml'ye tamamlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Dyall-Smith 2004).

2.1.2.2. 50X TAE

Tris-base	242 gr
Asetik asit	57.1 ml
EDTA (0.5 M pH 8)	100 ml

Çözelti distile su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.2.3. 5X TBE

Tris-base	54 gr
Asetik asit	27.5 gr
EDTA (0.5 M pH 8)	20 ml

Çözelti distile su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.2.4. 10X PBS

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

Çözelti distile su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 7.2'e ayarlanmış, 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.2.5. %80'lik DGGE Stok Solusyonu

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

Çözelti mQ su ile 30 ml'ye tamamlanmış 4°C'de saklanmıştır (Muyzer ve ark. 1996).

2.1.2.6. Denatürant İçermeyen DGGE Stok Solusyonu

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

Çözelti mQ su ile 30 ml'ye tamamlanmış 4°C'de saklanmıştır (Muyzer ve ark. 1996).

2.1.2.7. İn Situ Hibridizasyon Tamponu

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

Çözelti taze hazırlanıp buz üzerinde korunmuştur (Anton ve ark. 1999).

2.1.2.8. FISH için Yıkama Tamponu

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

Çözelti mQ su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır (Anton ve ark. 1999).

2.2. METOD

2.2.1. Alan Seçimi ve Örneklerin Toplanması

Konya Acıgöl ve Meke Göllerinden (Şekil 2.1) Ağustos 2010 ve Nisan 2011 olmak üzere iki farklı zamanda prokaryotik çeşitlilik üzerinde mevsimsel farklılığı gözlemleyebilmek için örnekleme yapılmıştır.



Şekil 2.1. Meke ve Acıgöl'ün uydu görüntüleri (maps.google.com/)

Örnekleme alanları Garmin GPS 12 CX ile koordinatları belirlenen yerlerden (Şekil 2.2; 2.3) seçilmiş ve alınan su örnekleri en kısa sürede laboratuvara getirilmiştir.



Şekil 2.2. Meke Gölü örnekleme noktası

Şekil 2.3. Acıgöl örnekleme noktası

2.2.2. Örneklerdeki Toplam Tuz Değerinin, pH'ın ve Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Örneklerin tuz değeri el refraktometresi (Eclipse), pH'ı ise Thermo Orion 420 AT ile ölçülmüştür. Su örneklerinin içerdiği bazı elementler (Na^+ , Mg^{+2} , K^+ , Mn^{+2} , Ca^{+2}) Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) bünyesindeki ICP (Perkin Elmer Optical Emission Spectrometer Optima 4300 DV) cihazı ile belirlenmiştir .

2.2.3. Su Örneklerinden Halofilik Mikroorganizma İzolasyonu

Su örneklerinden halofilik mikroorganizma izolasyonu için farklı tuz miktarı içeren besiyerlerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Medyum A, Medyum B, Medyum C, Medyum D, Medyum E, Medyum Has, %12'lik, %18'lik, %23'lük ve % 25'lik Modifiye Geliştirme Medyum'a 1'er ml ekim yapılarak 37 °C'de 3-4 hafta inkübasyona bırakılmıştır (Oren ve Litchfield. 1999; Bolhuis 2004; Dyall-Smith 2004). Su örneklerinden inkübasyon sonrası oluşan koloniler çizgi ekim ile saf

halde elde edilmiştir. Saf olarak elde edilen kültürler %15'lik gliserolde -85 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.4. Mikroskopik İnceleme

Halofilik mikroorganizmaların gram boyamaları Dussault (1965)'a göre gerçekleştirilmiştir. Ara yıkamalarda %20'lik NaCl çözeltisi kullanılarak uygulanan yöntemde örnek öncelikle %2'lik asetik asit ile 5 dakika fikse edilmiştir. Sonrasında %0.25'lik kristal viyole ile 3 dakika boyanmış, lugol ile 1 dakika, alkol ile 10 saniye ve son olarak safranin ile 1 dakika boyanmıştır (Dyall-Smith 2004).

2.2.5. İzolatların Tuz ve Sıcaklık İsteklerinin Belirlenmesi

Elde edilen izolatlardan tuz ve sıcaklık isteklerinin belirlenebilmesi için %0, %3, %6, %12, %15, %18, %23 ve %25'lik MGM'lere ekimleri gerçekleştirilip 30°C, 37°C, 42°C ve 45°C'de inkübasyonları gerçekleştirilmiştir (Mutlu 2006).

2.2.6. Su Örneklerinin Kültür Bağımlı ve Kültür Bağımsız Prokaryotik Çeşitlilik Analizleri

2.2.6.1. İzolatların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Archaea-Bacteria Ayrımlarının Yapılması

Meke ve Acıgöl'den farklı katı besiyerlerinde üreme gözlemlenen mikroorganizmalardan koloni morfolojisi, pigmentasyonu, koloni büyüklüğü farklı olan kolonilerden steril kürdan ile 200 µl DEPC su içerisine alınmış ve 96°C'de 10 dk bekletildikten sonra, 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj

sonrası supernatant kısmı steril ependorflara alınarak PCR işleminde kalıp olarak kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmişlerdir (Anton ve ark. 1999; Dyall-Smith 2004).

Elde edilen kalıplar Archaea (21F, 1492R) ve Bacteria (27F, 1492R) spesifik primerler kullanılarak 16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir (Anton ve ark. 1999). PCR için 25 µl son hacimde 1 µl ileri (10 µM), 1 µl geri primer (10 µM) ve 1 µl kalıp DNA PCR reaksiyonuna eklenmiştir. PCR karışımı olarak Promega PCR Master Mix, Fermentas PCR Master Mix, Fermentas Taq DNA Polimeraz ve SibEnzyme Taq DNA Polimeraz kullanılmıştır. Reaksiyonlar negatif kontrol ve pozitif kontrol eşliğinde gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak Archaea için *Haloarcula hispanica*, Bacteria için *Pseudomonas halophila* kullanılmıştır. Negatif kontrolde ise reaksiyona kalıp DNA’sı eklenmemiştir. Reaksiyonlar için Techne TC-5000 ve Techne FTGENE20 Thermal Cycler kullanılmıştır. Archaea-Bacteria ayrımının yapıldığı ve diğer PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler Çizelge 2.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler

Primerin Adı	Spesifik Olduğu Grup	Primerin Dizisi (5’-3’)
21F	Archaea	TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA
27F	Bacteria	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG
341F	Bacteria	CCT ACG GGA GGC AGC AG
344F	Archaea	ACG GGG CGC AGC AGG CGC GA
907R	Evrensel	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT
1492R	Evrensel	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T
341F-GC	Bacteria	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G CCT ACG GGA GGC AGC AG
344F-GC	Archaea	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G ACG GGG CGC AGC AGG CGC GA

Çizelge 2.1. (Devamı) PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler

907R-GC	Evrensel	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT
---------	----------	--

Archaea ve Bacteria üyelerinin 16S rRNA genlerinin çoğaltımları için uygulanan reaksiyon şartları;

İlk Denatürasyon	94 °C	3 dk
30 Döngü		
Denatürasyon	94 °C	30 sn
Bağlanma	50 °C	1 dk
Uzama	72 °C	2 dk
Son Uzama	72°C	10 dk
Bekleme	4°C	Süresiz

PCR sonunda elde edilen ürünler %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve UV transillüminatörde gözlemlenmişlerdir.

2.2.6.2. Agaroz Jel Elektrofözezi

Gerçekleştirilen DNA ekstraksiyonları, Archaea-Bacteria ayrımı için 16S PCR'lar, ARDRA analizleri, DGGE için uygulanan PCR'lar ve dizi analizi öncesinde örneklerin jelden saflaştırılması gibi deneylerin her birinin sonunda agaroz jel elektrofözezi uygulanmıştır. Örneklerin jele yükleme miktarları; DNA ekstraksiyonu ve jelden saflaştırma sonuçlarının değerlendirilmesi için 2 µl, PCR sonuçlarının değerlendirilmesi için 5 µl ve ARDRA analizi için 20 µl örnek belirli miktarlarda (0.5 µl-4 µl) yükleme boyası (Fermentas 6X Loading Dye Solution) ile karıştırılarak agaroz jellere yüklenmiştir. Ayrıca agaroz jellerde örnek

büyükliğünün değerlendirilmesi amacıyla çeşitli markerlar kullanılmıştır. 16S PCR, DGGE-PCR ve saflaştırma reaksiyonlarının sonuçlarının değerlendirilmesinde 1 kb (Fermentas Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, İnvitrogen 1 kb Plus DNA Ladder), ARDRA analizinin değerlendirilmesinde 1kb ve 50 bp (Fermentas Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder) markırlar ve DGGE jeline yüklenecek örneklerin miktarlarının belirlenmesi amacıyla 'Low DNA Mass Marker (İnvitrogen Low DNA Mass Ladder) kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde DNA ekstraksiyonları için % 0.8'lik (Sigma For Routine Use), PCR reaksiyonları ve saflaştırma sonuçları için %1'lik agaroz jel hazırlanmış ve 1X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) çözeltisi içerisinde 90-100 voltta yürütülmüştür. ARDRA analizi için ise %2'lik agaroz jel 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) çözeltisi içerisinde yürütülmüştür. Jellerin görüntülenmesi amacıyla 0.5 µg/µl olarak hazırlanmış etidyum bromid solusyonunda jeller 15 dk bekletildikten sonra 15 dk distile su veya 1XTAE çözelti içerisinde yıkanmıştır. Yıkama sonrasında jellerin görüntülenmesi UV transillüminatörde (biolab Uvitec) gerçekleştirilmiştir.

2.2.6.3. Amplifiye Edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA)

Archaea-Bacteria ayrımı yapılmış 16S rRNA geni için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri *Mbo I* (New England Biolabs Cat no 0704B ve Bioron Cat no 250120L) enzimi ile gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyon için 5 U (1 µl) enzim, 2 µl restriksiyon enzimine uygun restriksiyon enzim çözelti, 10 µl PCR ürünü ve 7 µl DNase-RNase içermeyen ultra saf distile su (Gibco) kullanılmıştır ve karışım 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Kesimi gerçekleşen PCR ürünlerinin analizleri %2 lik agaroz jelde 1X TBE tamponunda 3 saat 60V yürütülerek gerçekleştirilmiştir (Martinez-Murcia ve ark. 1995). Archaea ve Bacteria için oluşan 16S paternleri belirlenerek farklı grupları temsil edenler seçilmiş, bunların çoğaltımı aynı primer setleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve pozitif sonuç alınan ortalama 100 µl örnek agaroz jele yüklenerek jelden saflaştırması veya 5 µl örnek için ExoSap-IT saflaştırması gerçekleştirilmiştir.

Safılaştırılan örneklerin dizi analizleri bölüm 2.2.6.7’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır

2.2.6.4. Genomik DNA İzolasyonu

Tuzlu su örneklerinin Archaea ve Bacteria DNA ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi için GTTP Isopore (Millipore, 0,2 µm) filtreden geçirilmiştir. Filtreler kullanım aşamasına kadar -20 °C veya -85 °C’de muhafaza edilmiştir. Zenginleştirme kültürleri ise 13.000 rpm’de santrifüj edilerek peletin kullanımı yoluyla ekstraksiyon aşaması başlatılmıştır (Benlloch ve ark. 2002).

Su örneklerinin filtrasyonu ile elde edilen filtreler küçük parçalar haline steril makas ile getirildikten sonra bunlar steril ependorf tüplerine alınmıştır. Kesilen filtreler ve kültürlerden elde edilen pelet üzerine 600 µl ekstraksiyon çözeltisi (100mM Tris-HCl pH:8, 100 mM EDTA) eklenmiş ve resüspanse edilmiştir. Ependorf tüplerine 6 µl (3 mg/ml) lizozim eklenmesi sonrasında 15 dk 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 9 µl proteinaz K (150 µg/ml) ve 60 µl SDS eklenmiş ve karışım 37 °C ‘de 30 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında 120 µl 5 M NaCl eklenmiş ve ters-düz çevrilerek resüspanse edilmiştir. 90 µl CTAB (%10 CTAB, 0.7M NaCl) resüspanse karışıma eklenmiş ve 10 dk 65°C’lik su banyosuna alınmıştır. Karışım su banyosundan alınarak 1-2 dk sıvı azotta bekletilmiştir. Donan tüp yeniden 65°C’lik su banyosunda bekletilmiştir ve sonra yine sıvı azot işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra 900 µl Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) karışıma eklenmiş ve 5 dk 4 °C’de 13.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı faz alınmış ve alınan miktar kadar Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) sıvı faza eklenmiştir. Bu işlem protein ara fazı indirgenene kadar devam ettirilmiştir. Sonrasında 80 µl sodyum asetat (3M pH:4.8), 480 µl isopropanol, 8 µl MgCl₂ (1M) eklenmiş ve 30 dk 13.000 rpm’de 4°C’de santrifüj edilmiştir. Supernatant atıldıktan sonra -20 °C’de bekletilmiş olan %70’lik alkolden 100 µl pelet üzerine koyulmuştur ve 15 dk 13.000 rpm’de 4 °C’de santrifüj edilmiştir. Alkol pipet ile uzaklaştırıldıktan ve pelet oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 50

μ l DEPC ile pelet resüspanse edilmiştir (Cifuentes ve ark. 1999; Nogales ve ark. 2000). DNA varlığını kontrol etmek için 2 μ l örnek %0.8'lik agaroz jele yüklenmiş ve 1X TAE tamponda yürütülmüştür. DNA ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C 'de saklanmıştır.

2.2.6.5. Zenginleştirme Ürünlerinin, Su Örneklerinin ve Bacteria İzolatlarının Denatüre Edici Gradient Jel Elektrofrez (DGGE)

DGGE işlemini gerçekleştirmek için DNA ekstraksiyonları kalıp olarak kullanılmıştır. DGGE işlemi öncesinde DGGE'ye özgü PCR gerçekleştirilmiştir. Bu PCR'da çoğaltım için ileri veya geri primer setlerinden birine 'GC clamp' adı verilen ortalama 40 Guanin-Sitozin nükleotiti içeren dizi primerlerin 5' uçlarına eklenmiş durumdadır. Archaea PCR için 344F, Bacteria için 341F ve her ikisi için 907R-GC geri primerleri kullanılmıştır (Muyzer ve ark. 1993). PCR reaksiyonlarına ise 1'er μ l ileri ve geri primerlerden, 1 μ l kalıp ve 22 μ l PCR mix eklenmiştir. Aşağıda Archaea ve Bacteria için PCR reaksiyon koşulları verilmiştir. PCR reaksiyon sonuçları %1'lik agaroz jelde gözlemlenmiştir. Bacteria 16S rRNA'sı DGGE-PCR reaksiyonu ;

İlk Döngü	
Denatürasyon	94 °C 5 dk
Bağlanma	65 °C 1 dk
Uzama	72 °C 3 dk
9 Döngü	Her Döngüde Bağlanma sıcaklığı 1°C düşürülmüştür.
Denatürasyon	94 °C 1 dk
Bağlanma	64 °C 1 dk
Uzama	72 °C 3 dk
20 Döngü	
Denatürasyon	94 °C 1 dk
Bağlanma	55 °C 1 dk
Uzama	72 °C 3 dk

Son Döngü	
Denatürasyon	94 °C 1 dk
Bağlanma	55 °C 10 dk
Uzama	72 °C 10 dk
Bekleme	4°C Süresiz

Archaea 16S rRNA'sı DGGE-PCR reaksiyonu;

İlk Denatürasyon	94 °C 5 dk
30 Döngü	
Denatürasyon	94 °C 30 sn
Bağlanma	56 °C 45 sn
Uzama	72 °C 2 dk
Son Döngü	
Son Uzama	72°C 7 dk
Bekleme	4°C Süresiz

DGGE işlemi için Ingeny firmasının IPU-S modeli DGGE sistemi kullanılmıştır. DGGE için hazırlanan PCR reaksiyonlarının ardından DGGE işleminin gerçekleştirilmesi için DGGE düzeneği hazırlanmıştır. DGGE işlemi için mevcut aparatların temizliği sağlandıktan sonra, sistem poliakrilamid jelin oluşumuna izin verecek şekilde hazırlanmıştır ve sızdırmazlığı kontrol edilmiştir. DGGE'de poliakrilamid jelin hazırlanabilmesi için gerekli denatürant içermeyen DGGE stok solusyonu ve %80'lik stok solusyonları hazırlanmıştır. Stok solusyonlarından denatüre elektroforez sisteminin oluşturulması için %40 ve %70'lik solusyonlar hazırlanmıştır. Denatüre sistemin oluşturulması üre ve formamid gibi ajanların artan miktarda düzeneğe yüklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Sistem jel ile doldurulduktan sonra polimerizasyonun gerçekleştirilmesi için 1X TAE ile ıslatılmış ve 2 saat beklenilmiştir.

Polimerizasyon esnasında DGGE tankı 17 litre 1 X TAE tamponu ile doldurulmuş ve tamponun sıcaklığının örneklerin yüklenmesine kadar 55-60 °C'ye yükselmesi sağlanmıştır. Sistem sıcaklığı istenilen değere ulaştıktan ve polimerizasyon gerçekleştirildikten sonra DGGE için hazırlanan PCR ürünleri jele yüklenmiştir. Jele yüklenecek örnek miktarı 'Low Mass DNA Ladder' ile belirlendikten sonra, belirli miktar örnek ve yükleme boyası elektroforez çukurlarına yüklenmiştir. Elektroforez öncelikle 2 saat 80 volttda 250 miliAmper ve 75 waltta ve sonrasında 20 saat 125 volttda 250 miliAmper ve 75 waltta gerçekleştirilmiştir. Elektroforez bitiminde jel 40 dk etidyum bromid solusyonunda (1 µg/ml) ve 1 saat distile su içerisinde yıkanmıştır. Jellere UV transilluminatörde bakılmış ve elde edilen bantlar steril bistüri ve pens yardımıyla steril ependorf tüplerine alınmıştır. Ependor içerisindeki jellere 20 µl mQ su eklenmiş ve bir gece 4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübe olan jeller, dizi analizinin gerçekleştirilmesi için kalıp olarak kullanılmıştır (Muyzer ve ark. 1996). Jellerin PCR'ları ise son hacmi 25 µl olacak şekilde GC-clamp içermeyen primerlerden 1'er µl, kalıp 1 µl ve 22 µl PCR mix ile gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyon şartları ise yukardaki koşullar ile aynıdır. PCR sonrası ürün oluşumu %1'lik agaroz jelde belirlenmiş ve bu ürünlerin saflaştırması illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit' ile yapılmıştır. Saf örneklerin dizi analizleri ise 2.2.6.7'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Zenginleştirme DGGE Jellerinden Benzerlik Dendogramlarının Oluşturulması

Zenginleştirme örneklerinin DGGE sonrası her örnek için bir pattern oluşturmaktadır. Bu patternlerin kendi aralarında karşılaştırılması için jeldeki her banta bir numara verilerek her bantın hangi örneklerde bulunup bulunmadığını gösteren "var-yok" değerlendirmesinde her "var" için "1" ve her yok için "0" değeri kullanılarak bir matriks oluşturulmuştur. Oluşturulan bu matriks kullanılarak SPSS 19 istatistik programında jeldeki her örneğin birbirine göre benzerliğini yansıtan dendogramlar oluşturulmuştur. Bu dendogramlar Meke Archaea zenginleştirme ve Meke-Acıgöl Bacteria zenginleştirme kültürlerine yönelik olarak ayrı ayrı oluşturulmuştur.

2.2.6.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

ARDRA sonucunda elde edilen farklı paternlerin 16S PCR'ları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin saflaştırılması amacıyla 'illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit' ve 'Exo-SAP-IT PCR Clean up Kit' kullanılmıştır.

illustra™ GFX™ PCR DNA ve Gel Band Purification Kit uygulamasında öncelikle %1'lik agaroz jelde yürütülen PCR ürünleri UV transillüminatör üzerinde gözlenmiş ve istenilen bölgedeki bantlar jelden kesilmiş ve öncesinde tartımı gerçekleştirilmiş olan DNase-free 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine istenilen DNA bölgesini içeren bantlar mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Tüp ve bantların ağırlığı tekrar tartılmış ve agaroz bandının ağırlığı hesaplanmıştır. 10 mg agaroz 10 µl yakalama çözeltisi olacak şekilde tüpe koyulmuş ve karıştırılmıştır. Agaroz tamamen eriyene dek 60 °C'de bekletilmiştir. GFX MicroSpin™ kolonu toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş, 600 µl agaroz içeren yakalama çözeltisi kolona koyulmuştur ve 60 saniye oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 30 saniye 16 000 x g'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpü içerisindekiler atılmıştır. GFX MicroSpin™ kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiş ve yakalama çözeltisi örnek bitene dek aynı işlem gerçekleştirilmiştir. 500 µl yıkama çözeltisi kolona koyulmuş, 30 saniye 16 000 x g'de santrifüj edilmiş ve bu aşamada kolon 1.5 ml'lik DNase-free mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. 10-50 µl elusyon çözeltisi kolona eklenmiş ve 60 saniye oda sıcaklığında bırakılmıştır. Sonrasında 60 saniye 16 000 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüpündeki saf DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülüp UV transillüminatör üzerinde saflığı kontrol edildikten sonra -20 °C'de saklanmıştır.

Exo-SAP-IT PCR Clean up Kit uygulamasında ise 5 µl PCR ürünü, 2 µl ExoSAP hidrolitik enzim karışımı (Ekzonükleaz I ve Shrimp Alkaline Fosfat) ile 15 dk 37 °C ve 15 dk 80 °C de olmak üzere 30 dk inkübasyona bırakılmış ve bu inkübasyon sürelerinden sonra DNA saf olarak elde edilmiştir.

2.2.6.7. PCR Ürünlerinin Dizi Analizleri ve Gen Analizleri

ARDRA sonucunda farklı profil veren izolatların ve DGGE bantlarının 16S PCR ürünlerinin saflaştırılmasından sonra 16S gen bölgesinin dizilenmesi amacıyla Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı kullanılmıştır. Dizileme işlem için Beckman Coulter GenomaLab™ DTCS Quick Start Kiti kullanılmıştır. Kitin önerdiği şartlar doğrultusunda reaksiyona 0.65 µl primer (21F, 27F, 785F, 907R ve 1492R), 1.35 µl DEPC'li su, 2 µl kalıp ve 6 µl Beckman dizi analiz mixi eklenmiştir. PCR reaksiyon koşulları ise aşağıdaki tabloda verilmiştir.

30 Döngü	
Denatürasyon	96 °C 20 sn
Bağlanma	50 °C 20 sn
Uzama	60 °C 4 dk
Bekleme	4°C Süresiz

Dizi analizi PCR sonrasında bağlanmamış primer ve dNTP'lerin reaksiyondan uzaklaştırılması için 4 µl stop solusyonu (3 M NaOAc pH:5.2, 100 mM EDTA pH:8, glikojen, DNase-RNase free su) reaksiyona eklenmiştir. Karışım üzerine PCR reaksiyonu kadar manyetik boncuk (Beckman Coulter Agencourt Clean SEQ) eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. 55 µl %73'lük isoproponal tüplere eklenmiş ve 10-15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu esnada boncukların çökmemesi için karışım karıştırılmıştır. Süre bitiminde tüpler magnete yerleştirilmiş ve 3-5 dk bekleme süresi ardından, supernatant kısmı dikkatlice alınmış ve atılmıştır. Magnetteki tüplere 200 µl %73'lük isoproponaldan eklenmiş ve 3 dk beklenmiştir. Süre bitiminde supernatant alınmış ve yine 200 µl %73'lük isoproponal magnetteki boncuk içeren tüplere ilave edilmiştir. 3 dk beklendikten sonra tüpler alınmış ve 10-20 dk oda sıcaklığında boncukların kuruması sağlanmıştır. Kuruyan boncuklara 40 µl Sample Loading Solution (SLS) eklenmiş ve boncukların tamamen çözünmesi sağlanmıştır. SLS ile çözünen örnekler tekrar magnete alınarak 5 dk beklenmiş ve 35 µl supernatant

dizi analizi plağına koyulmuştur. Örneklerin cihazda analizi boyunca uçmaması için örneklerin üzerine mineral yağı damlatılmıştır. Ayrımın gerçekleştirilmesi için başka bir plağa seperasyon çözeltisi (GenomaLab™ Separation Çözelti 4x30 ml), sistemim çalışması için gerekli olan seperasyon jeli (GenomaLab™ Separation Gel LPAI) ve hazırlanan örnekler Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı kapiller sistemine verilmiştir.

İzolaların, DGGE bantlarının dizi analizi sonrası gen analizleri NCBI 'National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)' veritabanındaki BLAST (Altschul ve ark , 1997) programı ile gerçekleştirilmiştir. Böylece dizi analizinde elde edilen dizilerin filogenetik benzerlikleri ortaya koyulmuştur.

2.2.6.8. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

Meke ve Acıgöl örneklerinden Archaea, Bacteria ve *Salinibacter ruber* spesifik problarla FISH gerçekleştirilmiştir. Problarla ilgili ayrıntılı bilgi Çizelge 2.2'de açıklanmıştır. FISH'in öncelikli adımı olan fiksasyon için Acıgöl için 1 ml örneğe 220 µl formaldehit (Fluka), Meke Ağustos ayı örneği için 100 µl+900 µl steril su 220 µl, Meke Nisan ayı örneği için 1000 µl su örneğine 220 µl formaldehit eklenmiş ve 1 gece 4 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında fikse olmuş örneğe 10 µl 1X PBS eklenmiş ve örnek 0.2 µm por çaplı GTTP filtreden geçirilmiştir. Ardından yıkama aşaması için aynı filtre üzerinden 10 ml 1X PBS geçirilmiştir. Elde edilen filtreler havada kurutulduktan sonra muhafaza edilmek üzere -20 °C'ye kaldırılmıştır.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan FISH proplarının özellikleri

Prob Adı	Spesifik Olduğu Grup	Propların Dizisi (5'/Cy3--3')
Arc 915	Archaea	GTGCTCCCCCGCCAATTCT
Arc344	Archaea	TCG CGC CTG CTG CTC CCC GT

Çizelge 2.2.(Devamı) Çalışmada kullanılan FISH problemlerinin özellikleri

Eub338	Bacteria	GCTCCCTCCCGTAGGAGT
EHB 1451	<i>Salinibacter ruber</i>	GCCCTTCTCCCTCCGGCT
EHB 412	<i>Salinibacter ruber</i>	TACGCCCCATAGGGGTGT

Fiksasyon işleminin sonrasında hibridizasyon için filtrenin 1/8'i kullanılmıştır. Hibridizasyon tamponunun 18 µl'ine ve 2 µl prob eklenerek elde edilen karışım filtre üzerine pipetlenmiştir. Geriye kalan hibridizasyon tamponu 50 ml'lik falkon tüp içerisine yerleştirilmiş kağıt havlunun ıslatılması için kullanılmıştır. Lam üzerinde hibridizasyon çözeltisi içeren filtre parçaları yatay şekilde önceden 46°C'ye getirilmiş hibridizasyon fırınında (Biometra OV3) 2 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında filtreler önceden 48°C'de ısıtılmış yıkama solusyonu içerisine alınarak 15 dk 48°C bekletilmiştir. Bu süre sonrasında filtreler kurutma kağıdı üzerine alınarak havada kurumaya bırakılmıştır. Filtre lama alınarak üzerine Citifluor (Citifluor Ltd.) damlatılmıştır. Toplam mikroorganizma sayısının belirlenmek istendiği durumlar da ise filtre üzerine citifluor damlatılmadan DAPI boyaması işlemine geçilmiştir (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999).

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

Tuzlu su örneklerindeki toplam mikroorganizma sayısını belirlemek için ortamdaki tüm DNA'ları boyama özelliğindeki DAPI boyaması uygulanmıştır. DAPI boyaması için filtre parçasına 20 µl DAPI boyası pipetlenmiş ve oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Filtre parçası önce saf alkol ile sonrasında MQ su ile 10'ar saniye yıkanmıştır. Yıkanmış filtrenin havada kuruması sağlandıktan sonra, lam üzerindeki filtre üzerine citifluor damlatılmış ve lamelle kapatılmıştır. Preparatın incelenmesi epifluoresan mikroskopta (Leica DM6000B) 100X'lik objektifte gerçekleştirilmiştir (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999; Aman ve ark. 2000).

2.2.6.10. DOPE-FISH (Çift Tarafı İşaretli Prob Kullanılan Floresan in situ Hibridizasyon)

Meke Nisan örneğine Münih Teknik Üniversitesi'nde FISH araştırma laboratuvarında 3' ve 5' cyanin ile işaretlenmiş Arc915 ve Eub338 problemleri kullanılarak DOPE-FISH uygulanmıştır. Bu uygulama esnasında standart FISH'de uygulanan tüm aşamalar aynen gerçekleştirilmiş, farklı olarak her iki tarafı işaretli prob kullanımı uygulanmıştır (Stoecker ve ark.2010).

3. BULGULAR

3.1. Alan Seçimi ve Örneklerin Toplanması

Acıgöl'den çalışma için alınan su örneğinin koordinatları N 37° 41' 488 E 33° 38' 378'dır (Şekil 3.1 ve 3.3). Meke Gölü'nden alınan su örneklerinin koordinatları ise N 37° 41' 484 E 33° 38' 377'dir (Şekil 3.2 ve 3.4).



Şekil 3.1. Acıgöl örnekleme bölgesi uydu görüntüsü (maps.google.com/)



Şekil 3.2. Meke Gölü örnekleme bölgesi uydu görüntüsü (maps.google.com/)



Şekil 3.3. Acıgöl örnekleme noktası



Şekil 3.4. Meke Gölü örnekleme noktası

3.2.Örneklerdeki Toplam Tuz Değerinin, pH'ların ve Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Acıgöl ve Meke Gölleri'nden alınan su örneklerinin NaCl (%) ve pH değerleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Acıgöl ve Meke Gölü'nün NaCl (%) ve pH değerleri

	Tuzluluk (% NaCl)	pH
Acıgöl (21.08.2010)	6.5	7.64
Acıgöl (21.04.2011)	6	8.4
Meke Gölü (21.08.2010)	>25	7.04
Meke Gölü (21.04.2011)	18	8.04

Su örneklerinin içerdiği belli bazı elementler (Na^+ , Mg^{+2} , K^+ , Mn^{+2} , Ca^{+2}) Perkin Elmer Emission Spectrometer Optima 4300 DV cihazı ölçüm değerleri Çizelge 3.2’ de verilmiştir.

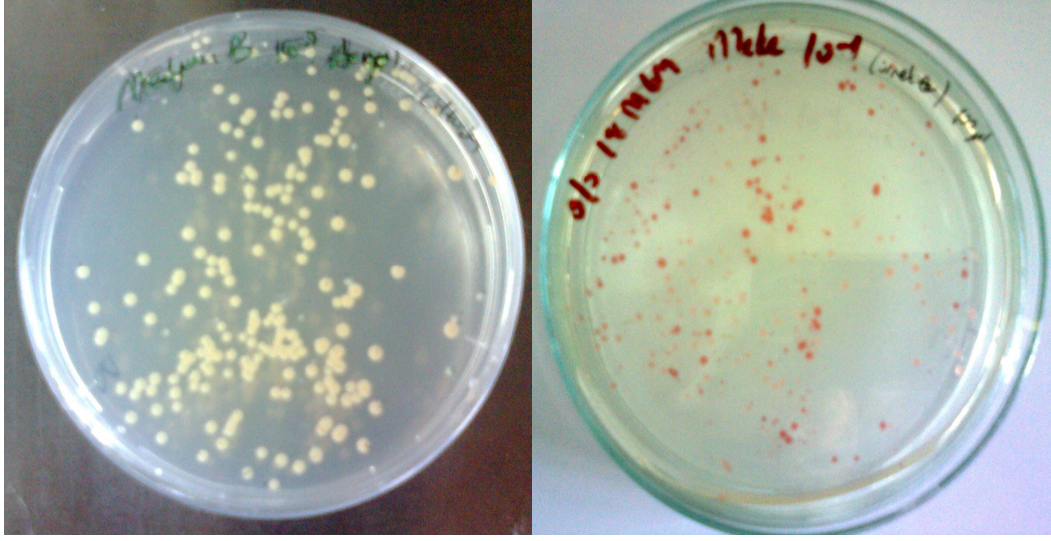
Çizelge 3.2. Acıgöl ve Meke Gölü’nün içerdiği element değerleri

	Ca^{+2}	Mg^{+2}	K^+	Na^+	Mn^{+2}
Acıgöl (21.08.2010)	319 ppm	10350 ppm	8958 ppm	33.34x100000 ppm	20.24 ppb
Acıgöl (21.04.2011)	38.82 ppm	7.339 ppmx200	14.13 ppmx200	78.34 ppmx200	<10 ppb
Meke Gölü(21.08.2010)	16.91 ppm	5210 ppm	10120 ppm	24.04x100000 ppm	348 ppb
Meke Gölü (21.04.2011)	56.90 ppm	18.70 ppmx200	19.43 ppmx200	55.98 ppmx1000	<10 ppb

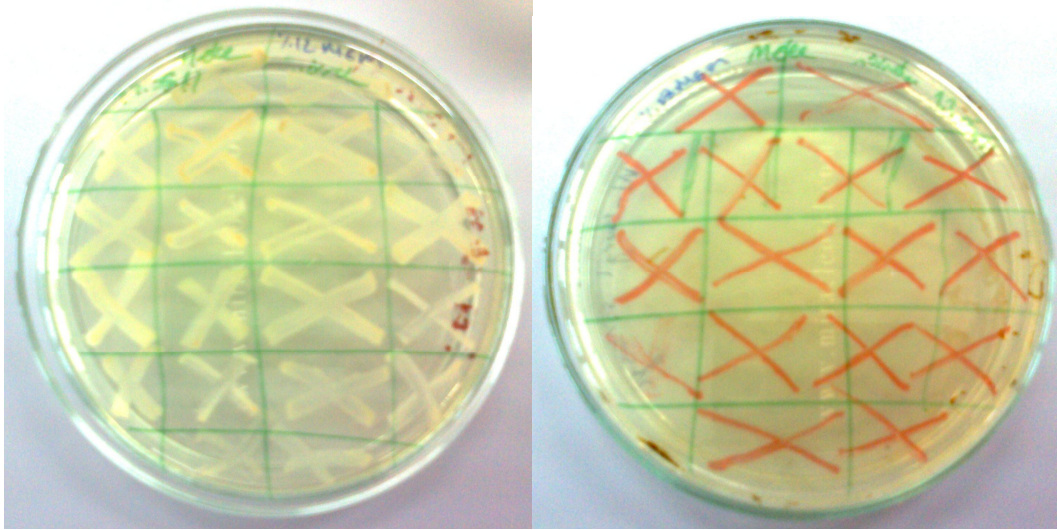
Na^+ :589.592 nm Ca^{+2} :317.933 nm K^+ :766.49 nm Mn^{+2} :257.610 nm Mg^{+2} :285.213 nm

3.3. Su Örneklerinden Halofilik Mikroorganizma İzolasyonu

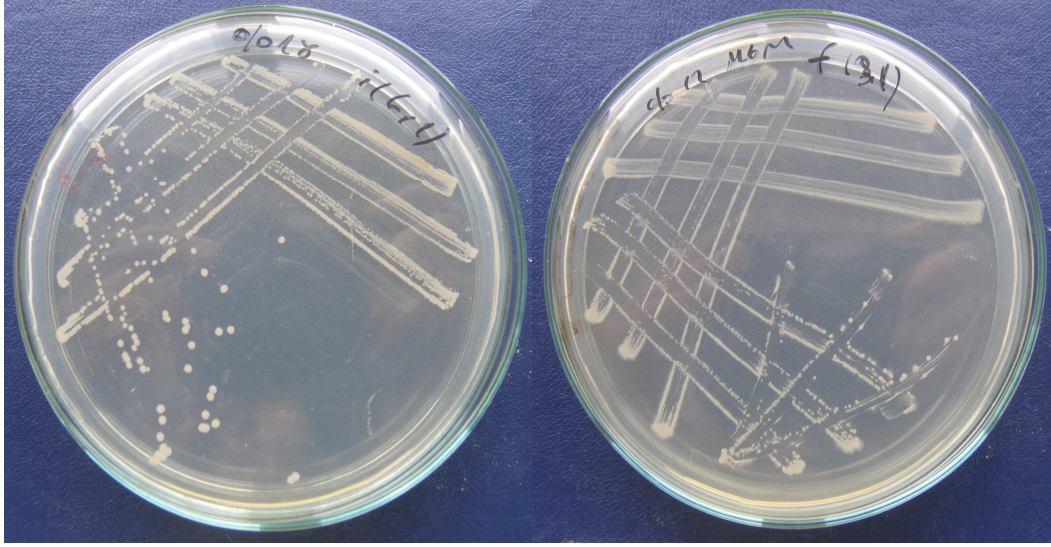
Acıgöl ve Meke Gölü’nden halofilik mikroorganizma izolasyonu Medyum A, Medyum B, Medyum C, Medyum D, Medyum E, Medyum Has, %12’lik, %18’lik, %23’lük ve % 25’lik MGM’ler ile (Şekil 3.5) gerçekleştirilmiştir. Besiyerlerinde üreme sonucunda elde edilen saf koloniler (Şekil 3.6) ARDRA analizi sonucunda elde edilen farklı paternlere göre stoklanmak amacıyla -85 °C’ de muhafaza edilmiştir. Aşağıda Acıgöl ve Meke Gölü’nden saf olarak elde edilmiş izolatların besiyerlerindeki görüntüleri verilmiştir (Şekil 3.7-3.10). İzolatların isimlendirilmesinde Acıgöl ve Meke Gölü Ağustos ayı için ‘a, b, c, h, i, f ve g’ gibi harfler kullanılırken, Nisan ayı izolatları için ‘1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13 ve 20’ gibi numaralar kullanılmıştır.



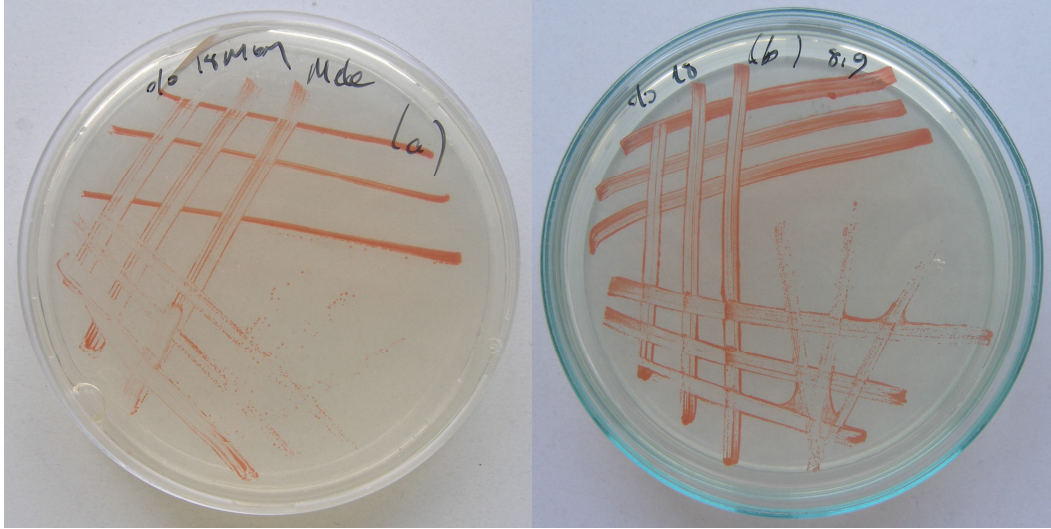
Şekil 3.5. Acıgöl örneği Medyum B’de ve Meke örneği %18 MGM’de gelişme gösteren koloniler



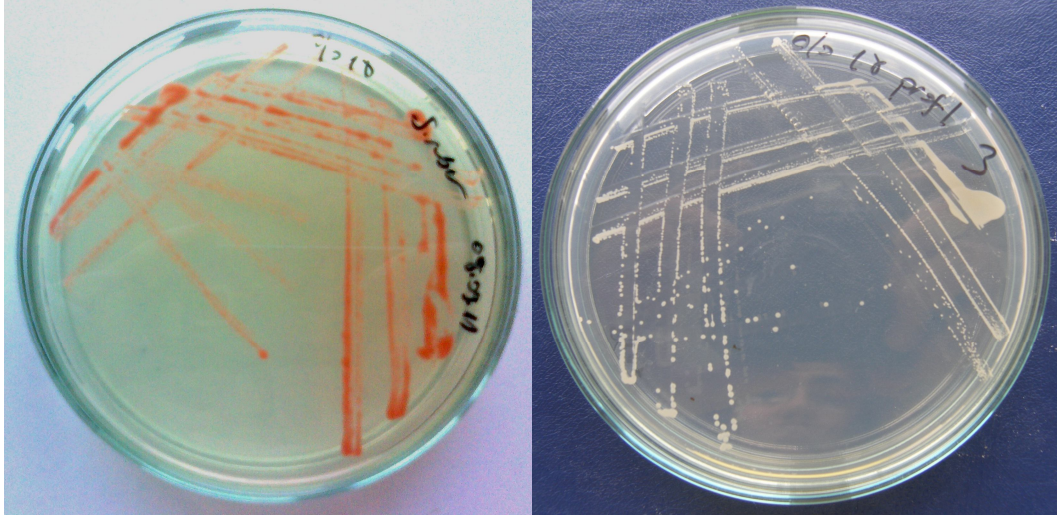
Şekil 3.6. Acıgöl ve Meke Gölü örneklerinden elde edilen beyaz-opak-kırmızı-pembe renkteki kolonilerin pasajlanması



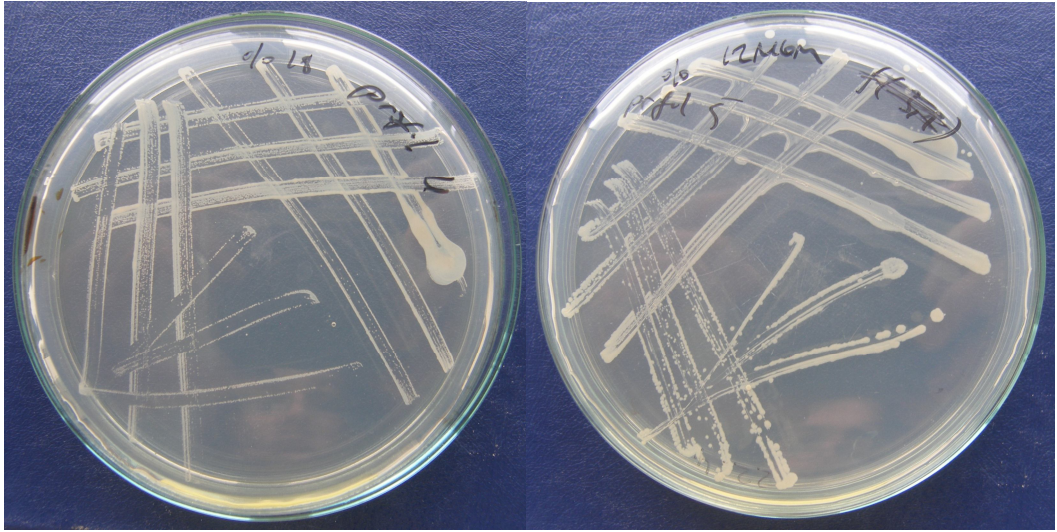
Şekil 3.7. 'i' ve 'f' olarak adlandırılan saf izolatların agar üzerindeki görüntüleri



Şekil 3.8. 'a' ve 'b' olarak adlandırılan saf izolatların agar üzerindeki görüntüleri



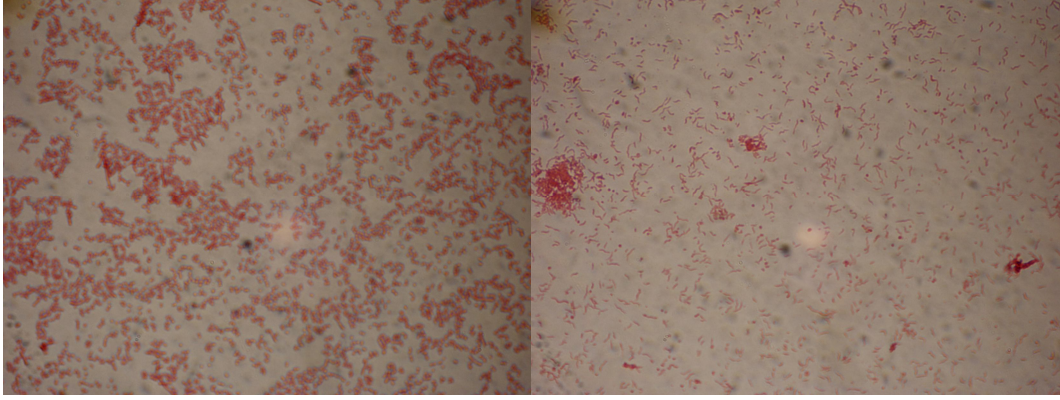
Şekil 3.9. 'h' ve '3' olarak adlandırılan saf izolatların agar üzerindeki görüntüleri



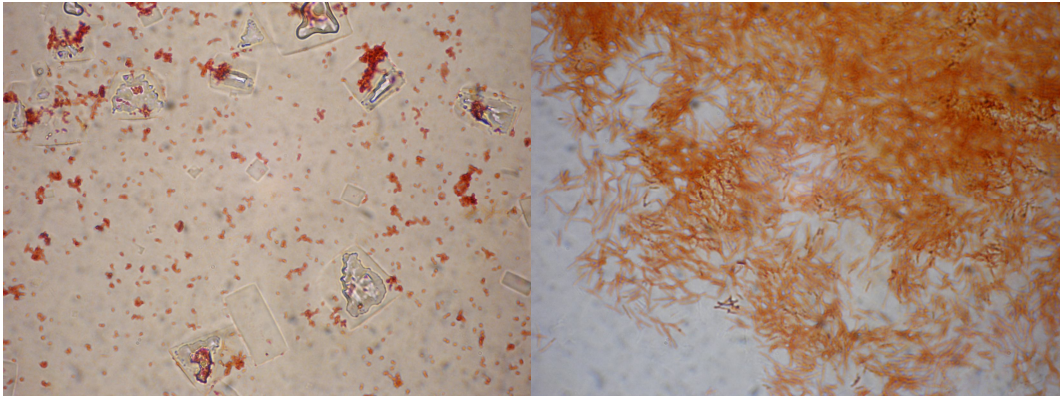
Şekil 3.10. '4' ve '5' olarak adlandırılan saf izolatların agar üzerindeki görüntüleri

3.4. Mikroskopik İnceleme

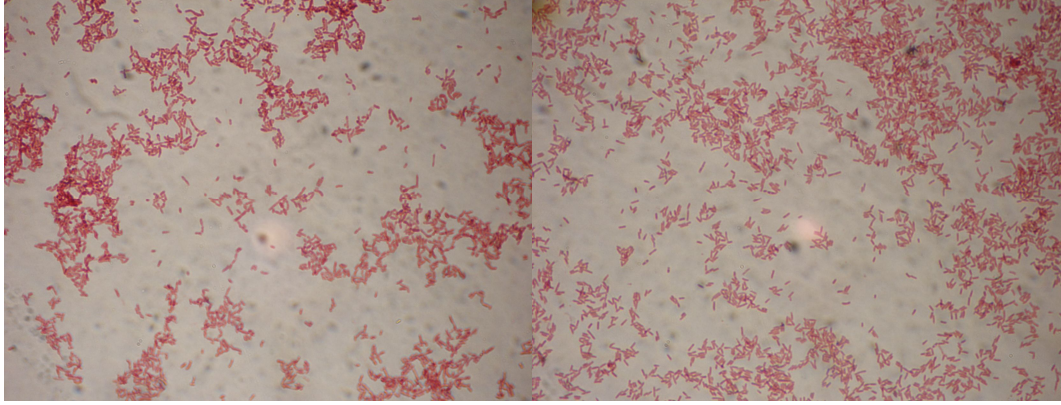
Halofilik mikroorganizmaların Gram boyamaları modifiye bir boyama yöntemi şeklinde gerçekleştirilmiştir. İzolatların Gram boyamalarına göre hepsi pembe renkli Gram negatif olarak belirlenmiştir. Boyamalar sonucunda basil, kısa ve uzun çubuk ve disk şeklinde hücreler gözlemlenmiştir. Bu hücrelere ait şekiller aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.11-3.13).



Şekil 3.11. 'i' ve '20' olarak adlandırılan saf izolatların Gram boyamaları



Şekil 3.12. 'c' ve 'h' olarak adlandırılan saf izolatların Gram boyamaları



Şekil 3.13. '3' ve '5' olarak adlandırılan saf izolatların Gram boyamaları

3.5. İzolatların Tuz ve Sıcaklık İsteklerinin Belirlenmesi

Meke Nisan ayı örneğine ait olan 1, 3, 4 ve 5 olarak isimlendirilen izolatların tuz (Çizelge 3.3) ve sıcaklık (Çizelge 3.4) istekleri belirlenmiştir. Tuz istekleri için %0, %3, %6, %12, %15, %18, %23 ve %25'lik MGM besiyerleri, sıcaklık istekleri için 30 °C, 37 °C, 42 °C ve 46 °C kullanılmıştır. Bu izolatların seçilmesinde ARDRA sonucunda elde edilen profillerin dizi analizi sonucunda düşük benzerlik oranı göstermiş olmaları baz alınmıştır.

Çizelge 3.3. Bazı Meke izolatlarının farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişim özelliklerinin belirlenmesi

İzolat	%0	%3	%6	%12	%15	%18	%23	%25
1	-	+	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+

Çizelge 3.3. (Devamı) Bazı Meke izolatlarının farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişim özelliklerinin belirlenmesi

4	-	+	+	+	+	-	-	-
5	-	+	+	+	+	+	+	+

Çizelge 3.4. Bazı Meke izolatlarının farklı sıcaklık değerlerindeki gelişim özelliklerinin belirlenmesi

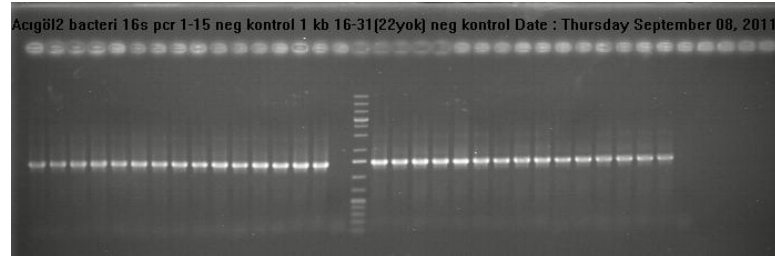
İzolat	30°C	37°C	42°C	46°C
1	+	+	+	-
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+

3.6. Örneklerin Kültür Bağımlı ve Kültür Bağımsız Prokaryotik Çeşitlilik Analizleri

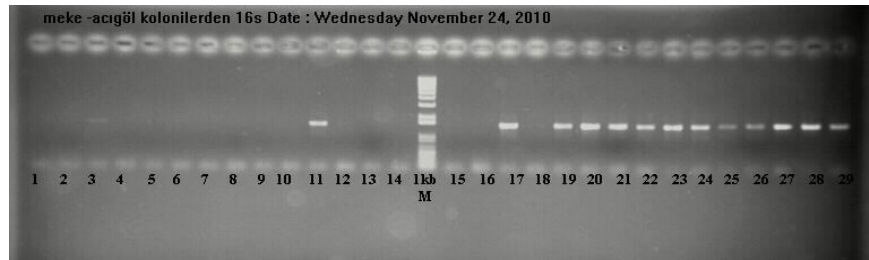
3.6.1. İzolatların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Archaea-Bacteria Ayrımlarının Yapılması ve Agaroz Jel Elektrofrezisi

Meke Gölü ve Acıgöl'den alınan su örneklerinin kültüre alma işlemlerinde farklı besiyerlerinden elde edilen kolonilerin Archaea-Bacteria ayrımı için elde edilen izolatlardan DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. İzolatların DNA'ları 16S rRNA genini çoğaltmak için kullanılmıştır. Bu PCR'da Archaea (21F-1492R) ve

Bacteria (27F-1492R) spesifik primer setleri kullanılmıştır ve PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen jel fotoğrafında Archaea ve Bacteria ayrımı aynı koloninin farklı primer setleriyle aynı sonucu vermemesi ile belirlenmiştir. Şekil 3.14'te Acıgöl'den izole edilen kolonilerin Bacteria spesifik primerler ile gerçekleştirilen 16S PCR sonucunda yaklaşık 1500 bazlık ürün veren jel görüntüsü gösterilmiştir. Aynı izolatların Archaea spesifik primerler ile gerçekleştirilen 16S PCR'ında ürün elde edilememiştir. Şekil 3.15'te ise aynı besiyerinde üreme görülen, morfolojileri ve renkleri benzer olan kolonilere farklı primer setleri ile gerçekleştirilen PCR'da Archaea spesifik primerler ile (1-14) sonuç alınmazken Bacteria spesifik primerler (15-29) ile sonuç alınmıştır. 3. ve 11. kuyucuklarda ürün varlığı kontaminasyon olasılığını göz önünde bulundurmanız gerektiğini düşündürmüş ve bu kolonilerin saflığı kontrol edilmiştir.



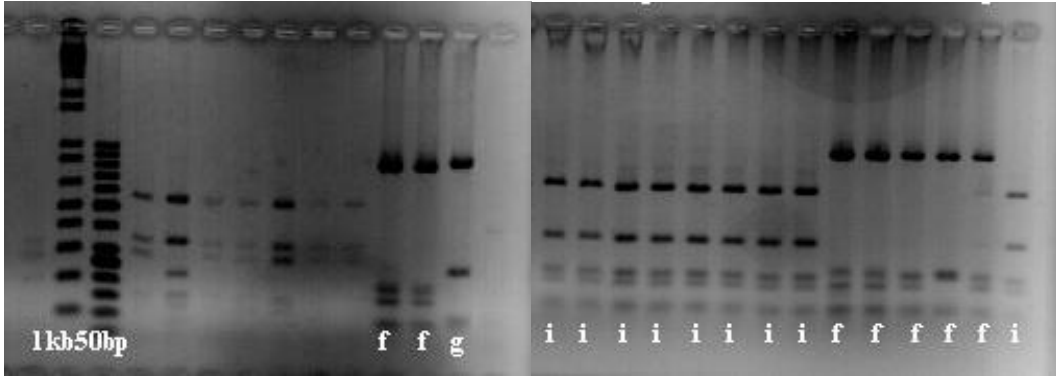
Şekil 3.14. Acıgöl Nisan örneği Bacteria spesifik primer setleri ile 16S PCR jel görüntüsü (1 kb Marker: Fermentas GeneRuler™)



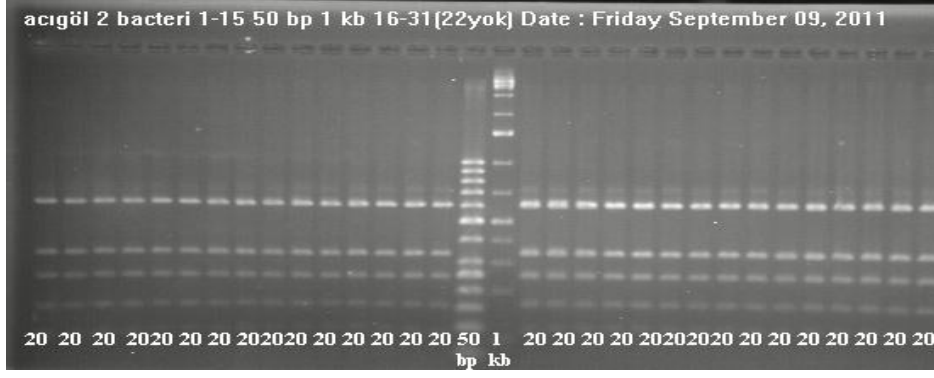
Şekil 3.15. Meke-Acıgöl Ağustos örneği Bacteria spesifik primer setleri ile 16S PCR jel görüntüsü (1-14: Archaea; 15-29: Bacteria 1 kb Marker: Fermentas GeneRuler™)

3.6.2. Amplifiye Edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA) ve PCR Ürünlerinin Dizi Analizi

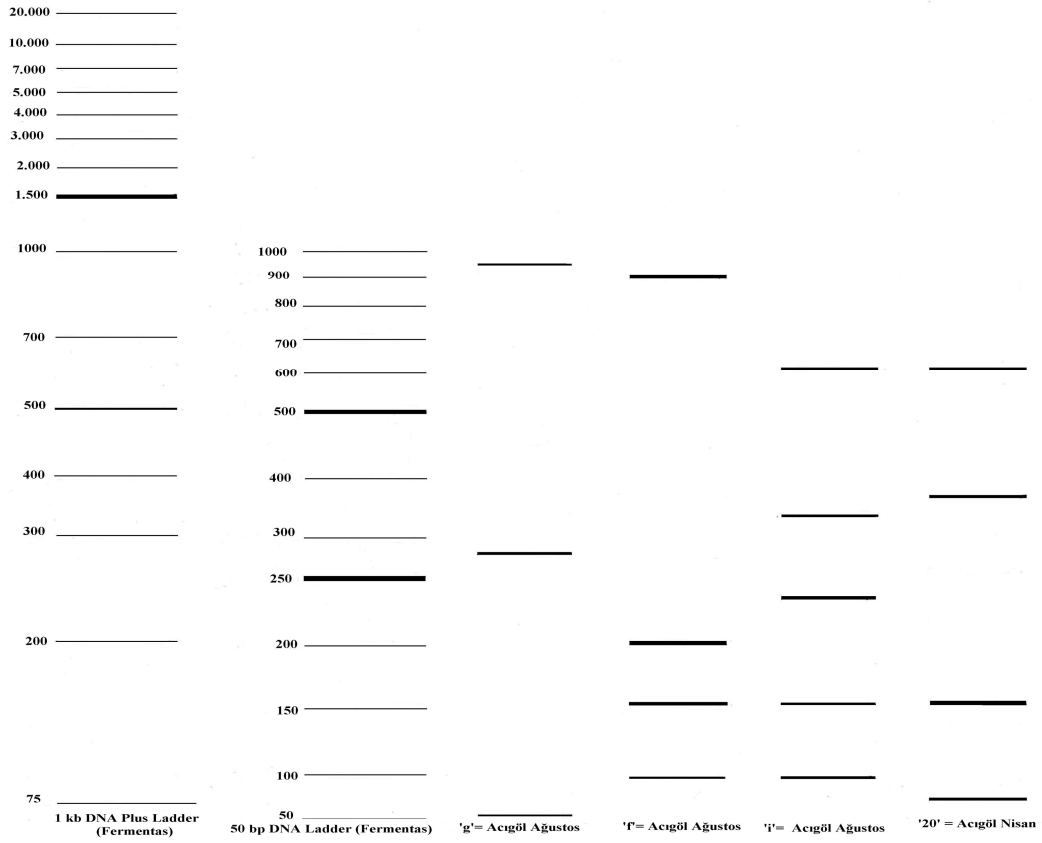
Acıgöl ve Meke Gölü Nisan ve Ağustos aylarında alınan su örneklerinden farklı besiyerlerinde üreme görülen saf izolatların Archaea–Bacteria ayrımı gerçekleştirildikten sonra elde edilen PCR ürünleri *MboI* restriksiyon enzimi ile kesimleri gerçekleştirilmiştir. Kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforez çözeltisi olarak 1X TBE kullanılarak belirlenmiştir. Kesimler sonucunda Acıgöl Ağustos ayında alınan örnekte 18 izolattan Bacteria domainine ait 3 (Şekil 3.16), Nisan ayında alınan örnekte Bacteria domainine ait 30 izolattan 1 patern (Şekil 3.17) elde edilmiştir. Acıgöl'den elde edilen paternlerin kesim haritası Şekil 3.18'de gösterilmiştir. Bu paternlere ait izolatların dizi analiz sonuçları Çizelge 3.5'de gösterilmiştir.



Şekil 3.16. Acıgöl Ağustos ayı Bacteria ürünlerinin *MboI* enzimi ile kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™)



Şekil 3.17. Acıgöl Nisan ayı Bacteria ürünlerinin *MboI* enzimi ile kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™)



Şekil 3.18. Acıgöl Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının *MboI* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası (İzolatlar sırası ile; g, f, i ve 20)

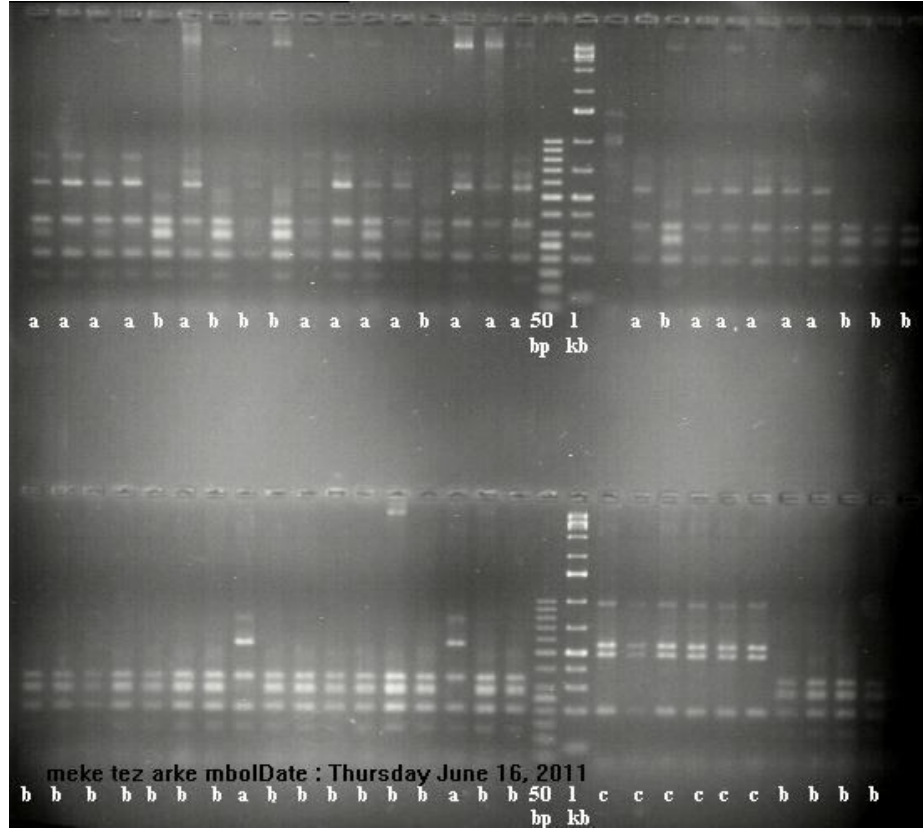
Çizelge 3.5. Acıgöl Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının *MboI* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin dizi analiz sonuçları

İzolat ismi	Kullanılan Primer	Accession numarası	Gen Bankasındaki Karşılığı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen Nükleotit Miktarı
g	785f +907r	DQ98507.0.1	<i>Idiomarina sp.</i> JL1018 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97	1461/1498
f	785f	CP001978.1	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15, complete genome	%97	665/679
i	785f	FJ444982.1	<i>Halomonas ventosae</i> strain whb36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98	689/702
20	27f+14 92+907 r+785f	FJ903195.1	<i>Thalassospira sp.</i> H94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%96	1364/1412

Çizelgede de görüldüğü gibi ‘g’ olarak adlandırılan izolat *Idiomarina sp.* JL1018 ile, ‘f’ olarak adlandırılan izolat *Marinobacter adhaerens* HP15 ile, ‘i’ olarak adlandırılan izolat *Halomonas ventosae* strain whb36 ile ve ‘20’ olarak adlandırılan izolat *Thalassospira sp.* H94 ile benzerlik göstermektedir.

Meke Gölüne ait Ağustos örneğinde Archaea’den izole edilen 97 izolattan 3 patern (Şekil 3.19), Nisan ayındaki su örneğinden ise 45 izolattan 4 patern (Şekil 3.20) belirlenmiştir. Meke Gölüne ait bu paternlerin restriksiyon kesim haritaları (Şekil 3.21) gerçekleştirildiğinde farklı zamanlarda alınan su örneklerinden izole edilen Archaea’lardan ‘a’ olarak isimlendirilen Ağustos izolatının ‘10’ olarak isimlendirilen Nisan izolatı ile ‘b’ olarak isimlendirilen Ağustos izolatı ile ‘11’

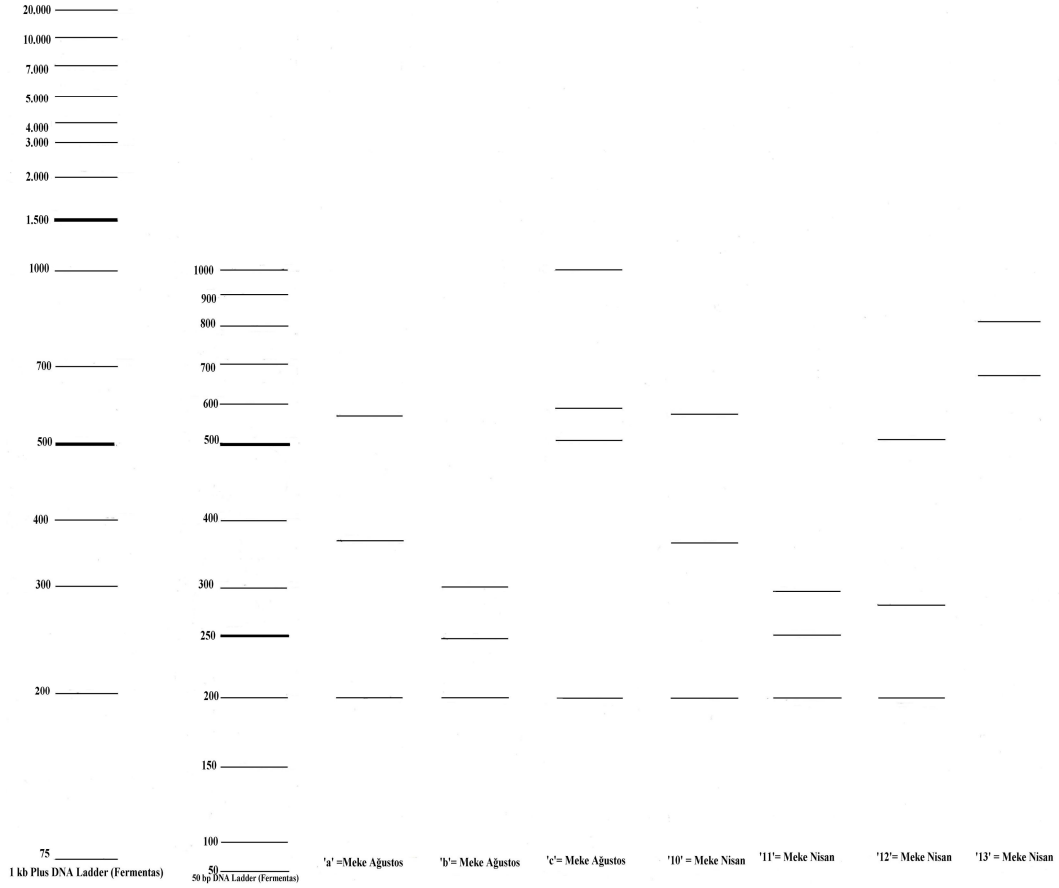
olarak isimlendirilen Nisan izolatının aynı olduğu belirlenmiştir. Elde edilen 5 farklı paterne ait izolatlardan '12' ve '13' olarak adlandırılan izolatlar dışındaki 3 farklı izolatın dizi analizinin gerçekleştirilmesi ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6'de gösterilmiştir.



Şekil 3.19. Meke Gölü Ağustos ayı Archaea ürünlerinin *MboI* enzimi ile kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™)



Şekil 3.20. Meke Gölü Nisan ayı Archaea ürünlerinin *MboI* enzimi ile kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™)



Şekil 3.21. Meke Gölü Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Archaea izolatlarının *MboI* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası (İzolatlar sırası ile; a, b, c, 10, 11, 12 ve 13)

Çizelge 3.6. Meke Ağustos ve Nisan Örneklerinden elde edilen Archaea izolatlarının *MboI* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin dizi analiz sonuçları

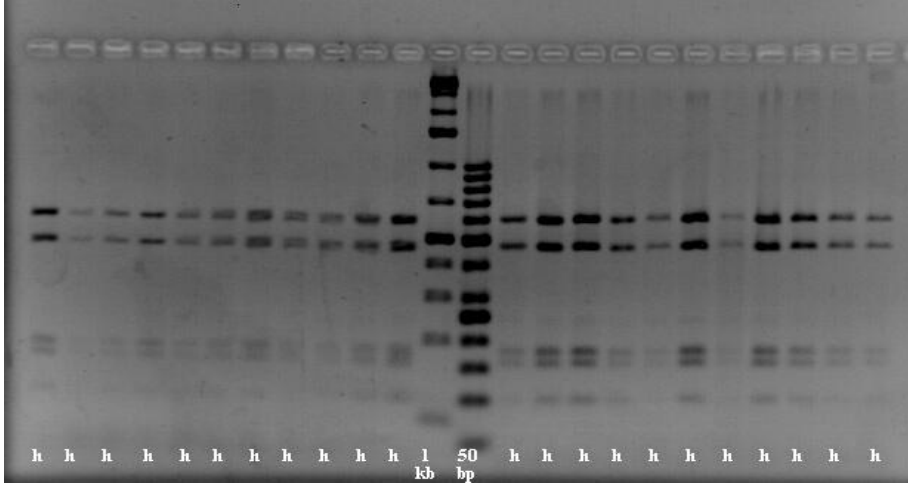
İzol at ismi	Kullanılan Primer	Accession numarası	Gen Bankasındaki Karşılığı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen Nükleotit Miktarı
a-10	785f+907r	JN216862 .1	<i>Halorubrum</i> sp. YC-X4 16S ribosomal RNA gen	%97	1379/1419

Çizelge 3.6. (Devamı) Meke Ağustos ve Nisan Örneklerinden elde edilen Archaea izolatlarının *Mbol* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin dizi analiz sonuçları

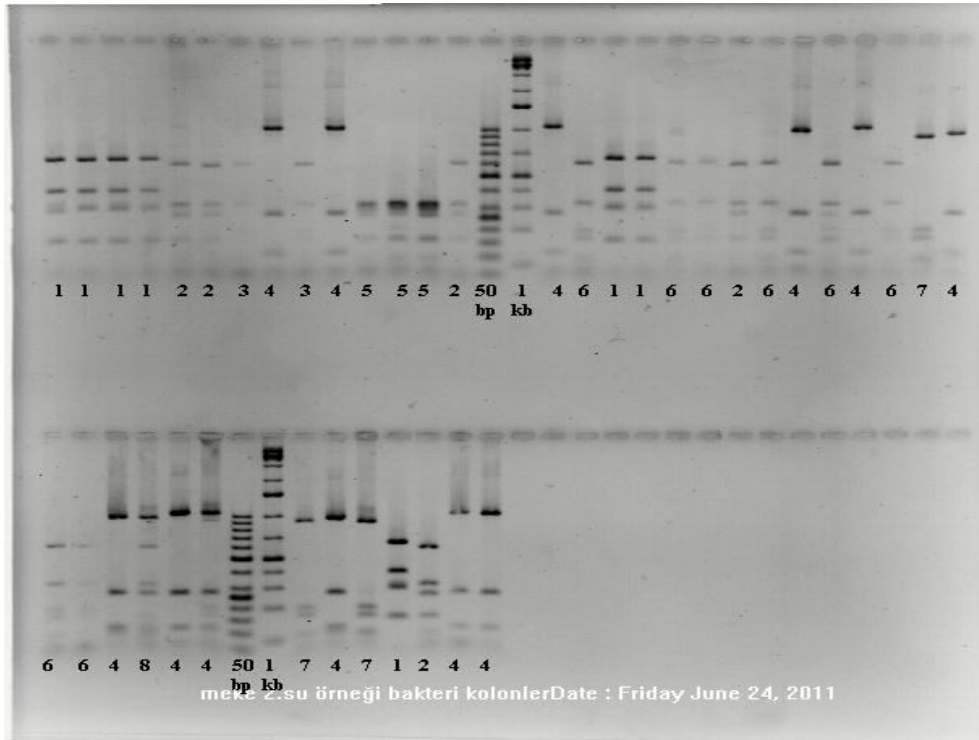
b-11	907r	HQ17913 4.1	<i>Halorubrum</i> sp. ETD2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%96	727/751
c	785f+907r+ 1492r	DQ98787 8.1	<i>Halorubrum</i> sp. HEN2-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94	1328/1402

Çizelgede de belirtildiği gibi ‘a’ olarak adlandırılan izolat *Halorubrum* sp. YC-X4 ile, ‘b’ olarak adlandırılan izolat *Halorubrum* sp. ETD2 ile ve ‘c’ olarak adlandırılan izolat *Halorubrum* sp. HEN2-25 ile benzerlik göstermektedir.

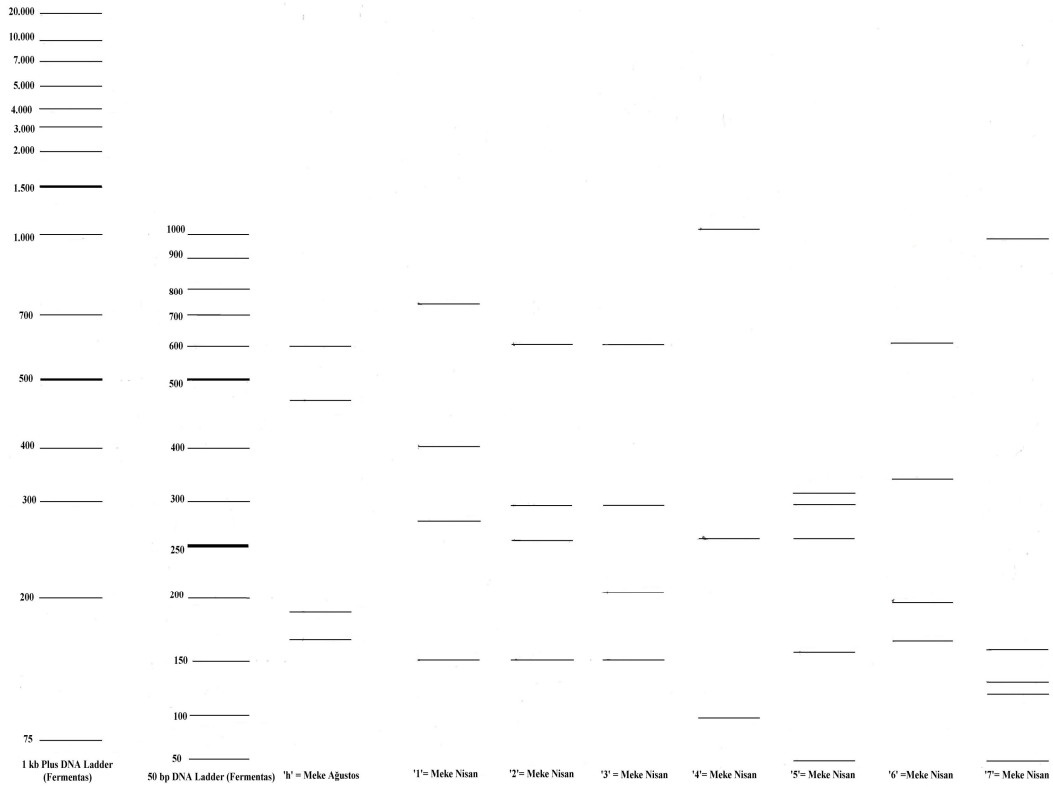
Meke Gölüne ait Ağustos örneğinde Bacteria olarak izole edilen 22 izolattan 1 patern (Şekil 3.22) Nisan örneğinde ise, Bacteria’ya ait 39 izolattan 7 patern (Şekil 3.23) elde edilmiştir. Farklı paternleri temsil eden Bacteria strainlerinin kesim haritası Şekil 3.24’de gösterilirken, dizi analiz sonuçları Çizelge 3.7’de gösterilmiştir.



Şekil 3.22. Meke Gölü Ağustos ayı Bacteria ürünlerinin *MboI* enzimi ile kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™)



Şekil 3.23. Meke Gölü Nisan ayı Bacteria ürünlerinin *MboI* enzimi ile kesimi (1 kb ve 50 bp Marker: Fermentas GeneRuler™)



Şekil 3.24. Meke Gölü Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının *MboI* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası (İzolatlar sırası ile; h, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7)

Çizelge 3.7. Meke Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının *MboI* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin dizi analiz sonuçları

İzo lat is mi	Kullanıla n Primer	Accession numarası	Gen Bankasındaki Karşılığı	Yüzde Benze rlik	Eşleşen Nükleotit Miktarı
h	27f+785f+ 907r	HQ19798 2.1	<i>Salinibacter sp.</i> CB7 16S ribosomal RNA	%98	1426/1443
1	907r+149 2r	NR_0422 55.1	<i>Salinivibrio costicola</i> <i>subsp. alcaliphilus</i> 16S ribosomal RNA, partial	%94	1253/1325

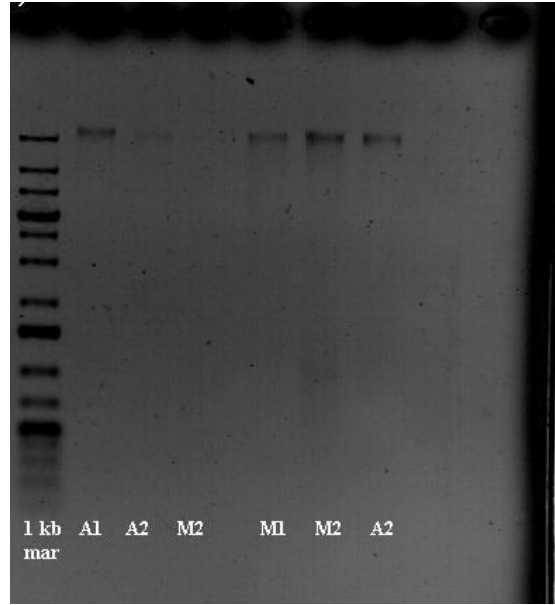
Çizelge 3.7. (Devamı) Meke Ağustos ve Nisan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının *MboI* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin dizi analiz sonuçları

2	907r	EU868848 .1	<i>Halomonas sp.</i> S74-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%91	396/ 435
3	27f+907r+ 1492r	GQ90344 4.1	<i>Halomonas ventosae</i> strain XJSL7-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%93	1417 /151 1
4	907r+ 1492r	EU868885 .1	<i>Idiomarina sp.</i> S87-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94	904/ 958
5	785F+907r + 1492r	EU308361 .1	<i>Halomonas sp.</i> TB216 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95	1045 /109 1
6	1492r	JF420893 1	<i>Halomonas ventosae</i> strain QHL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98	481/ 487
7	907R	HQ32698 7.1	<i>Marinobacter guineae</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99	355/ 356

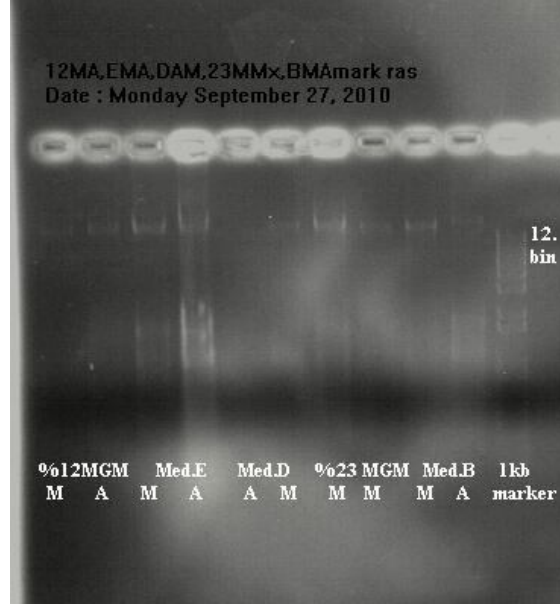
Yukarıda ki çizelgede belirtildiği gibi ‘h’ olarak adlandırılan izolat ile *Salinibacter sp.* CB7, ‘1’ olarak adlandırılan izolat ile *Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus*, ‘2’ olarak adlandırılan izolat ile *Halomonas sp.* S74-1, ‘3’ olarak adlandırılan izolat ile *Halomonas ventosae* strain XJSL7-5, ‘4’ olarak adlandırılan izolat ile *Idiomarina sp.* S87-1, ‘5’ olarak adlandırılan izolat ile *Halomonas sp.* TB216, ‘6’ olarak adlandırılan izolat ile *Halomonas ventosae* strain QHL5 ve ‘7’ olarak adlandırılan izolat ile *Marinobacter guineae* benzerlik göstermektedir.

3.6.3. Genomik DNA İzolasyonu

Meke ve Acıgöl Ağustos ve Nisan su örnekleri (Şekil 3.25) ile Meke ve Acıgöl Ağustos zenginleştirme örnekleri için sıvı %12, %23 MGM ve Medyum B, D, E (Şekil 3.26) ortamlarından genomik DNA izolasyonu Cifuentes ve ark. (1999) ve Nogales ve ark. (2000)'in önermiş olduğu ekstraksiyon yöntemlerinde değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.25. Acıgöl ve Meke Ağustos ve Nisan su örneklerinden genomik DNA izolasyonu (A1. Acıgöl Ağustos M1.Meke Ağustos A2.Acıgöl Nisan M2. Meke Nisan Su Örnekleri; 1 kb DNA Marker ,Bioron)

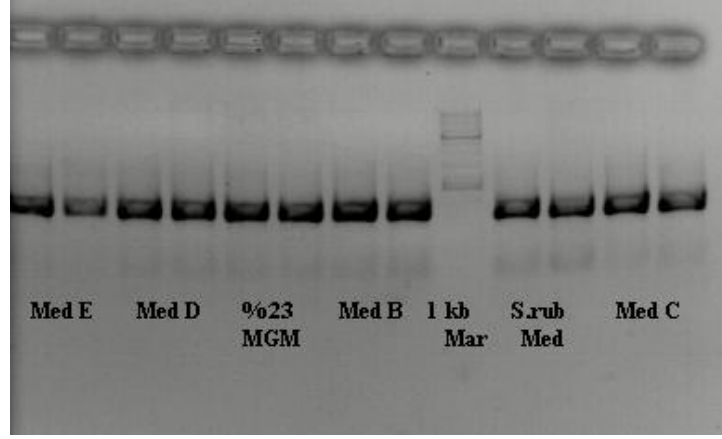


Şekil 3.26. Meke ve Acıgöl Ağustos örnekleri %12, %23 MGM ve Medyum B, D ,E ortamlarından genomik DNA izolasyonu (A. Acıgöl M.Meke, 1 kb Plus DNA marker, İnvitrogen)

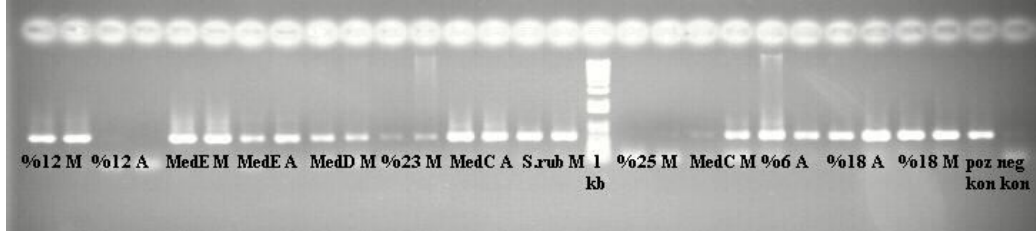
3.6.4. Zenginleştirme Kültürleri, Su Örnekleri ve Bacteria İzolatlarından Denatüre Edici Gradient Jel Elektrofrez (DGGE) ve Dizi Analizleri

Meke ve Acıgöl Ağustos ayı zenginleştirme örneklerinden DGGE analizinin gerçekleştirilmesi için Meke için Archaea (Şekil 3.27) ve Meke ve Acıgöl için Bacteria'dan (Şekil 3.28) elde edilen ortalama 500 bazlık 16S PCR ürünlerinin DGGE jeline yüklemek için yeterli olup olmadığını kontrol etmek için Low Mass DNA ladder (İnvitrogen) eşliğinde DGGE jeline yüklenecek örnekler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.29-3.30). 400-500 ng olacak şekilde DGGE jeline yüklenecek PCR ürün miktarı hesaplandıktan sonra denatüre edici gradient jel elektrofrez sistemi hazırlanarak örneklerdeki populasyonların çeşitlilikleri jel profilleri ile belirlenmiştir. (Şekil 3.31-3.32) ve belirlenen bu profillerden Meke Archaea için re-PCR yapılarak elde edilen ortalama 500 bazlık ürünlerin (Şekil

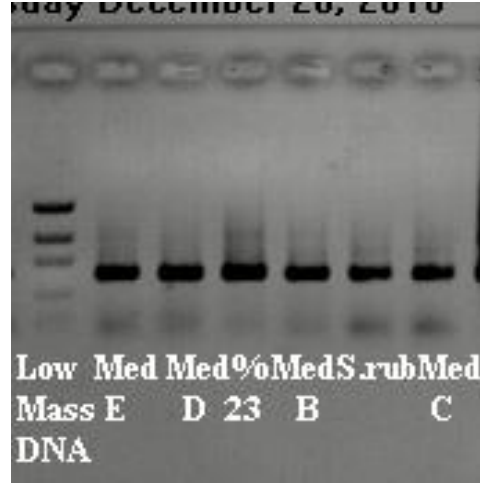
3.33) Arkeal dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Dizi analiz sonuçları Çizelge 3.8'de belirtilmiştir.



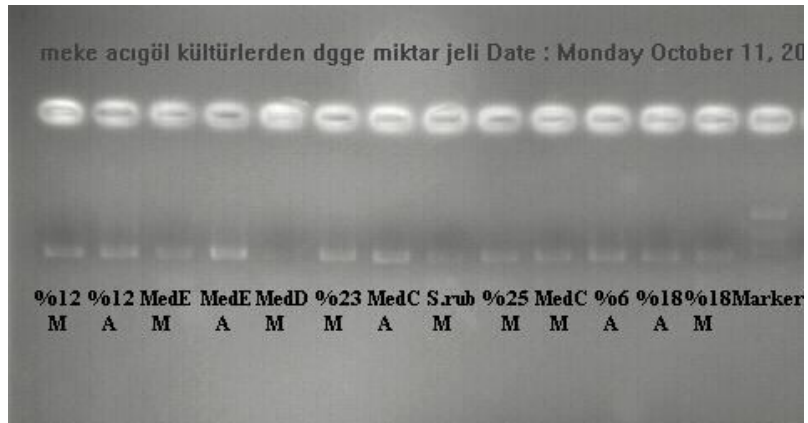
Şekil 3.27. Meke Ağustos ayı kültürlerden elde edilen DNA'lardan Archaea için DGGE-16S PCR jel görüntüsü (1 kb Plus DNA marker: İnvitrogen)



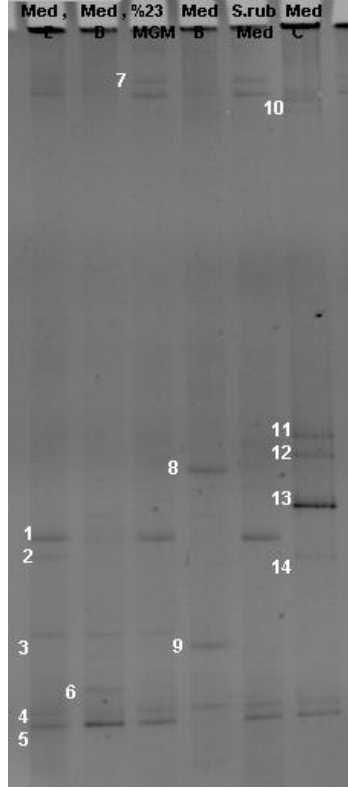
Şekil 3.28. Meke ve Acıgöl Ağustos ayı kültürlerden elde edilen DNA'lardan Bacteria için DGGE-16S PCR jel görüntüsü (M: Meke A:Acıgöl; 1 kb Plus DNA marker: İnvitrogen)



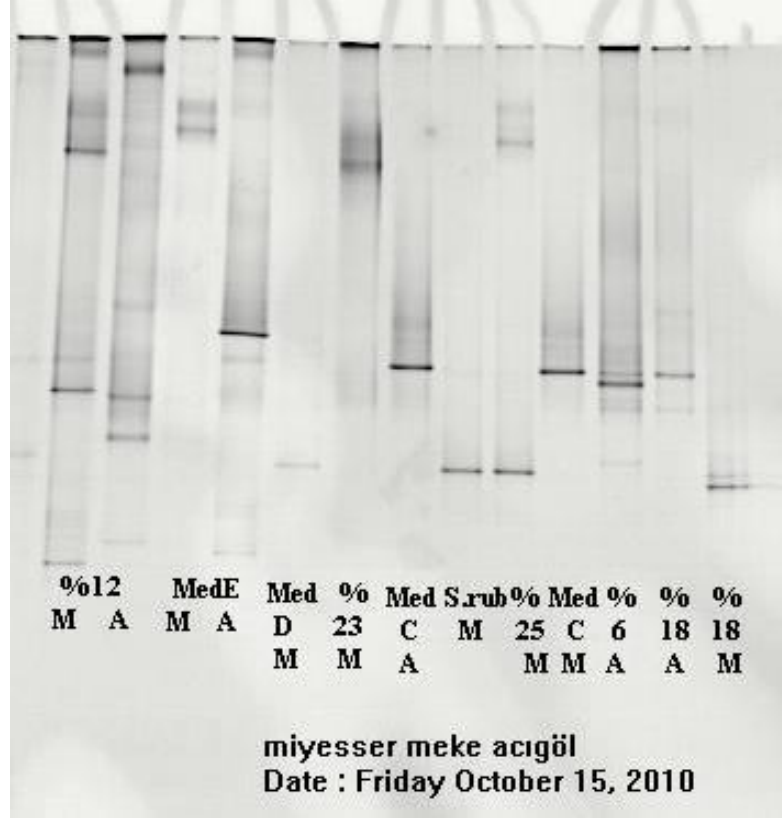
Şekil 3.29. Meke Archaea örneklerinden DGGE jeline yüklenecek 16S PCR ürününün hesaplanması için elde edilen jel görüntüsü (Low Mass DNA Ladder; İnvitrogen)



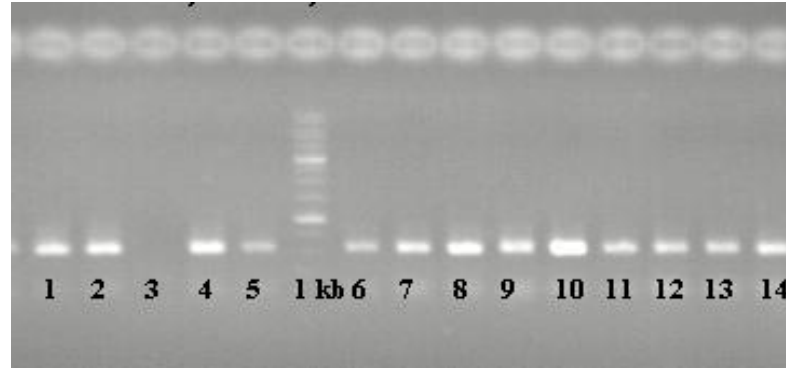
Şekil 30. Meke ve Acıgöl Bacteria örneklerinden DGGE jeline yüklenecek 16S PCR ürününün hesaplanması için elde edilen jel görüntüsü (M: Meke A:Acıgöl; Low Mass DNA Ladder; İnvitrogen)



Şekil 3.31. Meke Ağustos ayı kültürlerinden Archaea DGGE jel görüntüsü



Şekil 3.32. Meke ve Acıgöl Ağustos ayı kültürlerinden Bacteria DGGE jel görüntüsü (M:Meke; A:Acıgöl)



Şekil 3.33. Meke Ağustos ayı kültürler için Archaea DGGE jelinden kesilen bantların re-PCR jel görüntüsü

Çizelge 3.8. Meke Ağustos ayı kültürler için DGGE jelinden elde edilen bantların dizi analiz sonuçları

Bant	Kullanılan Primer	Accession numarası	Gen Bankasındaki Karşılığı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen Nükleotit Miktarı
1	907r	JN216848.1	<i>Halorubrum sp.</i> YC-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95	436/458
2	907r	JF261335.1	Halobacteriaceae archaeon Ib23 16S ribosomal RNA gene, partial	%90	190/211
3	907r	JN216852.1	<i>Halorubrum sp.</i> YC-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94	439/466
4	907r	HQ425113.1	Archaeon RC35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94	472/505
5	907r	HQ425113.1	Archaeon RC35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%96	443/458
6	907r	HQ179134.1	<i>Halorubrum sp.</i> ETD2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95	485/506
7	907r	GQ181211.1	<i>Halorubrum sp.</i> L56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%96	494/512

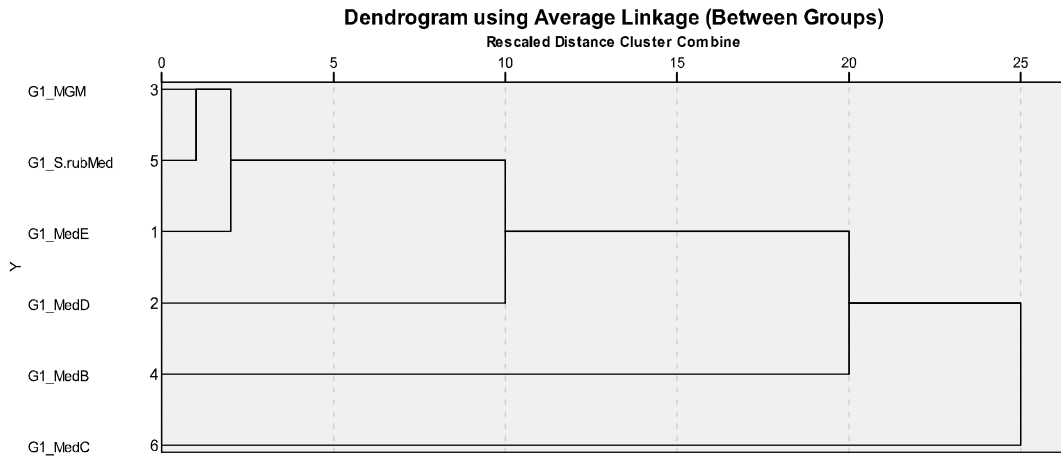
Çizelge 3.8. (Devamı) Meke Ağustos ayı kültürler için DGGE jelinden elde edilen bantların dizi analiz sonuçları

8	907r	DQ987878.1	<i>Halorubrum sp.</i> HEN2-25 16S ribosomal RNA	%94	405/428
9	907r	JN216854.1	<i>Halorubrum sp.</i> YC-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97	491/505
10	907r	DQ367241.2	<i>Haloterrigena limicola</i> strain AX-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%96	465/484
11	907r	DQ367241.2	<i>Haloterrigena limicola</i> strain AX-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97	494/505
12	907r	DQ367241.2	<i>Haloterrigena limicola</i> strain AX-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%96	491/509
13	907r	JN216863.1	<i>Halorubrum sp.</i> YC-X7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94	446/472
14	907r	DQ367241.2	<i>Haloterrigena limicola</i> strain AX-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94	452/480

Çizelgeden görüldüğü gibi Meke Archaea zenginleştirme DGGE verilerine göre ortamda *Halorubrum* ve *Haloterrigena* cinslerine ait strainler ile DGGE profilleri dizi analizleri sonuçları benzerlik göstermiştir.

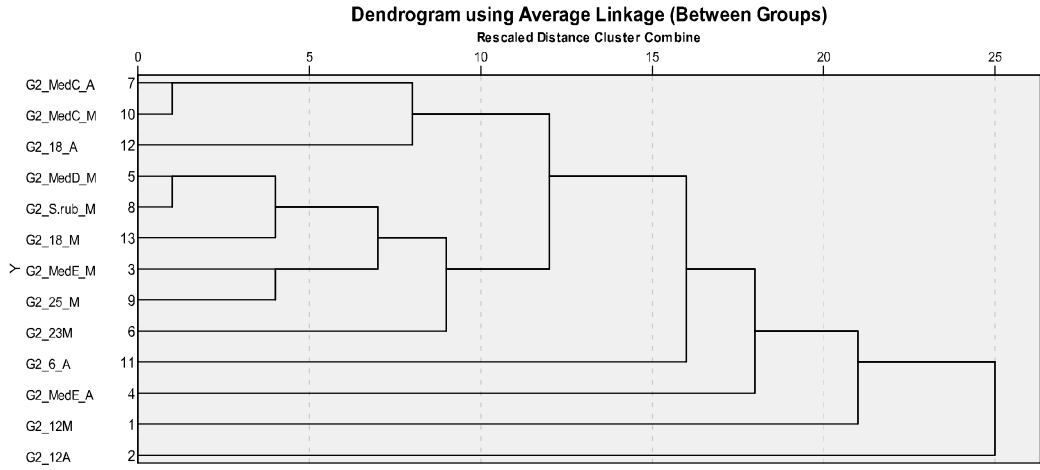
Zenginleştirme DGGE Jellerinden Benzerlik Dendogramlarının Oluşturulması

Zenginleştirme DGGE sonrası her örnek bir pattern oluşturmaktadır. Bu patternlerin kendi aralarında karşılaştırılması için bir matriks oluşturulmuştur. Oluşturulan bu matriks kullanılarak SPSS 19 istatistik programında jeldeki her örneğin birbirine göre benzerliğini yansıtan dendogramlar oluşturulmuştur. Bu dendogramlar Archaea (Şekil 3.34) ve Bacteria (Şekil 3.35) jellerinin her biri için ayrı ayrı oluşturulmuştur.



Şekil 3.34. Meke Ağustos ayı zenginleştirme kültürlerinden Archaea DGGE jelinden üretilmiş olan benzerlik dendogramı (3: %23 MGM, 5: *S.ruber* Medyum, 1: Medyum E, 2: Medyum D, 4: Medyum B, 6: Medyum C)

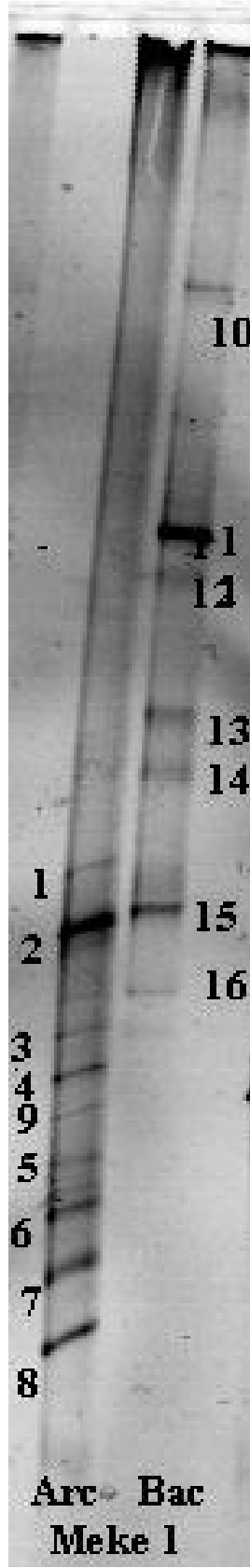
Yukarıdaki dendogramdan da anlaşıldığı gibi DGGE Archaea jelinde %23 MGM ve *S.ruber* medyum aynı profilleri oluşturması bakımından en benzerdir.



Şekil 3.35. Meke ve Acıgöl Ağustos ayı zenginleştirme kültürlerinden Bacteria DGGE jelinden üretilmiş olan benzerlik dendogramı (7 ve 10: Medyum C, 12 ve 13: %18 MGM, 5: Medyum D, 8: *S.ruber* Medyum, 3 ve 4: Medyum E, 9: %25 MGM, 6: %23 MGM, 11: %6 MGM, 1 ve 2: %12 MGM, A:Acıgöl, M: Meke Gölü)

Yukarıdaki dendogramdan da anlaşıldığı gibi DGGE Bacteria jelinde Acıgöl için Medyum C ve %18 MGM, Meke için Medyum C ve Medyum D aynı profilleri oluşturması bakımından en benzerdir.

Meke Ağustos (Şekil 3.36) ve Nisan (Şekil 3.37) ayı su örneklerinden izole edilen DNA'dan gerçekleştirilen PCR sonuçlarından DGGE işlemi sonrasında DGGE' den jel profilleri belirlenip, profilleri temsil eden bantlardan dizi analizi işlemi gerçekleştirilmiştir. Dizi analiz sonuçları Çizelge 3.9-3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.36. Meke Ağustos ayı Archaea ve Bacteria DGGE jel görüntüsü

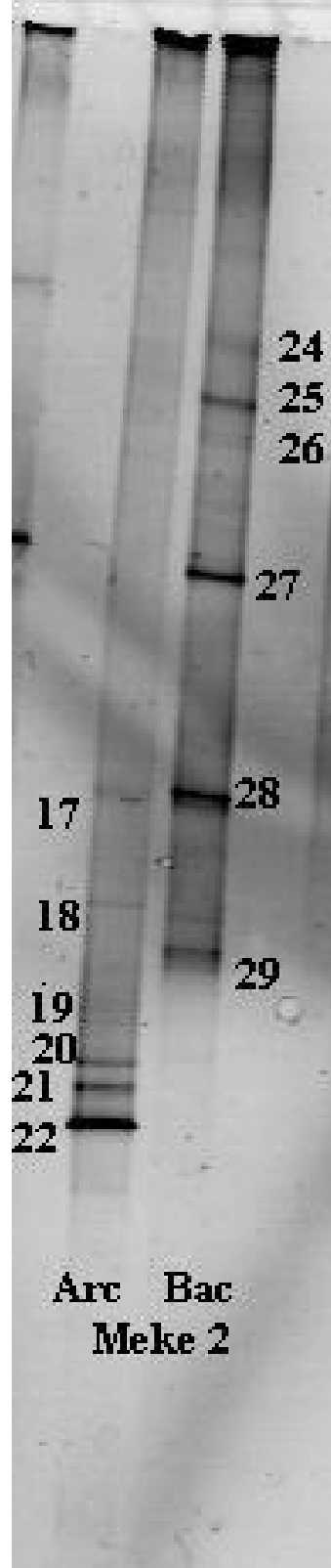
Çizelge 3.9. Meke Ağustos ayı DGGE jelinden elde edilen bantların dizi analiz sonuçları

Bant	Kullanılan Primer	Accession numarası	Gen Bankasındaki Karşılığı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen Nükleotit Miktarı
1	907r	HQ425092.1	Archaeon RC33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%83	90/108
2	907r	FJ648141.1	Uncultured haloarchaeon isolate DGGE gel band 17Ab13 16S ribosomal RNA gene, par	%77	272/351
3	907r	GQ452799.1	Uncultured archaeon clone 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%89	417/467
4	907r	FR870448.1	<i>Halorubrum tebenquichense</i> partial 16S rRNA gene, type strain CECT 5317T	%92	443/479
5	907r	HQ425141.1	Archaeon RC42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94	472/501
6	907r	HQ157607.1	Uncultured archaeon clone MLNAA5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%91	396/435

Çizelge 3.9. (Devamı) Meke Ağustos ayı DGGE jelinden elde edilen bantların dizi analiz sonuçları

7	907r	HQ425226.1	Uncultured archaeon isolate DGGE gel band RAD4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%90	346/382
8	907r	EF459703.1	Uncultured archaeon clone 3-07A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94	473/498
9	907r	HQ425237.1	Uncultured archaeon isolate DGGE gel band OAD6 16S ribosomal RNA gene, partial	%92	296/319
10	907r	AM981386.1	Uncultured <i>Salinibacter</i> sp. partial 16S rRNA, clone SFC1B021	%97	443/454
11	907r	AM981386.1	Uncultured <i>Salinibacter</i> sp. partial 16S rRNA, clone SFC1B021	%98	389/394
12	907r	FN393525.1	Uncultured <i>Salinibacter</i> sp. partial 16S rRNA gene, clone SFD1G041	%93	214/222
15	907r	HQ197982.1	<i>Salinibacter</i> sp. CB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%85	319/372

Çizelgeden anlaşılacağı gibi Meke Ağustos ayı Archaea jelinde kültüre edilememiş organizmalar ile *Halorubrum tebenquichense*, Bacteria jelinde kültüre edilememiş *Salinibacter* türleri ile *Salinibacter* sp. CB7 ile benzerlik gösteren bantların varlığı belirlenmiştir.



Şekil 3.37. Meke Nisan ayı Archaea ve Bacteria DGGE jel görüntüsü

Çizelge 3.10. Meke Nisan ayı DGGE jelinden elde edilen bantların dizi analiz sonuçları

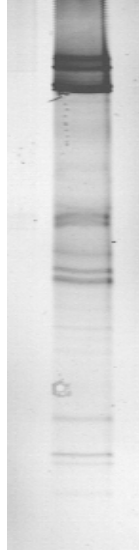
Bant	Kullanılan Primer	Accession numarası	Gen Bankasındaki Karşılığı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen Nükleotit Miktarı
17	907r	HQ157605.1	Uncultured archaeon clone MLNAA3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94	376/396
18	907r	HQ157605.1	Uncultured archaeon clone MLNAA3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95	454/473
19	907r	HQ157605.1	Uncultured archaeon clone MLNAA3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94	399/423
20	907r	HQ157607.1	Uncultured archaeon clone MLNAA5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94	324/342
21	907r	HQ157605.1	Uncultured archaeon clone MLNAA3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99	349/352
22	907r	HQ157605.1	Uncultured archaeon clone MLNAA3 16S ribosomal RNA	%96	364/376

Çizelge 3.10. (Devamı) Meke Nisan ayı DGGE jelinden elde edilen bantların dizi analiz sonuçları

25	907r	EU677279 1	Uncultured bacterium clone P9_LJL_0205_024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%91	301/329
27	907r	HM128280 1	Uncultured bacterium clone SINH815 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%82	170/207

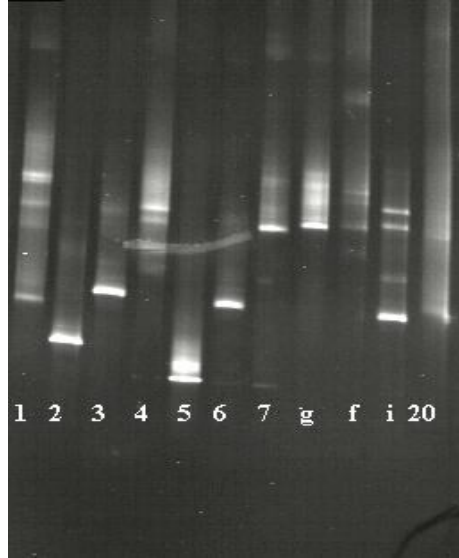
Çizelgeden anlaşılacağı gibi Meke Nisan ayı Archaea ve Bacteria jellerinde kültüre edilememiş organizmalar ile benzerlik gösteren bantların varlığı belirlenmiştir.

Acıgöl Ağustos örneğinden, DNA ekstraksiyonlarını takiben PCR ile elde edilen ürünlerin DGGE işlemi sonrasında elde edilen DGGE jel fotoğrafı Şekil 3.38'da gösterilmiştir.



Şekil 3.38. Acıgöl Ağustos ayı DGGE Bacteria jel görüntüsü

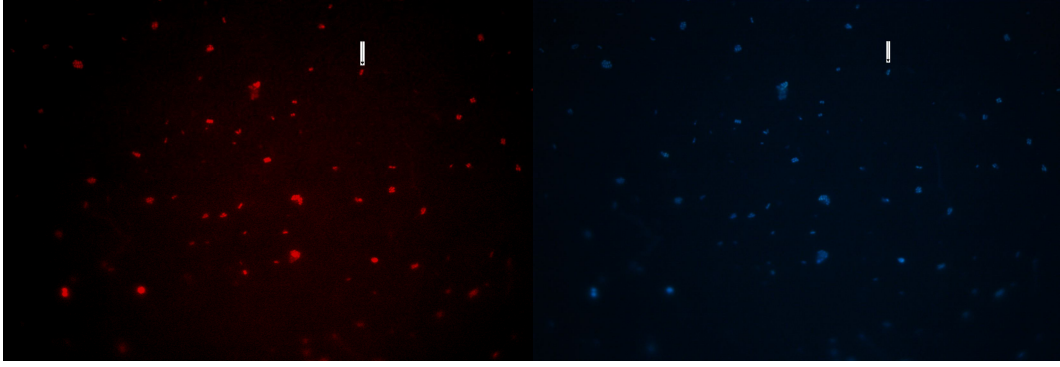
Acıgöl Ağustos ve Meke Nisan aylarında elde edilen Bacteria izolatlarından (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, g, f, i ve 20) gerçekleştirilen DGGE jel fotoğrafı Şekil 3.39’da gösterilmiştir.



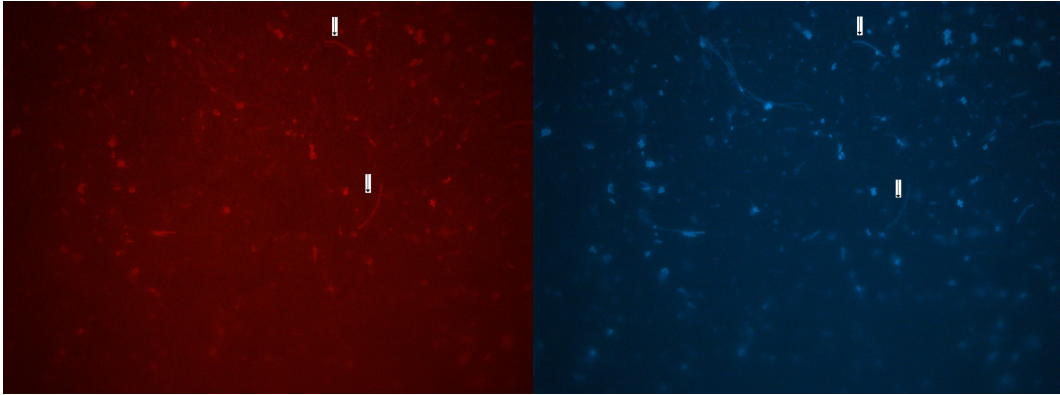
Şekil 3.39. Acıgöl Ağustos ve Meke Nisan ayında elde edilen Bacteria izolatlarından (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, g, f, i ve 20) elde edilen DGGE jel görüntüsü

3.6.5. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) Boyama

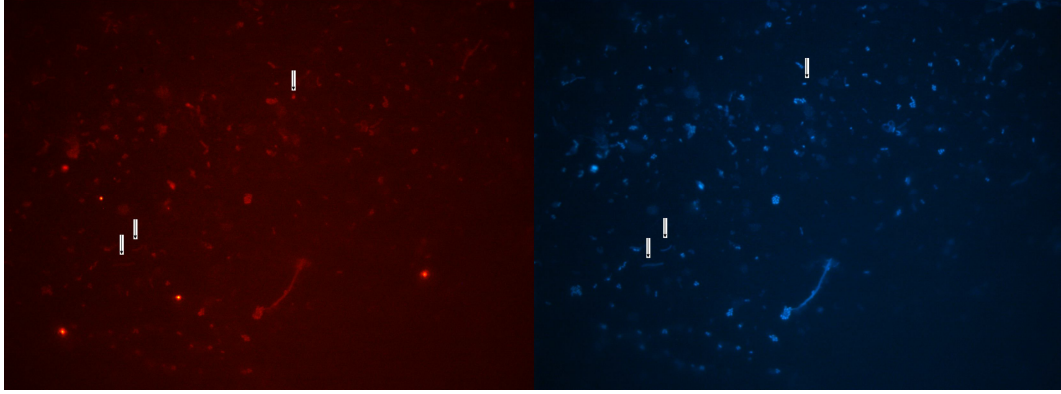
Meke ve Acıgöl Ağustos ve Nisan ayı örneklerine Bacteria sayımını gerçekleştirmek için Eub338, Archaea sayımını gerçekleştirmek için Arc344 ve Arc915 probları Meke Ağustos ayı örneğine ayrıca *Salinibacter* sayımı için Ehb412 probları uygulanmıştır. Su örneklerindeki toplam hücre sayısı ise DAPI boyası ile gerçekleştirilmiştir. Aşağıda bu problara ait floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir (Şekil 3.40-3.48).



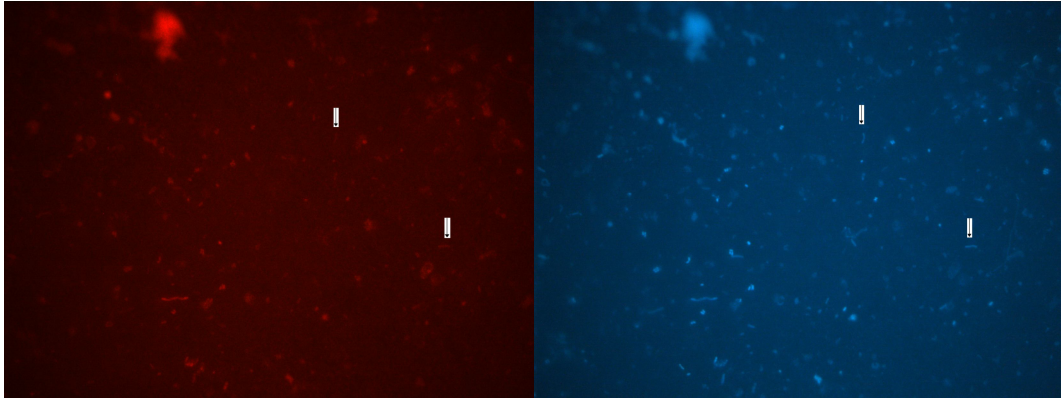
Şekil 3.40. Eub 338 probe ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Acıgöl Ağustos ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan diplokok şekilli Bacteria hücreleri)



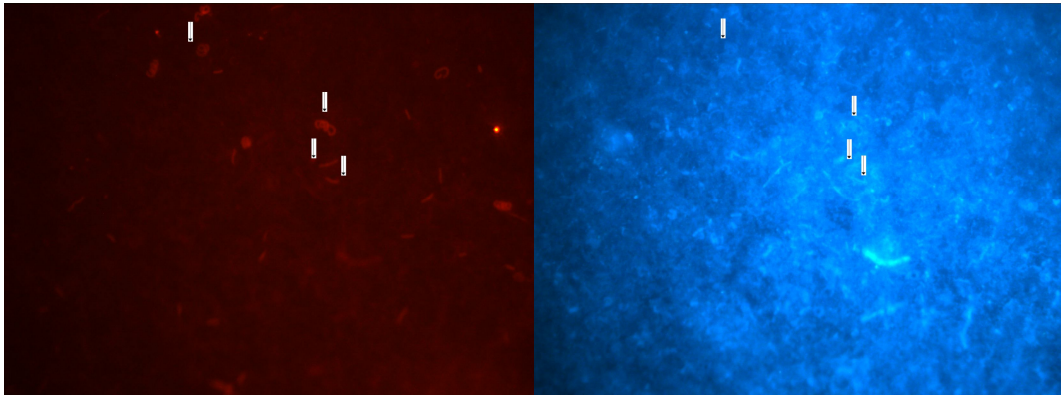
Şekil 3.41. Eub 338 probe ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Ağustos ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan uzun çubuk şekilli Bacteria hücreleri)



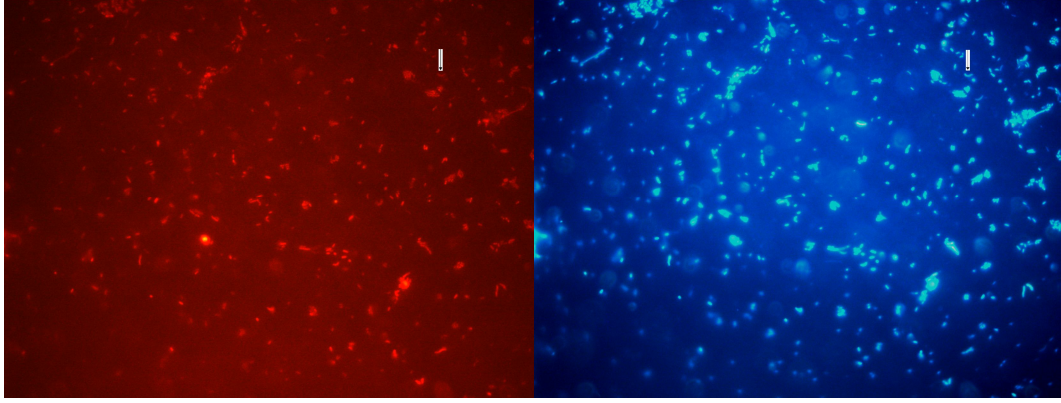
Şekil 3.42. Arc344 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Ağustos ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan basil ve disk şekilli Archaea hücreleri)



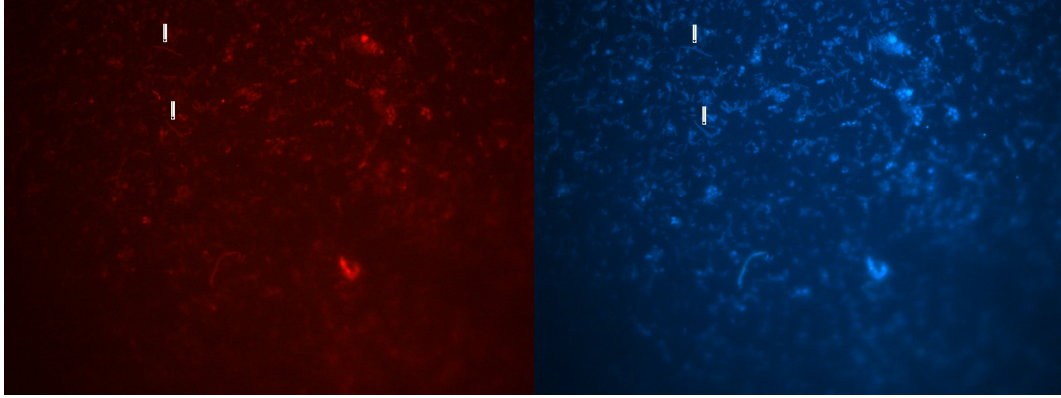
Şekil 3.43. Arc915 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Ağustos ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan basil şekilli Archaea hücreleri)



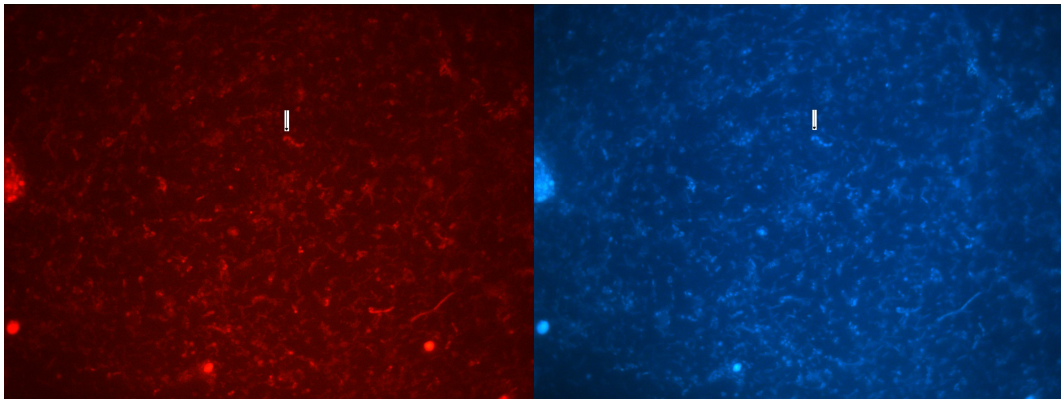
Şekil 3.44. Ehb412 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Ağustos ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan uzun basil şekilli Bacteria hücreleri)



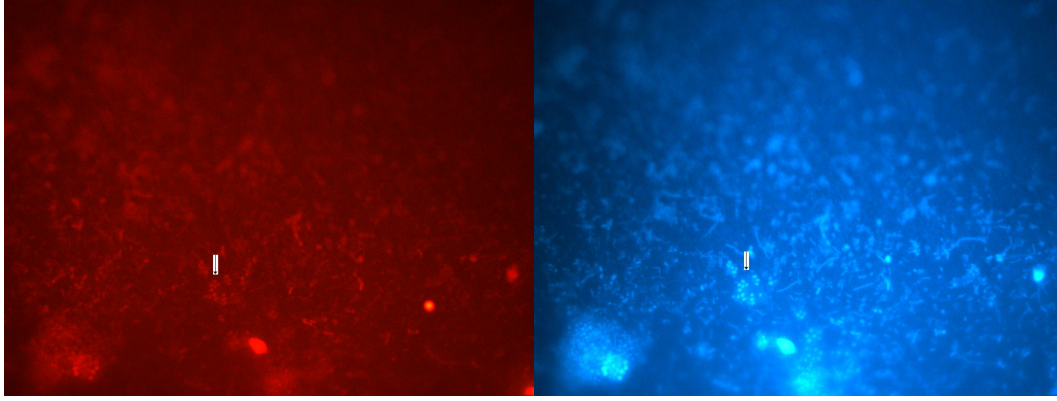
Şekil 3.45. Eub 338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Acıgöl Nisan ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan vibrio şekilli Bacteria hücreleri)



Şekil 3.46. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Nisan ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan uzun çubuk Bacteria hücreleri)



Şekil 3.47. Arc344 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Nisan ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan disk şekilli Archaea hücreleri)



Şekil 3.48. Arc915 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Meke Nisan ayı örneği (Ok ile işaretlenmiş olan disk şekilli Archaea hücreleri)

3.6.6. DOPE-FISH (Çift Taraflı İşaretli Prob Kullanılan Floresan in situ Hibridizasyon)

Almanya Münih Teknik Üniversite'sinde Meke Nisan ayı için gerçekleştirilen ve Eub338 ile Arc344 çift işaretli prob kullanımı sonucunda elde edilen floresan mikroskop görüntülerine göre halofilik organizmalar için elde edilen floresan ışına morfolojik tanımlamaya müsade etmemiştir. FISH'in amaçlarından biri olan kültüre edilemeyen organizmaların morfolojik tanımlamasının DOPE-FISH ile gerçekleştirilebilmesi için halofilik canlılar ile ilgili optimizasyonların gerekliliği tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Carl Woese'un 1977 yılında moleküler çalışmalarla ortaya koyduğu evrimsel yaşam ağacı tüm organizmaların evrimsel ilişkisini ortaya koymakla beraber canlılığın 3 domainini oluşturur. Woese'un çalışmaları doğrultusunda Bacteria ve Eukarya'dan farklı gen ve özelliklere sahip Archaea domaininin varlığı belirlenmiştir. Bu domain içerisinde yer alan organizmalar aşırı sıcak, aşırı soğuk, yüksek tuz, yüksek pH, düşük pH gibi ekstrem koşullara uyum sağlamış durumdadırlar.

Yaşam ağacında temsil edilen 3 domaine bakıldığında halofilik ve halotolerant prokaryotların temsilcilerinin varlığı görülmektedir. Bu temsilcilerden ekstrem tuz konsantrasyonuna en iyi uyum sağlayan organizmaları Archaea domaini içerisinde görmek mümkündür. Bu organizmalar tuz gölleri, tuzlalar ve tuzlanmış et, balık gibi ortamlarda yaşamlarını sürdürebilmektedir. Bu organizmalar çeşitli uyum mekanizmaları ile bu ortamlara uyum sağlamış durumdadırlar ve bu uyum mekanizmaları ile biyoteknolojik anlamda önem arz etmektedir.

Meke Gölü ve Acıgöl birçok doğal güzelliği barındırmasına rağmen bu göllerin mikrobiyolojisi ilgili olarak etkili bir çalışma yapılmamıştır. Yapılan çalışmalar bu göllerin floristik ya da faunistik zenginliğini belirlemeye yönelik olmuştur. Halbu ki bu iki gölde yüksek tuz oranına sahip olması nedeniyle halofilik organizmaları barındırdığı tahmin edilmiş ve bu organizmaları belirlemeye yönelik literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Meke Gölü'nün kuruma tehlikesi ile yüzyüze olması, Acıgöl'ün ise aynı şekilde su seviyesinin oldukça düşmesi bu göllerdeki prokaryotik çeşitliliğin belirlenmesi gerekliliğini göstermiştir.

Meke Gölü ve Acıgöl ile ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda daha çok bu alanların korunmasına, turizm açısından katkısına ve bu açıdan değerlendirilmesi gerekli yerler olduğuna dikkat çekilmiştir (Önder ve ark. 2004; Gürler ve ark. 2007). Biyolojik açıdan yapılmış çalışmalara baktığımızda Arthropoda Filumuna

ait organizmaların araştırılması ve bu bölgede yayılış gösteren kuşların belirlenmesine yönelik çalışmalarla karşılaşmaktayız (Özbek ve Ustaoglu, 2005; Kılıç 1999). Prokaryotik organizmalar üzerine bir çalışmaya ise rastlanmamıştır.

Çalışma kapsamında Acıgöl ve Meke Ağustos ayı örneklerinin pH değerleri sırasıyla 7.64, 7.04 iken % tuz değerleri %6.5 ve >%25 olarak belirlenmiştir. Nisan ayı Acıgöl ve Meke Gölü örneklerinin pH değerleri sırasıyla 8.4 ve 8.04 iken % tuz değerleri %6 ve %18'dir. Mevsimsel olarak elde edilen farklı tuz oranı ve pH değeri ilkbahar aylarında meydana gelen yağmur suları ile tuz konsantrasyonunun azalması ve yaz aylarında göllerde meydana gelen buharlaşmalar ile tuz konsantrasyonunun artması ile ilişkilendirilmektedir. Su örneklerinin içerdiği bazı elementlerin belirlenmesi yönelik yapılan analizde Acıgöl Ağustos ve Nisan ayı örneklerinde dominant elementin Na^+ olduğu, sonrasında ise Mg^{+2} ve K^+ 'un yoğun olduğu, Meke Gölü'nde ise dominant elementin Acıgöl'de olduğu gibi Na^+ olduğu, sonrasında ise Mg^{+2} ve K^+ 'un yoğun olduğu analiz sonrasında belirlenmiştir. Halofilik organizmalarla ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında özellikle Tuz Gölü ve Çamaltı Tuzlası ile ilgili çalışmaların varlığı dikkat çekmektedir (Çakıcı 2004; Mutlu 2006; Çetinkuş 2007; Dinigüzel 2007; Kahraman 2008). Çalışma alanlarından Meke Gölü ile benzer tuzluluk miktarına sahip olan göl Tuz Gölü'dür. Mutlu 2006'da gerçekleştirdiği çalışma ile Tuz Gölü'nün mevsimsel farklılıklarına bağlı olarak tuz oranının %20 ile %30 arasında değiştiğini, pH'ın ise 7.1-8.0 arasında değiştiğini göstermiştir. Çetinkuş (2007)' da yaptığı çalışma ile Çamaltı Tuzlasındaki farklı havuzlardaki tuz oranını %6-%30 arasında, pH'ın 7.3-8.5 arasında değiştiği sonucuna varmıştır. Kayseri Tuzla Gölü'nde elde edilen veriler ise gölün pH'ının 8.3 olduğunu göstermiştir (Hasdemir 2008).

Tuzcul ortamlardan Büyük Tuz Gölü'nün kuzey kısmı Meke Ağustos ayı tuz oranı ile benzer tuz oranına sahiptir. İsrail'deki Ölü Deniz'in tuz konsantrasyonu ise Meke Gölü'nün Nisan ayındaki tuzluluk oranı ile benzemektedir. Mısır'daki Wadi Natrun Gölü'nde sodyum ve potasyum'un dominant elementler olması yine çalışma alanlarımızda ki dominant elementlerle örtüşmektedir (Oren 2002a).

Çalışmamızda su örneklerindeki halofilik organizmaların izolasyonuna yönelik kullanılan besiyerlerinden çoğunlukla %12, %18 ve %23'lük MGM'lerde üremenin gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu besiyerlerinin içerisinde bulunan yüksek Na^+ ve Cl^- konsantrasyonuna ek olarak Mg^{+2} 'un yoğun olması Meke ve Acıgöl su örneklerinin elementel analiz verileri ile uyumaktadır.

Çalışma kapsamında halofilik arke ve bakterilerin izolasyonuna yönelik Meke ve Acıgöl'den farklı mevsimlerde alınan su örneklerinden elde edilen izolatların gram boyamaları sonucunda tüm izolatların gram negatif olduğu, hücre morfolojilerinin ise genel anlamda basil, spiral, kısa ve uzun çubuklar ile disk şeklinde olduğu gözlemlenmiştir. İzolatların koloni pigmentasyonları açık-koyu pembe, krem-beyaz-opak renklerinde olduğu tespit edilmiştir. Halofilik organizmaların genel özelliklerinden birisi olan Gram negatif boyanma özelliği tüm izolatlarımızda görülmüştür. Halofilik organizmalar canlılarda bugüne dek rastlanmamış kare, üçgen gibi morfolojik çeşitliliğe sahiptir. Tuz oranının yüksek olduğu ortamlarda kare şekilli arke hücrelerinin ve uzun çubuklar şeklinde bakteri hücrelerinin yoğun olduğu bilinmektedir. Çalışma alanlarımızda kare hücrelere rastlanmamakla birlikte, Meke örneklerinde uzun çubuk şekilli hücrelere rastlanmıştır. Bunların yanı sıra halofilik organizmalar pleomorfik yani düzensiz hücre şekilleri gösterebilmektedir. Meke izolatlarında bu şekilde düzensiz morfoloji gösteren hücrelere de rastlanmıştır. Çalışmamızda dominant hücre morfolojisinin çubuk şeklindeki hücrelerden oluştuğu belirlenmiştir. Tuz Gölü (Mutlu 2006), Çamaltı Tuzlası (Yavuztürk 2005) ve Kayseri Tuzla Gölü (Hasdemir 2008) ile ilgili çalışmalarda elde edilen izolatların çoğunluğunun da benzer olarak çomak şekilli hücrelerden oluştuğu belirlenmiştir. İzolatların pigmentasyon özellikleri incelendiğinde Acıgöl'e ait izolatlarda pembe-kırmızı renkli izolatlara rastlanmamıştır. Acıgöl'ün içerdiği tuz miktarı göz önüne alındığında burada daha çok ılımlı halofillerin varlığı beklenmektedir ve bunlar genellikle beyaz-opak-sarı renkli pigmentasyon gösterirler. Meke içerdiği yüksek tuz konsantrasyonu ile ekstrem halofilleri barındırmaktadır. İzolatların pigmentasyonunda pembe-kırmızı renkli kolonilerin görülmesi bu gerçeği doğrulamaktadır. Tuz Gölü (Mutlu 2006), Çamaltı Tuzlası (Yavuztürk 2005) ve

Kayseri Tuzla Gölü (Hasdemir 2008) ile ilgili çalışmalarda da koloni pigmentasyonlarının pembe-kırmızı olduğu kolonilere rastlanmıştır.

Çalışma alanlarında moleküler tanımlama için 16S rRNA analizleri gerçekleştirilmiştir. Ribozomal RNA'lar, onların mükemmel evrimsel markırlar olmasını sağlayacak özellikleri, oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın olan moleküller olması ve tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içermeleri ile moleküler tanımlamalarda yaygın bir kullanıma sahiptir (Madigan ve Martinko 2010). 16S rRNA'nın bu özelliklerine rağmen bazı handikapları mevcuttur. Türlerin genel olarak >%97 oranında benzer rRNA genlerine sahip olduğu kabul edilir fakat yakın ilişkili türler arasında 16S rRNA gen dizi analizleri genellikle düşük olabilmektedir ve bu da kesin tür tanımlama yapmak için DNA-DNA hibridizasyonu gerektirir. Başka bir problem ise strain veya türler arasındaki horizontal gen transferidir. Bu durum filogenetik amaçları için rRNA genlerinin kullanılabilirliğini sınırlandırır. Filogeni ve taksonomide rRNA geninin kullanımındaki bir diğer problem bireysel genomlarda inter-operon dizi değişkenliğinin varlığıdır. Çoğu türde, bireysel hücrelerin genomu çoklu RNA operonlar ya da aleller içerir. Görünüşte genomda 16S rRNA geninin farklı alelleri farklı allellik dizi gösterebilir. Örneğin *Haloarcula marismortui* %5'ten daha fazla dizi değişikliği içeren iki 16S rRNA geni içerir. Çoklu kopyalı genlerin alelleri arasındaki dizi farklılığı, dizileme gerçekleştirilirken dizilemede belirsizliğe yol açar. Çünkü çoğaltım karışımı farklı dizilerin alelleri içerir. Bu belirsizlik filogenetik analize engel olmaktadır (Vaneechoutte ve Heyndricks 2001).

16S rRNA analizine dayanan bir yöntem olan ARDRA hızlı bir tekniktir ve komünitelerdeki farklı türlerin varlığını belirlemek için kullanılabilir. ARDRA ile elde edilen profillerde tahmin problemi ortaya çıkabilmektedir. Bunun nedeni düşük kopya sayılı aleller restriksiyon bölgelerinde spesifik dizi farklılıklarına sahip olduklarından ek bantların oluşmasıdır (Vaneechoutte ve Heyndricks 2001). Çalışmamızda ARDRA birçok cins ve grupta türlerin ayrımının sağlanmasını hızlı bir şekilde gerçekleştirdiği için tercih edilmiştir.

ARDRA işlemi ile Acıgöl'den toplam 48 izolattan 4 farklı profil belirlenmiştir. Bu profilleri temsil eden strainlerin dizi analizlerinin gerçekleştirilmesi ile *Idiomarina sp. JL1018*, *Marinobacter adhaerens* HP15, *Halomonas ventosae strain whb36* ve *Thalassospira sp. H94* ile benzer oldukları tespit edilmiştir. Meke'den 142 Archaea izolatından 5 farklı profil, 61 Bacteria izolatından 8 farklı profil elde edilmiştir. Archaea'ya ait profilleri temsil eden strainlerin dizi analizi sonuçlarında *Halorubrum sp. YC-X4*, *Halorubrum sp. ETD2*, *Halorubrum sp. HEN2-25*, Bacteria'yaya ait profilleri temsil eden strainlerin dizi analizlerine göre ait *Salinibacter sp. CB7*, *Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus*, *Halomonas sp. S74-1*, *Halomonas ventosae strain XJSL7-5*, *Idiomarina sp. S87*, *Halomonas sp. TB216*, *Halomonas ventosae strain QHL5* ve *Marinobacter guineae* ile benzer oldukları belirlenmiştir.

Idiomarina cinsi Gammaproteobacteria sınıfında yer almakta ve bu cins 19 tür içermektedir. *Idiomarina* türleri genel anlamda tuzlu habitatlardan izole edilmekte ve gelişmek için geniş bir tuz aralığına sahip olması ile bilinmektedir (Gupta ve ark. 2011). *Idiomarina* cinsine ait ilk türler 2000 yılında Pasifik okyanusunun kuzeybatısından izole edilen *Idiomarina abyssalis* ve *Idiomarina zobellii*'dir. Pasifik okyanusunun tuzluluk oranı %3.4 olarak belirlenmiş ve izolasyonları *Idiomarina abyssalis* için %0.6-%15 NaCl içeren, *Idiomarina zobellii* için %1-%10 NaCl içeren besi ortamlarında gerçekleştirildiği belirtilmiştir (Ivanova ve ark.2000). Diğer bir *Idiomarina* türü olan *Idiomarina baltica* Baltık denizinden izole edilmiştir. Bu türün gelişimi için %0.8-%10 NaCl gerekli olduğu belirlenmiştir (Brettar ve ark. 2003). Baltık denizi ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda *Belliella baltica*, *Rheinheimera baltica* ve *Aquiflexum balticum* gibi türlerin varlığı belirlenmiştir. *Idiomarina sp. strain A28L* Hindistan'daki alkali bir göl olan Pangong Gölü'nden izole edilmiştir. İzolasyonu pH'ı 9.5 olan ve %1.5 NaCl içeren kültür ortamında gerçekleştirilmiştir (Gupta ve ark. 2011). *Idiomarina* ile yapılan çalışmalara bakıldığında deniz suyuna yakın tuzluluk oranına sahip sulardan izole edildiği görülmüştür. Acıgöl'den ve Meke'den elde edilen izolat, daha önce izole edilen türlerle benzer tuzluluk ortamından izole edilmiştir ve kültüre alınmasında yine benzer tuzlulukta besiyerleri kullanılmıştır.

Türkiye’de bu cinse ait türlerin varlığına rastlanmamış ve bu çalışma ile Türkiye’de varlığı ilk kez belirlenmiştir.

Marinobacter cinsi 1992 yılında tanımlanmasından itibaren 27 tür ile temsil edilmektedir. *Marinobacter adhaerens* HP15’in ilk kez 2004 yılında 16S rRNA gen dizisi ve 2010’da tüm genom dizisi belirlenmiştir. Bu tür Almanya’daki Wadden denizinden izole edilmiş halotolerant bir bakteridir (Gards ve ark. 2010). Wadden denizinde tuz konsantrasyonu değişiklik göstermektedir ve bu %3.5 NaCl’den %10 NaCl’e kadar çıkabilmektedir. Burada yapılan farklı çalışmalarda *Halobacillus halophilus* türüne de rastlanmıştır (Roebler ve Müller, 1998). Meke’den izolasyonu gerçekleştirilen *Marinobacter guineae* ilk kez 2008 yılında Antartik bölgesindeki Güney Shetland Adasında denizsel sedimentlerden izole edilmiştir. Bu türün geniş tuz, pH ve sıcaklık aralığında gelişebilme özelliği ile dikkat çekmektedir (Montes ve ark. 2008). Kızıl denizin tuzlu dip kısmından %15.2 NaCl kültür ortamında izole edilen *Marinobacter salsuginis*’in %1-20 arasındaki NaCl konsantrasyonunda gelişebildiği belirlenmiştir (Antunes ve ark. 2007). *Marinobacter*’in diğer izolasyonları da benzer olarak denizsel ortamlardan gerçekleştirilmiştir. Örneğin Kore’deki Sarı Deniz’den *Marinobacter salicampi* %6 NaCl içeren kültür ortamında izole edilmiş ve %1-16 NaCl’yi tolere edebildiği belirlenmiştir (Yoon ve ark. 2007). Başka bir deniz olan Doğu Çin denizinden *Marinobacter mobilis* ve *Marinobacter zhejiangensis* izolasyonu gerçekleştirilmiştir ve bu iki türün de %0.5-10 arasındaki NaCl’de yaşamlarını sürdürebildikleri belirlenmiştir (Hua ve ark. 2007). Türkiye’de *Marinobacter* cinsine ait bir türün varlığına dair bir çalışmaya rastlanmaması nedeniyle ülkemizde ilk kez varlığı bu çalışma ile belirlenmiştir.

Acıgöl ve Meke ile gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarında yoğun olarak *Halomonas* cinsine ait türlerin varlığı dikkat çekmektedir. Acıgöl’den 1 izolat, Meke’den ise 4 izolat 16S rRNA gen dizisi analizlerine göre *Halomonas* olarak belirlenmiştir. *Halomonas* cinsi üyeleri %3.5-20 NaCl konsantrasyonu, pH’ı 5-9.00 ve gelişme sıcaklığı 4-45°C gibi geniş aralıklı gelişme durumları göstermektedir (Vreeland ve ark. 1980). Bu durum bu cinse ait türlerin farklı tuz konsantrasyonu ve pH’ı içeren ortamlardan rahatlıkla izolasyonunu

gerçekleştirmeye izin vermektedir. Ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalarda Yavuztürk (2005) Çamaltı Tuzlası ile ilgili yaptığı çalışmada tuz toleransı yüksek olan (%3-25 NaCl) izolatının 16S rRNA gen dizisi verilerine göre *Halomonas salina* olduğunu belirlemiştir. Kayseri Tuzla Gölü'nden Hasdemir (2008)'in gerçekleştirdiği çalışma ile 10 izolatın morfolojik, fizyolojik ve bazı biyokimyasal özelliklerinin tanımlanması ile *Halomonas* cinsine ait olduklarını tespit etmiştir. *Halomonas* cinsi ilk kez 1980 yılında Hollanda'daki %10'dan daha fazla tuz içeren tuzlulardan izole edilmiştir (Vreeland ve ark. 1980). Acıgöl ve Meke Gölü'nden izole edilen türlerin *Halomonas ventosae*'e ait farklı strainler oldukları tespit edilmiştir. *Halomonas ventosae* ilk kez İspanya'daki tuzlu topraklardan izole edilmiştir. Geliştiği tuz aralığı olarak %3-%15 NaCl olarak belirlenmiştir (Martinez-Canovas ve ark. 2004). Çalışmamızda izole edilen *Halomonas* türlerinin ise %12-%18 tuz aralığında izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

Halomonas cinsine ait türler biyoteknolojik anlamda önem arz etmektedir. Ekzopolisakarit üretimi *Halomonas eurihalina* ve *H.maura* türlerinden elde edilmiştir. Bu türlerin patojeniteye sahip olmaması, kolay gelişmeleri, kolay elde edilebilir besin ihtiyaçlarına sahip olmaları ve yüksek tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerinde üremeleri nedeniyle kontaminasyon riskinin az olması gibi özellikleri ile biyoteknolojik olarak avantajlara sahiptir (Margesin ve Schinner 2001; Ventosa 2004). Polihidroksialkanotlar (PHA) hücre içinde biriktirilen bakterial depo bileşikleridir ve *Halomonas* türlerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Quillaguaman ve ark.2005). Ektoinler ve hidroksi ektoinler biyoteknolojik yollarla üretilebilir. Yeni bir biyoteknolojik proses olan 'bakterial milking' ekstrem halotolerant olan *Halomonas elongata*'dan bu iki bileşiğin üretimi için kullanılmıştır. Bu organizmanın ektoin ve hidroksi ektoin üretiminin ortamdaki tuzluluk ve sıcaklığa bağlı olarak değiştiği, salinite %15 üzerinde ve sıcaklık 25°C'in altında olduğu zaman sadece ektoin üretimi, daha yüksek tuz konsantrasyonunda ve daha yüksek sıcaklıkta hidroksi ektoin miktarında artış gözlemlendiği belirtilmiştir (Margesin ve Schinner 2001; Roberts 2005). Çalışmalarda göstermiştir ki *Halomonas* cinsi üyeleri biyoteknolojik çalışmalarda ön sıradadır. Acıgöl ve Meke'den elde edilen izolatların biyoteknolojik

potansiyellerinin belirlenmesine yönelik bu çalışmalar elde ettiğimiz izolatların önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

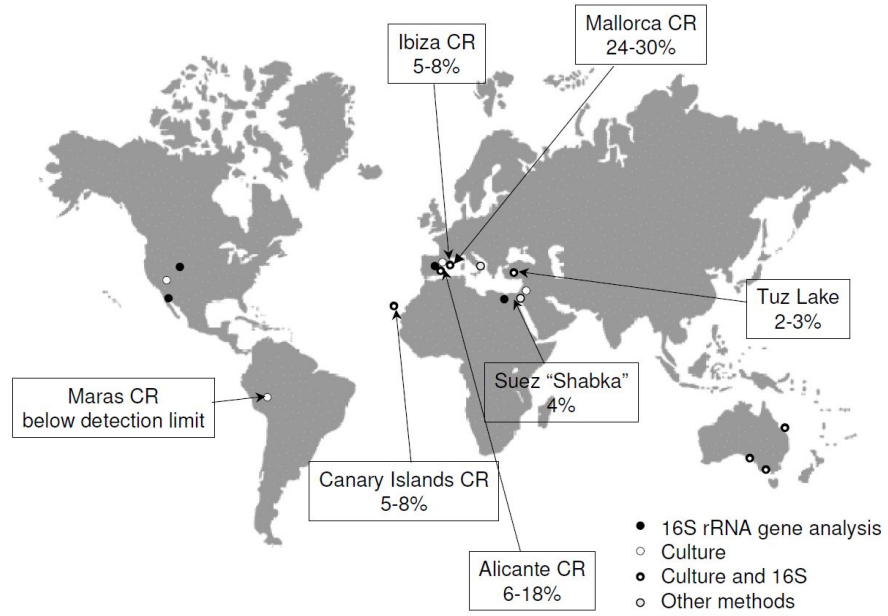
Acıgöl'den izole edilen organizmalardan elde edilen farklı profillerden biri de *Thalassospira sp.* H94'e benzerlik göstermektedir. İlk kez 2002 yılında tanımlanan cinse ait ilk tür ise *Thalassospira lucentensis*'dir. Bu tür İspanya'ya 21 mil uzaklıkta olan Akdeniz'den izole edilmiştir ve %1 ve %10 NaCl içeren ortamlarda gelişmektedir (Lopez-Lopez ve ark. 2002). Ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalarda bu cinse ait türlerin varlığına dair bir kayıt belirlenememiştir.

Meke Gölü izolatlarından bir başka profil ise *Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus*' a benzerlik göstermektedir. *Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus* 1995 yılında İtalya'nın Campania bölgesinden izole edilmiştir. Bu bölgenin ekstrem canlılar için uygun bir ortam olması hem alkali (pH.8.5) hemde tuzcul bir bölge olmasından ileri gelmektedir (Romano ve ark. 2005). Meke Gölü'nden izolasyonu gerçekleştirildiği esnada Meke'nin pH'mında 8.04 olduğu göz ardı edilmemelidir. *Salinivibrio* cinsine ait son tür olan *Salinivibrio sharmensis* Mısır'daki Ras Mohammed Park tuz gölünden izole edilmiştir. Bu gölün pH'mın 8 ve içerdiği klorid konsantrasyonunun 70 g/l olduğu ifade edilmiştir (Romano ve ark. 2011). Ülkemizde *Salinivibrio* cinsine ait bir türün varlığı henüz belirlenememiş olması nedeniyle ülkemiz prokaryotik çeşitliliğine bir tür daha kazandırılmıştır.

Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip tuz gölleri ve tuzlalarda baskın bakteri türünün *Salinibacter* cinsine ait olduğu bilinmektedir. Meke Ağustos ayı örneğinde de benzer olarak izole edilen tek bakteri türü *Salinibacter* cinsine aittir. Ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalardan Tuz Gölü'ne ait *Salinibacter* varlığı ilk kez Mutlu (2006) tarafından gösterilmiştir. Çetinkuş (2008)'un yaptığı FISH çalışması ile *Salinibacter*'in varlığı ilk kez Çamaltı Tuzlasında belirlenmiştir. Meke'den izole edilen *Salinibacter* türünün filogenetik olarak en yakın akrabasının İran'daki Aran-Bidgol tuz gölünden izole edilen *Salinibacter iranicus* olduğu belirlenmiştir. Bu göl Meke Gölü ile birçok ortak özellik göstermektedir. Göl İran çölünün ortasında yer almakta ve mevsimsel olarak yüksek tuz derişimi göstermektedir. Dominant tuzların Na^+ , Cl^- ve Mg^{+2} olması nedeniyle

thalassohaline olduğu bilinmektedir. Gölün pH'ı genel olarak 7 civarındadır. Sıcak mevsimlerde tuz doygunluğa erişmekte ve salinite yükselmektedir (Makhdoumi-Kakhki ve ark. 2011a).

1998 yılında *Salinibacter*'in keşfinden itibaren tüm dünyada *Salinibacter*'in temsilcilerinin varlığı belirlenmiştir (Şekil 4.1). Bu temsilcilerin ekstrem halofilik Archaea'lerle benzer özellik göstermeleri dikkat çekmektedir (Anton ve ark. 2008). Meke ile ilgili yapmış olduğumuz çalışmada da *Salinibacter*'in yüksek tuz konsantrasyonuna uyum sağlamış *Halorubrum* cinsine ait türlerle birlikte varlığını sürdürdüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Dünya'da yayılış gösteren *Salinibacter* cinsine ait türlerin dağılımı gösteren harita (Anton ve ark. 2008)

Meke ile ilgili gerçekleştirilen çalışmada 3 farklı *Halorubrum* türüne rastlanmıştır. *Halorubrum* cinsi üyeleri 3.5-4.5 M NaCl içeren ortamlarda gelişmeleri ile ekstrem halofil olarak bilinmektedir. Ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalarda Tuz Gölü'nde *Halorubrum xinjiangense*'nin varlığı 16S rRNA gen

analizine bağı olarak belirlenmiştir (Mutlu 2006). Özcan (2007) gerçekleştirdiği çalışma ile *Halorubrum lacusprofundi* (Konya Bolluk Gölü, Budur Salda Gölü) ve *Halorubrum xinjiangense* (Ankara Tuz Gölü, Konya Bolluk Gölü ve Kırşehir Seyfe Gölü) varlığını 16S rRNA benzerliğine göre belirlemiştir. Çankırı Çankaya tuz madeninden Yıldız (2008)' in yaptığı polar lipid analizi sonuçlarına göre *Halorubrum saccharovorum* DSM 1137 türü ile benzerlik göstermesiyle *Halorubrum* cinsine ait olduğu düşünülen bir izolatın varlığı belirlenmiştir.

Halorubrum cinsi tanımlanmış 25 tür içermektedir. Bu türler farklı tuz gölleri ve tuzlalardan izole edilmiştir. 2011 yılında gerçekleştirilen Tunus'daki Sfax tuzlasından izole edilen *Halorubrum sfaxense* ülkemiz Tuz Gölü'nden izole edilen *Halorubrum xinjiangense* ile yakın akraba olduğu belirlenmiş fakat DNA hibridizasyon çalışmaları ile yeni bir tür olduğu tespit edilmiştir (Trigui ve ark. 2011). Sfax tuzlasındaki tuz oranının %37.76 ve pH'nın 7.55 olması benzer tuz ve pH oranına sahip Meke Gölü'nden *Halorubrum* cinsine ait türlerin var olabileceğinin bir göstergesi durumundadır.

Meke gölü izolatlarından *Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus*, *Halomonas ventosae* strain XJSL7-5, *Idiomarina sp. S87-* ve *Halomonas sp. TB216* olarak 16S rRNA gen dizi analizlerine göre belirlenen izolatların %97'nin altında benzerlik göstermesi bu izolatların yeni bir tür olabileceğini düşünmemize neden olmuştur. Bu izolatların tuz ve sıcaklık isteklerinin aralığını belirlemeye yönelik gerçekleştirilen 2005 yılındaki bir çalışmada, *Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus*'un gelişmek için ihtiyaç duyduğu tuz aralığının %2-25, sıcaklığın ise 10°C ve 40°C arasında olduğu ifade edilmiştir (Romano ve ark. 2005). *Salinivibrio costicola subsp. alcaliphilus*' a benzerlik gösteren Meke izolatı ile gerçekleştirilen çalışmada %18 üzerindeki tuz konsantrasyonunda üremenin gerçekleşmediği belirlenmiştir. Ayrıca 42°C sıcaklıkta üremenin görüldüğü saptanmıştır. *Halomonas ventosae*'nin geliştiği tuz aralığının %3-15, sıcaklığın ise 15-50°C olduğu belirtilmiştir (Martinez-Canovas ve ark. 2004). *Halomonas ventosae*'ye benzerlik gösteren Meke izolatında ise %0-25 gibi geniş bir tuz konsantrasyonunda gelişme görülmüştür, fakat sıcaklık olarak *Halomonas ventosae* ile benzer özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakarak elde

edilen izolatların tuz ve sıcaklık isteklerinin en yakın akrabaları ile farklılık göstermesiyle bu izolatların yeni birer tür olabileceği şüphesini taşımaktayız.

Ülkemiz tuz gölleri ve tuzlalar bakımından zengin bir ülkedir ve bu bölgeleri araştırmaya yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiştir ve buralardan farklı cinslere ait türler izole edilmiştir ya da kültür bağımsız yöntemlerle varlıkları ortaya konmuş durumdadır. Bunlardan bazılarını belirtecek olursak Tuz Gölü'nde *Haloquadratum walsbyi*, *Halosimplex carlsbadense*, *Haloterrigena thermotolerans*, *Halanaerobacter lacunarum*, *Acinetobacter baumannii* ve *Cytophaga* sp. varlığı Mutlu (2006) tarafından bildirilmiştir. Çamaltı Tuzlasına yönelik çalışmalardan Yavuztürk (2005)'ün gerçekleştirdiği çalışmada *Halomonas salina* elde edilmiştir. Özcan (2007) yaptığı 16S rRNA gen dizi analizlerine göre Tuz Gölü, Seyfe Gölü, Salda Gölü, Bolluk Gölü, Acı Göl ve Tuzla Gölü'nden *Halorubrum*, *Natrinema*, *Haloarcula*, *Natronococcus*, *Natrialba*, *Haloferax*, *Haloterrigena*, *Halalkalicoccus* ve *Halomicrobium* cinslerine ait türleri belirlemiştir.

1993'te Muyzer ve arkadaşlarının tanımladığı genetik parmak izi tekniği olan DGGE mikrobiyal ekolojide etkin bir araç haline gelmiştir. PCR ürününü mikroorganizmaların kompleks topluluğundan genomik DNA ekstraksiyonu ile elde edilir ve spesifik primerler ile 16S rRNA gibi moleküler markırlar çoğaltılır. PCR ürünü DNA denatürantının linear gradientinde poliakrilamid jel içerisinde ayrılır. Farklı DNA molekülleri arasındaki dizi varyasyonu melting davranışını etkiler ve böylece farklı dizilere sahip moleküller jelde farklı noktalarda göç hareketini durdururlar (Muyzer 1999b).

DGGE tekniğinin en güçlü yanlarından biri jelden bantların kesilebilmesi ve ardından komünite üyelerinin filogenetik ilişkisini belirlemek için dizilenmesine olanak vermesidir. Ayrıca komünite profilleri bireysel bakterial popülasyonların varlığını belirlemek için grup spesifik proplar ile hibridize edilebilmektedir (Muyzer 1999b).

Tekniğin zayıf yönlerinden biri ise nispeten kısa DNA fragmentlerinin ayrımının gerçekleştirilebilmesidir. Başka bir kısıt ise daima farklı dizilerin ayrımı

gerçekleştirilememektedir. Çünkü DNA fragmentleri arasında benzer melting noktasına sahip diziler olabilmektedir. Ek olarak komünite kompleksitesini tayin ederken, primerlerin bozulmasıyla ya da heterodupleks moleküllerin varlığıyla oluşan çift bantlar bu tayini zorlaştırmaktadır (Muyzer 1999b).

Bu teknik komüniteyi profillendirmek, mikrobiyal komüniteler içerisindeki populasyon dinamiklerini çalışmak, karışık populasyonlarda farklı özellik taşıyan gen ekspresyonunu çalışmak, zenginleştirme kültürlerinin izlenmesinde, klon kütüphanelerini incelemek için ve rRNA operon mikro heterojenitelerini tanımlamak için kullanılmaktadır (Muyzer 1999b).

Çalışmamızda DGGE'nin amaçlarından olan komüniteyi profillendirmeye, zenginleştirme kültürlerini izlemeye ve rRNA operon mikroheterojenitelerini tanımlamaya yönelik uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

Zenginleştirme kültürlerini izlemeye yönelik olan çalışmamızda Acıgöl ve Meke'nin Ağustos ayı su örneklerinden Bacteria'ya yönelik DGGE gerçekleştirilmiştir. Örneklere ilişkin gerçekleştirilen DGGE'de kullanılan zenginleştirme ortamlarına göre belirlenen profil sayısı aşağıdaki çizelgede (Çizelge 4.1) gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre belli besi ortamlarında daha fazla organizmanın ürediğini, belli besi ortamlarında ise çok az ya da hiç organizma üremediğini görmekteyiz. Bu sonuçları örneklerin alındığı tuz derişimleri ile ilişkilendirmek doğru olacaktır.

Çizelge 4.1. Meke ve Acıgöl Bacteria zenginleştirme DGGE'sine göre farklı besi ortamlarında elde edilen bantların sayısı

Zenginleştirme Ortamı	Acıgöl	Meke (Elde edilen bant sayısı)
%6 MGM	4	-

Çizelge 4.1. (Devamı) Meke ve Acıgöl Bacteria zenginleştime DGGE'sine göre farklı besi ortamlarında elde edilen bantların sayısı

%12MGM	6	4
%18MGM	3	2
%23 MGM	-	1
%25 MGM	-	2
Medyum C	1	1
Medyum D	-	1
Medyum E	3	1
S.ruber Medyum	-	1

Gerçekleştirilen SPSS 19 istatistiksel analiz verilerine göre Meke Bacteria DGGE jeline göre medyum D ve *S.ruber* medyum benzer oranda ve benzer noktalarda bant oluşturmasının sonucu olarak organizmaların üremesi anlamında benzer özelliklere sahip olduğu, %12'lik MGM ve medyum C'nin ise organizma üremesi açısından en farklı olduğu belirlenmiştir. Medyum D ve *S.ruber* medyum'un içerdiği tuz oranları benzerken, medyum C ve %12'lik MGM tuz oranları farklıdır. Acıgöl Bacteria DGGE jelinden elde edilen SPSS 19 istatistiksel analiz verilerine göre medyum C ve %18 MGM'nin organizma üremesi açısından benzer olduğu, medyum C ve %12 MGM'nin ise organizma üremesi açısından en uzak olduğu belirlenmiştir. Bacteria için elde edilen bu veride besi ortamlarında tuz oranlarının birbirine yakın olması üreme farklılığı için bir ipucu vermezken, besi ortamlarına eklenen diğer bileşenlerin farklı oranda olması bu farklılığın nedeni olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Bacteria üremesi için en uygun besi ortamının hem Meke'de hem de Acıgöl'de en fazla bant oluşturması sebebiyle %12'lik MGM olduğu tespit edilmiştir.

Meke'nin Ağustos ayına yönelik gerçekleştirilen kültür işlemlerinde tek bakteri türü elde edilmiştir. Halbu ki %12 MGM ortamında 4 profil belirlenmiştir. Bu profil sayısının izole edilen türün 16S rRNA operon bölgesinin birden çok olmasına bağlayabiliriz fakat diğer zenginleştirme ortamlarında bu durumla karşılaşmamaktayız. Bu durumda kültüre alınamayan türlerin varlığını aklımıza getirmeli ve bu yönde çalışmalar gerçekleştirmeliyiz. Acıgöl zenginleştirme ortamlarında en fazla üremenin içerdiği tuz miktarına paralel olarak %6, %12, %18 ve Medyum E'de yoğun olduğunu görmekteyiz. Acıgöl örneğinden kültüre alma işlemleri sonucunda 3 bakteri türü izole edilmiştir. Bu türlerden 16S rRNA operon bölgesinin birden fazla olduğu bilinen türler mevcuttur. Bu yüzden DGGE'de elde edilen profiller ile bilinenler arasında doğru bir orantı mevcuttur.

Meke Ağustos ayı Archaea'ya yönelik zenginleştirme kültürlerini izlemeye yönelik gerçekleştirilen çalışmada en yoğun üreme Medyum C'de gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2). Meke Ağustos ayına yönelik kültüre alma işlemlerinde 3 tane izolat elde edilmiştir. DGGE'de elde edilen profillerin hepsinde 3'ten fazla bant elde edilmiştir. Meke'nin yüksek tuz konsantrasyonu göz önüne alındığında kültüre edilemeyen organizmaların var olma olasılığı yüksektir.

Çizelge 4.2. Meke Archaea zenginleştirme DGGE'sine göre farklı besi ortamlarında elde edilen bantların sayısı

Zenginleştirme Ortamı	Meke (Elde edilen bant sayısı)
%23 MGM	6
Medyum B	5
Medyum C	8

Çizelge 4.2. (Devamı) Meke Archaea zenginleştirme DGGE'sine göre farklı besi ortamlarında elde edilen bantların sayısı

Medyum D	4
Medyum E	6
<i>S.ruber</i> Medyum	5

Gerçekleştirilen SPSS 19 istatistik analizine göre %23'lük MGM ve *S.ruber* medyum'un en benzer profilleri oluşturduğu belirlenmiştir. İki besiyerinin içerdiği tuz miktarlarına bakıldığında benzer oldukları belirlenmiştir. Yine analize göre %23'lik MGM ve medyum E'nin DGGE jelinde aynı oranda bant verdiği belirlenmiş ve iki besi ortamında üreme gösteren organizmaların aynı noktalarda melting davranışlarını sonlandırdığı belirlenmiştir. Bu iki besi ortamına bakıldığında medyum E'nin %23'lük MGM'ye oranla daha az tuz içerdiği fakat farklı olarak kazamino asit ve nişasta varlığı dikkat çekmektedir.

Meke Ağustos ayı zenginleştirme kültürlerini izlemeye yönelik gerçekleştirilen DGGE'den elde edilen bantların dizi analizleri sonrasında %23'lük MGM'de *Halorubrum sp.* YC-3 ile %95 benzerlik gösteren bant, Medyum B'de *Halorubrum sp.* HEN2-25 ile %94 benzerlik gösteren bant, Medyum C'de *Halorubrum sp.* YC-X7 ile %94 benzerlik gösteren bant, Medyum D'de *Archaeon RC35* ile %96 benzerlik gösteren bant, Medyum E ve *S.ruber* medyum'da *Halorubrum sp.* YC-3 ile %95 benzerlik gösteren bant en dominant türler olarak göze çarpmaktadır. Elde ettiğimiz Archaea izolatlarının tümünün *Halorubrum* cinsine ait türler olması ve zenginleştirme kültür DGGE'sinde de dominant bantların *Halorubrum* cinsine ait türler olması ortamda en yoğun cinsin *Halorubrum* olduğu gerçeğini vurgulamaktadır. *Halorubrum* cinsi dışında Medyum C'den elde edilen bantlardan 4 tanesinin yüksek benzerlik oranı ile *Haloterrigena limicola strain AX-7*'ye ait olduğu belirlenmiştir. Aynı besiyerinde dominant türe bakıldığında yine *Halorubrum*'a ait olması ve *Haloterrigena*'ya ait

bantların daha zayıf olması izolasyon esnasında *Halorubrum*'un *Haloterrigena*'yı baskıladığı düşüncesine varılmaktadır. *Haloterrigena*'nın gözlemlendiği besi ortamı olan Medyum C NaCl, MgCl₂·6H₂O, K₂SO₄, CaCl₂·6H₂O ve maya özütü içermektedir. *Haloterrigena limicola* ilk olarak Çin'deki Aibi tuz gölündeki sedimentten izole edilmiştir. Bu izolatın geliştiği tuz aralığı 1.7-5.1 M NaCl, Mg⁺² 0.005-0.7M, pH'ı 6.5-9 ve sıcaklığı 30-61°C olarak belirlenmiştir. Optimum geliştiği NaCl konsantrasyonu 3.1 M, Mg⁺² konsantrasyonu 0.05M, pH'ı 7.0 ve sıcaklığı 45-50 °C olarak belirlenmiştir (Cui ve ark. 2006). Kullanılan besiyerleri ve içerikleri düşünüldüğünde Medyum C diğer besi ortamlarına göre daha basit bir içeriğe sahiptir. Diğer besi ortamları Medyum C'nin içeriğinde olan kimyasallara ek olarak birkaç kimyasal daha içermektedir. Ayrıca Medyum C'de elde edilen *Haloterrigena*'ya ait olan 4 profilin de tek bir tür ile filogenetik olarak benzerlik göstermesi bu türün 16S rRNA operon bölgesinin birden fazla olduğunun bir kanıtıdır.

Meke Ağustos ayı örneği DGGE jelinde Archaea ve Bacteria domainlerine ait dominant türlerin varlığı dikkat çekmektedir. Archaea jelinde elde edilen profillerin 16S rRNA gen dizilerinin belirlenmesinin ardından *Halorubrum* cinsinin yanı sıra kültüre alınamayan türlerin de dominant olarak ortamda var olduğu görülmektedir. Meke Ağustos ayı Archaea DGGE jelinde '2' olarak adlandırılan bantın ortamda en dominant organizma olduğu görülmektedir ve dizi analizi sonrasında benzerliğin %77 olarak kültür edilemeyen bir tür çıktığı belirlenmiştir. Bu bantın dizi analizlerinde benzerliğin bu kadar düşük olması burada birden fazla bantın olabileceğini aklımıza getirmektedir. DGGE'nin sınırlarından biri olan benzer melting davranışı gösteren dizilerin DGGE göçü esnasında yakın noktalarda durması ile birden fazla bantın tek bant gibi görülmesi DGGE'de olası bir durumdur. Bu olası durumu aşmak ve bantların gerçek temsilcilerini bulmak için denatürant oranı daha dar olan bir DGGE jeline aynı örneklerin yüklenmesi veya bantların klonlanması sağlanarak bu engel aşılmalıdır. Archaea jelinde diğer (6,7 ve 8) bantların dizi analizlerine bakıldığında üçünün de kültüre edilemeyen türlerle yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu türlerin tüm 16S rRNA dizisinin belirlenmesi için klonlama işleminin gerekliliği bir kez daha anlaşılmıştır.

Meke Ağustos ayı Bacteria jelinde Archaea jelinde olduğu yüksek bir çeşitlilik belirlenmemiştir. Bu belirleme kültür çalışmaları ile paralellik göstermektedir. Bacteria jelinde dominant olarak nitelendirilebilecek '11' numaralı bantın dizi analizi sonucunda %98 oranında kültüre alınmamış *Salinibacter sp.* olduğu belirlenmiştir. Diğer bantların da kültüre edilemeyen *Salinibacter'e* ait olduğu ve bir bantında da kültürel olarak izole ettiğimiz *Salinibacter* ile birebir örtüştüğü belirlenmiştir.

Meke Nisan ayı için gerçekleştirilen DGGE jelinde Archaea için elde edilen bantların tümü yüksek benzerlik oranı ile kültüre alınmamış archaeon clone MLNAA3 olarak belirlenmiştir. Halbu ki gerçekleştirilen izolasyonlar sonrasında elde edilen dizi analiz sonuçlarına göre ortamda *Halorubrum'un* varlığı belirlenmiştir. Yine aynı şekilde Bacteria jelinde izole ettiğimiz türlere ait bantları temsil eden türlere rastlanmamıştır. Bu durum DNA ekstraksiyonu aşamasında optimizasyon gerekliliğini göstermektedir.

Birbir ve ark. (2007) yılında Tuz Gölü, Kaldırım ve Kayacık tuzlarından gerçekleştirdiği DGGE ile elde ettiği verilerde ortamlarda *Haloarcula* cinsine ait üyelerin Tuz Gölü ve diğer tuzlalarda, *Halorubrum* cinsine ait üyelerin Tuz Gölü ve Kaldırım Tuzlasında ve *Halobacterium* cinsine ait üyelerin Tuz Gölü ve Kayacık Tuzlasında dominant olduklarını belirlemiştir.

Mutlu ve ark. (2008) yılında gerçekleştirdiği Tuz Gölü'ne ait farklı aylarda alınan su örneklerinden uyguladığı DGGE'de Archaea domainine ait dominant türlerin *Haloquadratum* ve *Halorubrum* cinsine ait olduklarını, Bacteria domaininde ise *Salinibacter* cinsine ait türlerin dominant olduğunu belirlemiştir.

Makhdoumi-Kakhki ve ark. (2011b) Aran-Bidgol Gölü'ne yönelik gerçekleştirdiği DGGE çalışmalarında dominant türlerin *Halorubrum* ve *Haloquadratum* cinslerine ait olduğunu ifade etmektedir. Bacteria domainine ait türlerin tamamı ise *Halorhodospira halophila*'ya aittir. Bu göle ilişkin gerçekleştirilen klonlama, DGGE ve izolasyon basamaklarının tümünde gözlemlenen türlerin *Halorubrum* cinsine ait oldukları belirtilmiştir.

Acıgöl Ağustos ayı örneğinden Bacteria için gerçekleştirilen DGGE’de 11 bant elde edilmiş ve bu bantların 3 tanesinin ortamda dominant türler olduğu belirlenmiştir. Bu dominant türlerin dizi analizlerini gerçekleştirmeye yönelik çalışmalar başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu durum dominant bantların birden fazla bant içerebileceği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Bu durumu aşmaya yönelik gerçekleştirilmesi gerekli çalışmalar Meke Ağustos ayı DGGE’si için önerilen uygulamalar ile benzerlik göstermektedir.

rRNA dizileri mikrobiyal evrim ve ekoloji çalışmalarında temel rol oynar. Filogenetik ilişkinin belirlenmesinde, çevresel çeşitliliğin belirlenmesinde ve spesifik popülasyonların belirlenmesinde oldukça önemlidir. rRNA’nın belirtilen uygulamalarda tek olmasının birkaç sebebi vardır. İlki tüm organizmalarda filogenetik ilişkinin karşılaştırılmasına izin veren evrensel dağılım göstermesi böylece yaşam ağacının oluşturulmasıdır. İkincisi rRNA’lar bilgisel genlerin kaynağıdır ve bunlar horizontal gen transferinden çok az etkilenir. Üçüncüsü rRNA’lar fonksiyonel olarak yüksek oranda korunmaktadır. Bu durumda PCR primerlerinin ve hibridizasyon problemlerinin dizaynına olanak verir. Bu ise 16S rRNA yaklaşımı kültüre edilememiş Bacteria ve Archaea’ların veritabanlarında artmasına neden olmaktadır. Tüm bu organizmalar çevrede dominant olarak görünmesine rağmen, onların dağılımı ve ilişkisi sadece klon kütüphanelerinden oluşturulabilir.

16S rRNA dizileri ile mikrobiyal ekoloji ve evrimin tahmini rRNA operonlarının birçok bakteride çoklu olması karışıklık yaratmaktadır. 16S, 23S ve 5S birbirlerine operonlar ile bağlıdır ve bu sıklıkla internal transkrip spacer bölgesi ve en azından bir tane tRNA içerir. Bu da gösterir ki bakteriyel bir genom 1-15 arası böyle operonları içerebilir ve bu da 16S rRNA dizilerini operonlar arasında birkaç yüzdellik olarak farklılaştırır. Böyle tek genom içerisindeki dizi heterojenitesi mikrobiyal komünitelerin kültür bağımsız çalışmalarında önemli problemler yaratır. Çünkü 16S rRNA yaklaşımına göre mikrobiyal çeşitlilik tahminin çok üzerinde olabilir.

Bacteria ve Archaea domainine ait türlerden elde edilen genom dizilerine göre elde edilen verilerde 355 bakteri straininin %44’ü bir veya iki operon

kopyası, %14'ü 4 tane, %13.5'u 7 tane, %11.5'u 6, % 6.7'si 3 ve %4.3'ü 10 tane operon içermektedir. Bacteria'dan farklı olarak arkeal strainler daha az rRNA operonu içerir. 23 strainden %65.2'si tek operon kopyası içerirken, sadece *Methanococcus vannielii*'nin 4 rRNA operon kopyasına sahip olduğu belirlenmiştir (Acinas ve ark. 2003).

DGGE'de rRNA operon mikro heterojenitelerini belirlemek için kullanılan izolatların tümü Bacteria domainine aittir. Bunlardan '1' olarak adlandırılan izolat *Salinivibrio* cinsine aittir ve belirgin 3 tane bant oluşturmuştur. *Salinivibrio* cinsine ait bit türün tüm genomu belirlenmediği için gerçekten 3 tane operon kopyasına sahip olup olmadığını bilememekle birlikte aynı familyaya ait *Vibrio cholerae*'nin 3 tane 16S rRNA operon bölgesine sahip olduğu belirlenmiştir (Acinas ve ark. 2003). DGGE jelinde '2', '3', '5', '6' ve 'i' olarak adlandırılan izolatların *Halomonas* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Bu türlere ait DGGE bant sayısı ise sırasıyla 1, 1, 1, 1 ve 4'tür. Tüm genom dizisi belirlenmiş olan *Halomonas elongata*'nın 4 tane 16S rRNA operon bölgesi içerdiği belirlenmiştir (Schwibbert ve ark. 2011). Bu da gösteriyor ki 'i' olarak belirlenen izolatımız bu durumu doğrulamakta fakat buna rağmen *Halomonas* cinsi içerisinde operon bölgesi sayısında değişiklikler olabilmektedir. '4' ve 'g' olarak isimlendirilen izolatlarımız *Idiomarina* cinsine aittir ve sırasıyla 2 ve 1 tane bant oluşturmuşlardır. Genom dizileri tamamlanmış *Idiomarina loihiensis* ve *Idiomarina sp. Strain A28L*'den elde edilen verilere göre iki türünde 4 tane 16S rRNA gen bölgesine sahip olduğu belirlenmiştir (Gupta ve ark. 2011; Hou ve ark. 2004). Jel görüntüsüne göre '7' ve 'f' olarak adlandırılan izolatların *Marinobacter* cinsine ait oldukları ve sırasıyla 1 ve 3 tane 16S rRNA operon bölgesine sahip oldukları belirlenmiştir. 'f' olarak adlandırılan izolatın *Marinobacter adhaerens* HP15 ile yüksek benzerlik göstermesi ve genom dizisi tamamlanmış olan *Marinobacter adhaerens* HP15 gibi 3 tane 16S rRNA operon bölgesi içermesi (Gards ve ark 2010) gerçekleştirdiğimiz çalışmaların doğruluğunu kanıtlar niteliktedir. '20' olarak adlandırılan *Thalassospira* cinsine ait izolattan DGGE jelinde 2 tane bant elde edilmiştir. Fakat bu cinse ait genom dizisi tamamlanmış tür bulunamadığından karşılaştırılması yapılamamıştır.

Birçok bakteri ve mikroorganizmanın morfolojik ayrıntılarının bilinmemesindeki eksiklik onların identifikasyonlarını zorlaştırıyordu. Geleneksel metodlar zahmetli, zaman gerektirici ve metodolojik ve istatistiksel hatalara meyilli olmaktadır. Bu yüzden ekosistemlerdeki mikroorganizmaları saymak ve tanımlamak için kültürasyondan kaçınılarak moleküler metodlar geliştirilmiştir. Bu metodlardan biri de FISH'dir ki bu metod bakteriyel ribozomlardaki spesifik bölgelere uyumlu sentetik oligonükleotid problemlerin hibridizasyonuna dayanır (Bottari ve ark .2006).

FISH'de gerçekleşen problemler hatalı pozitif sonuç ve hatalı negatif sonuçlar olarak ikiye ayrılabilir. Hatalı pozitif sonuç alma problemindeki en önemlisi otofloresan özellikteki örneklerin incelenmesinde karşılaşılmaktadır. Maya ve küflerde, siyanobakterilerde, metanogenleri içeren Archaea gruplarında bu problemle karşılaşılmaktadır. Otofloresan sadece örnekten değil, örneği çevreleyen ortamdan da gelebilir. FISH'de karşılaşılan bir diğer problem ise spesifikite eksikliğidir. FISH'in doğruluğu ve güvenilirliği oligonükleotid problemlerin spesifikitesi ile yakından ilişkilidir ve bunların dikkatli bir dizaynı gerekir. Hatalı negatif sonuç almada ise yetersiz penetrasyon, düşük rRNA içeriği, fluoroformun yıkımı olarak sıralanabilir. Bakteriyel hücrelerin probu yetersiz penetre etmesi düşük sinyal yoğunluğu verebilir. Bu problem gram negatif bakterilerde yoğun olarak karşılaşılmazken, kalın hücre duvarlı gram pozitif bakterilerde bu problem ile karşılaşılmaktadır. Canlılarda düşük rRNA içeriği direk olarak büyüme oranı ile ilişkilidir. Düşük fizyolojik aktivite düşük sinyal yoğunluğu ile negatif sonuç doğurabilir. Yavaş gelişen türler için Cy3 gibi parlak floresan ışık yayan problemler tavsiye edilir. Birçok fluorokrom, eksitasyon ilerlerken hızlı bir şekilde yok olur ve bu fotomikrografide önemlidir. Bu problemi çözmek için dar bantlı filtre setleri kullanması ve fotostable siyanin boya kullanılması önerilmektedir (Moter ve Göbel 2000).

FISH'in ilk uygulanması daha az çeşitlilik içeren bakteriyel simbiyot ortamlarda olmuştur. Daha sonraki yıllarda ise birçok uygulama alanında kendini göstermiştir. Denizsel çevrelerde sülfat redükleyen bakterilerin, bakterioplanktonların araştırılmasında, nehir sistemlerindeki bakterilerin

araştırılmasında, atık su arıtım çevrelerindeki nitrojen döngüsünde rol oynayan nitrit oksitleyen ve amonyum oksitleyen bakterilerin araştırılmasında, simbiyotik bakterilerin belirlenmesinde FISH kullanılmıştır (Amann ve ark. 2001).

Acıgöl için gerçekleştirilen FISH'de Arc344 ve Arc915'ten sinyal alınamamıştır. Eub338 probu ile neredeyse DAPI kadar hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Daha önceki moleküler çalışmalarla da örtüştüğü üzere Acıgöl'de Archaea domainine ait tür belirlenmemiştir.

Meke Ağustos ve Nisan aylarında da hem Archaea hem de Bacteria problemleri ile ışığa alınmıştır. Meke Ağustos ayının tuzluluk oranının Nisan ayına göre fazla olması sebebiyle Archaea problemleri ile elde edilen ışığa Bacteria'ya nazaran daha fazladır. Ayrıca Ağustos ayına yönelik olarak *Salinibacter* spesifik prob olan Ehb412 kullanılarak ortamdaki *Salinibacter* cinsine ait türlerin varlığı belirlenmiştir.

Ülkemiz Tuz Gölü (Mutlu 2006)'ne yönelik gerçekleştirilen FISH analizinde Arc915 ve Eub338 problemleri kullanılmış ve Archaea domaini üyelerinin Bacteria domaini üyelerinden yoğun olduğu belirtilmiştir.

Makhdoumi-Kakhki ve ark. (2011b) Aran-Bidgol Gölü'ne yönelik FISH çalışmalarında Arc915 ve Eub 338 problemleri kullanılmış ve Archaea üyelerinin daha yoğun olduğunu belirlenmiştir.

Sonuç olarak;

1. Meke Gölü'ne yönelik kültür bağımsız çalışmalardan DGGE ile elde edilen verilerde bu gölde kültüre edilemeyen Archaea ve Bacteria türlerinin varlığı belirlenmiştir.
2. Acıgöl'den ve Meke'den izole edilen *Idiomarina* ve *Marinobacter* cinsleri ile Acıgöl'den izole edilen *Thalassospira* ve Meke'den izole edilen *Salinivibrio* cinslerine ait türler ülkemizde ilk kez belirlenmiştir. Ayrıca Meke ve Acıgöl'e yönelik belirlenen tüm türler bu göller için ilk kez tanımlanmıştır.

3. Zenginleştirme kültürlerinden elde edilen DGGE verilerine göre kullanılan besiyerlerinden Archaea izolasyonu için en fazla çeşitlilik Medyum C'de belirlenmiştir. Fakat gerçekleştirilen dizi analizleri sonucunda 7 banttın 4 tanesinin *Haloterrigena limicola strain AX-7*'ya ait olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *Halorubrum*'a ait birden fazla strainin elde edilmesi kültür çalışmaları ile paralel bir durum ortaya çıkarmaktadır. Meke Gölü'nden Bacteria için gerçekleştirilen zenginleştirme DGGE jelinde en fazla bantı %12'lik MGM'den, Acıgöl Bacteria için ise yine %12'lik MGM'den elde edilmiştir.
4. 16S rRNA geninin operon kopya sayısının bakteri izolatlarında belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen DGGE ile genom dizisi veritabanlarında olan izolatlarımızın 16S rRNA operon sayısının karşılaştırılmasıyla elde edilen veriler pozitif bir korelasyon göstermektedir.
5. FISH sonuçlarından elde edilen verilere göre Meke Ağustos ayında yoğun olarak Archaea domainine ait türler mevcuttur. Meke Nisan ayı örneği ise nispeten Ağustos ayına göre daha az yoğunlukta Archaeae içermektedir. Acıgöl'ün her iki ayından elde edilen verilerde Archaea domainine spesifik problemlerle gerçekleştirilen FISH'de ışımamıştır.
6. Halofilik organizmaların biyoteknolojik çalışmalarında yoğun olarak çalışılan ve biyoteknolojik anlamda önemli türleri barındıran *Halomonas* cinsine ait türleri hem Acıgöl'den hem de Meke'den izole etmiş bulunmaktayız. Bu türlerin biyoteknolojik potansiyellerinin araştırılmasına yönelik yeni çalışmalar ile gerçekleştirdiğimiz çalışma desteklenebilir.

Çalışmamız için gelecekte yapılması önerilen uygulamalar;

1. Ülkemizin mikrobiyal çeşitliliğinin ortaya çıkarılması adına 16S rRNA dizi analizleri tamamlanamayan izolatların dizi analizleri sonuçlandırılmalıdır. Bu

sonuçlar ve eldeki mevcut 16S rRNA sonuçları doğrultusunda yeni tür olabileceği düşünülen izolatların tür tayini için DNA-DNA hibridizasyonu çalışmalarına hız verilmelidir.

2. DGGE analizleri göstermiştir ki çalışma ortamlarında kültüre edilemeyen organizmalar mevcuttur. Bu organizmaların 16S rRNA dizilerinin belirlenebilmesi için klonlama çalışmaları gerçekleştirilmelidir.

3. Çalışma kapsamında elde edilen izolatların biyoteknolojik çalışmalarda kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu doğrultuda elde edilen izolatlardan biyoteknolojik uygulamalara yönelik çalışmalar tasarlanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, M. ve Polz, M. F. (2004), “Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons,” *Journal of Bacteriology.*, 186(9): 2629–2635.
- Akköz, C., Yılmaz, B. ve Kalıpçı, E. (2009), “Trophic Level Determination of Acı Lake, Meke Lake and Suğla Lake,” *World Journal of Fish and Marine Sciences.*, 1(3): 243-247.
- Altınsaçlı, S. ve Mezquita, F. (2008), “Ostracod fauna of salt Lake Acıgol (Acı Tuz) (Turkey),” *Journal of Natural History.*, 42: 1013-1025.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. Ve Lipman, D. J. (1997), “Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs,” *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402.
- Amann, R. 1., Ludwig, W. ve Schleifer, K. H. (1995), “Phylogenetic identification of individual microbial cells without cultivation,” *Microbiol. Rev.*, 59: 143-169.
- Amann, R. ve Y Ludwig, W. (2000), “Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology,” *FEMS Microbiology Reviews.*, 24:555-565.
- Amann, R., Fuchs, B. M. ve Behrens, S. (2001), “The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation,” *Current Opinion in Microbiolog.*, 12: 231–236.
- Anonim (2011a), Halofilik Archaea’ların Taksonomisi, www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Halobacteriaceae.
- Anonim (2011b), Halofilik Bacteria’ların Taksonomisi, www.bacterio.cict.fr/.

- Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F. ve Amann, R. (1999), “Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds,” *Environ. Microbiol.*, 1:517-523.
- Anton, J., Pena, A., Santos, F., Martinez-Garcia, M., Schmitt-Kopplin, P. Ve Mora, R. R. (2008), “Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*,” *Saline Systems.*, 4:15.
- Antunes, A., França, J., Rainey, F. A., Huber, R., Nobre, M. F., Edwards, K. J. Ve Costa, M. S. (2007), “*Marinobacter salsuginis* sp. nov., isolated from the brine–seawater interface of the Shaban Deep, Red Sea,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 57: 1035–1040.
- Benlloch, S., Lopez-Lopez, A., Casamayor, E. O., Ovreas, L., Goddard, V., Daae, F. L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedros:Alio, C. ve Rodriguez-Valera, F. (2002), “Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern,” *Environ. Microbiol.*, 4: 349-360.
- Bentor, Y. K. (1961), “Some geochemical aspects of the Dead Sea and the question of its age,” *Geochimica et Cosmochimica Acta.*, 25: 239-240.
- Birbir, M., Ogan, A., Cali, B. ve 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., Çallı, B., Mertoğlu, B., Bardavid, E. R., Oren, A, Ogmen, N. M. ve Ogan, A. (2007), “Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns,” *World J Microbiol Biotechnol.*, 23: 309–316

- Bolhuis, H., Poele, E. M., Rodriquez–Valera F., (2004), “Isolation and cultivation of Walsby’s square archaeon,” *Environ. Microbiol.*, 6(12): 1287-1291.
- Bottari, B., Ercolini, D. ve Gatti, M. (2006), “Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects,” *Appl Microbial Biotechnol.*, 73: 485-494.
- Brettar, I., Christen, R. ve Höfle, M. G. (2003), “*Idiomarina baltica sp. nov.*, a marine bacterium with a high optimum growth temperature isolated from surface water of the central Baltic Sea,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 53: 407–413.
- Cifuentes, A., Anton, J., Benloch, S., Donnelly, A., Herbert, R. A. ve Rodriguez-Valera, F. (2000), “Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1715-1719.
- Cui, H., Tohty, D., Zhou, P. Ve Liu, S. (2006), “*Haloterrigena longa sp. nov.* and *Haloterrigena limicola sp. nov.*, extremely halophilic archaea isolated from a salt lake,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 56: 1837–1840.
- Çakıcı, Ö. (2004), *Biochemical and Genetic Characterization of Halobacterium salinarium Strain Isolated From Tuz Lake in Central Anatolia*, Yüksek Lisans Tezi, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of The Middle East Technical University, Ankara.
- Çakmar, E. (2005), *Farklı Ortamlardan Ayırımı Yapılan Aşırı Halofilik Bakterilerin Protein Profilleri ve Bu Bakterilerin Selüloz Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Çetinkuş, K. (2007), *Halofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.

- Dinigüzel, Ö. (2007), *Türkiye'den PHB Üreticisi Halofilik Bakterilerin İzolasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Dyall-Smith, M. (2004), *Halohandbook*, [www. microbiol.unimelb.edu.au / staff/mds/ HaloHandbook](http://www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook)
- Dwarkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. ve Stackebrandt, E. (2001), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identifications, applications*, Springer-Verlag, New York.
- Gards, A., Kaepfel, E., Shehzad, A., Seebah, S., Teeling, H., Yarza, P., Glöckner, O., Grossart, H. P. ve Ullrich, M. S. (2010), “Complete genome sequence of *Marinobacter adhaeren* stype strain (HP15), a diatom - interacting marinemicroorganism,” *Standards in Genomic Sciences.*, 3: 97-107.
- Gerday, C. ve Glansdorff, N. (2007), *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*, ASM, Washington, USA.
- Göçmez, G., Eren, Y., Aydın, Y. Ve Söğüt, A. R. (2000), “Karapınar Çevresinde Yeni Oluşan Obruk,” Karapınar Sempozyumu (Ed: Küçükdağ, Y.), Konya, 305-316.
- Gunde-Cimerman, N., Oren, A. ve Plemenitas, A. (2005), *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya*, Volume 9, Springer, Netherlands.
- Gupta, H. K., Singhi, A. ve Sharma, R. (2011), “Genome Sequence of *Idiomarina* sp. A28L, Isolated from Pangong Lake, India,” *J. Bacteriol.*, 193(20): 5875.
- Gürler, G. ve Timur, E., “Jeoparkların Koruma Kullanım Yöntemlerinin Belirlenmesi; Karapınar Potansiyel Jeopark Alanı İçin Bir Değerlendirme, Türkiye,” *Proceedings of The Second International*

Symposium on Development Within Geoparks-Environmental Protection and Education., Lushan-Jiangxi Province-China, 2007.

Hasdemir, A. (2008), *Kayseri Tuzla Gölü'nden Halofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Teşhisi*, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.

Hou, S., Saw, J. H., Lee, K. S., Freitas, T. A., Belisle, C., Kawarabayasi, Y., Donachie, S. P., Pikina, A., Galperin, M. Y., Koonin, E. V., Makarova, K. S., Omelchenko, M. V., Sorokin, A., Wolf, Y. I., Li, Q. X., Keum, Y. S., Campbell, S., Aizawa, S. I., Shibata, S., Malahoff, A. ve Alam, M. (2004), "Genome sequence of the deep-sea γ -proteobacterium *Idiomarina loihiensis* reveals amino acid fermentation as a source of carbon and energy," *PNAS.*, 101(52): 18036-18041.

Humayoun, S. B., Bano, N. ve Hollibaugh, J. T. (2003), "Depth Distribution of Microbial Diversity in Mono Lake, a Meromictic Soda Lake in California," *Appl and Env Mic.*, 1030-1042.

Huo, Y., Wang, C., Yang, J., Wu, M. ve Xu, X. (2008), "*Marinobacter mobilis* sp. nov. and *Marinobacter zhejiangensis* sp. nov., halophilic bacteria isolated from the East China Sea," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 58: 2885-2889.

Ivanova, E. P., Romanenko, L. A., Chun, J., Matte, M. H., Matte, G. R., Mikhailov, V. V., Svateshev, V. I., Hoq, A., Mangel, A. ve Colwell, R. R. (2000), "*Idiomarina gen. nov.*, comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov.," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 50: 901-907.

Kahraman, Ö. (2008), *Halofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Biyoteknolojik Öneme Sahip Ekstraselüler Enzimlerin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- Karaaslan, Ş. (2010), “Environmental Problems and Solution Suggestions for Meke Crater Lake,” Bolwois, Ohrid, Republic of Macedonia.
- Kerkar, S. (2004), “Ecology of Hypersaline Microorganisms. Marine Microbiology,” 37-47.
- Kılıç, A. (1999), “Karapınar (Konya) Yöresinin Kuşları,” *Tr. J. of Zoology.*, 23.(Ek Sayı 1): 91-97.
- Koru, E, (2004), “Çamaltı Tuzlası (İzmir, Türkiye) Ekosisteminde Artemia ve Önemi,” *E.Ü Su Ürünleri Dergisi.*, 21: 187-189.
- Levsky, J.M ve Singer, R. H. (2003), “Fluorescence in situ hybridization: past,present and future,” *Journal of Cell Science.*, 116: 2833-2838
- Litchfield, C. D. (2011), “Potential for industrial products from halophilic Archaea,” *J Ind Microbial Biotechnol.*, DOI 10.1007/s10295-011-1021-9.
- Lopes-Lopez, A., Pujalte, M. J., Benlloch, S., Mata-Roig, M., Rosello-Mora, R., Garay, E. ve Rodriquez-Valera, Francisco. (2002), “*Thalassospira lucentensis* gen. nov., sp. nov., a new marine member of the a-Proteobacteria,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 52: 1277–1283
- Madigan, M. T. ve Martinko, J. M. (2010), *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, (Çeviri Editörü, Çökmüş C), Palme, Ankara.
- Makhdoumi-Kakhhi, A., Amoozegar, M. A. ve Ventosa, A. (2011a), “*Salinibacter iranicus* sp. nov. and *Salinibacter luteus* sp. nov., isolated from a salt lake, and emended descriptions of the genus *Salinibacter* and *Salinibacter ruber*,” *IJSEM Papers in Press.*, doi:10.1099/ij.s.0.031971-0.
- Makhdoumi-Kakhki, A., Amoozegar, M. A., Kazemi, B., Pasic, L. ve Ventosa, A. (2011b), “Prokaryotic Diversity in Aran-Bidgol Salt Lake, the Largest

Hypersaline Playa in Iran,” *IJSEM Papers in Pres.*, doi:10.1264/jsme2.ME11267.

Margesin, R. ve Schinner, F. (2001), “Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology,” *Extremophiles.*, 5: 73-83.

Martinez-Canovas, M. J., Quesada, E., Llamas, I. ve Bejar, V. (2004). “*Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide producing bacterium,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 54: 733–737.

Martinez-Murcia, A., Acinas, S. G. ve Rodriguez-Valera, F. (1995), “Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17:247-255.

Montes, M. J., Bozal, N. ve Mercade, E. (2008), “*Marinobacter guineae* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from an Antarctic environment,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 58: 1346–1349.

Moter, A. ve Göbel, B. U. (2000), “Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms,” *Journal of Microbiological Methods.*, 41: 85-112.

Mutlu, M. B. (2006), *Tuz Gölü Bakterilerinin Karakterizasyonu ve Mevsimsel Dağılımı*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Mutlu, M. B., Martinez-Garcia, Manuel., Santos, F., Pena, A., Güven, K. ve Anton J. (2008), “Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey,” *FEMS Microbiol Ecol.*, 65: 474–483.

Muyzer, G., de Waal, E. C. ve Vitterlinden, A. G. (1993), “Profiling in complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified gene s coding for 16S rRNA,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 695-700.

- Muyzer, G. Hottentrager, S., Teske, A. ve Wawer, C. (1996), “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rDNA-A New Molecular Approach to Analyse the Genetic Diversity of Microbia Communities,” *Mol. Microb. Ecol. Manual.*, 3.4.4.:1-23.
- Muyzer, G. Ve Smalla, K. (1998), “Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology,” *Antonie van Leeuwenhoek.*, 73: 127-141.
- Muyzer, G. (1999a), “DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems,” *Current Opinion in Microbiology.*, 2: 317-322.
- Muyzer, G. (1999b), “Genetic fingerprinting of microbial communities-present status and future perspectives,” *Methods of Microbial Analysis.* 8.International Symposium on Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Nogales, B., Moore, E. R., Abrham, W. R. ve Timmis, K.N. (1999), “Identification of the metabolically active members of a bacterial community in apolychlorinated biphenylpolluted moorland soil,” *Environ. Microbiol.*, 1:199-212.
- Oren, A., Ventosa, A and Grant, W.D. (1997), “Proposed minimal standarts for description of new taxa in the order Halobacteriales,” *Int. J. Of Syst. Bacteriol.*, 47(1) : 233-238.
- Oren, A. (1999), “Microbiological studies in the Dead Sea: future challenges toward the understanding of life at the limit of salt concentrations,” *Hydrobiologia.*, 405: 1-9.
- Oren, A. ve Litchfield C.D. (1999), “A procedure for the enrichment and isolation of Halobacterium,” *FEMS Microbiology Letters.*, 173: 353-358.
- Oren, A. (2002a), *Halophilic microorganism and their environments*, Kluwer Academic Publishers, Boston, London, Dordrecht.

- Oren, A. (2002b), “Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications,” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.*, 28: 56–63.
- Oren, A. (2008), “Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity,” *Saline Systems.*, 4:2.
- Önder, S. ve Polat, T. A. (2004), “Konya İli Karapınar İlçesi’nin Ekoturizm Yönünden Görsel Kalite Değerlendirmesi ve SWOT Analizi,” *S.Ü Ziraat Fak. Der.*, 18 (33): 80–86.
- Özbek, M. ve Ustaoglu, R. M. (2005), “Göller Bölgesi İçsularının Malacostraca (Crustacea-Arthropoda) Faunasının Taksonomik Açısından İncelenmesi,” *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi.*, 22(3-4): 357–362.
- Quillaguaman, J., Hashim, S., Bento, F., Mattiasson, B. ve Hatti-Kaul, R. (2005), “Poly(b-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate,” *Journal of Applied Microbiology.*, 99: 151–157.
- Rainey, A. F. ve Oren, A. (2006), *Extromophiles Methods in Microbiology*, Elsevier, Spain.
- Roebler, M. ve Müler, V. (1998), “Quantitative and Physiological Analyses of Chloride Dependence of Growth of *Halobacillus halophilus*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(10): 3813- 3817.
- Roberts, M. F. (2005), “Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms,” *Saline Systems.*, 1: 5 doi: 10.1186/1746-1448-1-5.
- Romano, I., Gambocorta, A., Lama, L., Nicolaus, B. ve Giordano, A. (2005), “*Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* subsp. nov., a haloalkaliphilic aerobe from Campania Region (Italy),” *Systematic and Applied Microbiology.*, 28:34–42.
- Romano, I., Orlando, P., Gambocorta, A., Nicolaus, B., Dipasquale, L., Pascual, J., Giordano, A. ve Lama, L. (2011). “*Salinivibrio sharmensis* sp. nov.,

a novel haloalkaliphilic bacterium from a saline lake in Ras Mohammed Park (Egypt),” *Extremophiles.*, 15:213–220.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanchez-Porro, C., Mellado, E. ve Ventosa, A. (2003), “Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes,” *Journal of Applied Microbiology.*, 94: 295-300.

Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, I., Heidrich, G., Lentzen, G., Seitz, H., Rampp, M., Schuster, S. C., Klenk, H., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D. Ve Kunte, J. H. (2011), “A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581,” *Environmental Microbiology.*, 13(8): 1973–1994.

Seckbach, J. (1999), *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.

Stoecker, K., Dorninger, C., Daims, H. ve Wagner, M. (2010), “Double Labeling of Oligonucleotide Probes for Fluorescence In Situ Hybridization (DOPE-FISH) Improves Signal Intensity and Increases rRNA Accessibility,” *Applied and Environmental Microbiology.*, 76(3): 922-926.

Torreblanca, M., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A, Kamekura, M. ve Kates, M. (1986), “Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov.,” *System. Appl. Microbiol.*, 8: 89-99.

Trigui, H., Masmoudi, S., Brochier-Armaner, V., Maalej, S. ve Dukan, S. (2011), “Characterization of *Halorubrum sfaxense* sp. nov., a New Halophilic Archaeon Isolated from the Solar Saltern of Sfax in Tunisia,” *International Journal of Microbiology.*, 2011: 1-8.

- Vanechoutte, M. ve Heyndricks, M. (2001), *Application and Analysis of ARDRA Patterns in Bacterial Identification, Taxonomy and Phylogeny*. Elsevier. P: 211-247 [doi:10.1016/B978-044450740-2/50010-1](https://doi.org/10.1016/B978-044450740-2/50010-1).
- Ventosa, A., Marquez, M. C., Garabito, M.J. ve Arahall, D.R. (1998), “Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments,” *Extremophiles*, 2: 297-304.
- Ventosa, A. (2004), *Halophilic Microorganisms*, Springer, Berlin, Germany.
- Vreeland, R. H., Litchfield, C. D. ve Martin, E. L. (1980), “*Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria,” *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30: 485-495.
- Wagner, M., Horn, M. ve Daims, H. (2003), “Fluorescence in situ hybridization for the identification and characterisation of prokaryotes,” *Current Opinion in Microbiology*, 6:302–309.
- Yavuztürk, B. (2005), *Ekstremofillerin Ülkemiz Çamaltı Tuzlasından İzole Edilmesi ve Tanınması*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Yıldız, E. (2008), *Çankırı Çankaya Tuz Madeninden Halofilik Arkelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya.
- Yoon, J. H., Lee, M. H., Kang, S. J. Ve Oh, T. K. (2007), “*Marinobacter salicampi* sp. nov., isolated from a marine solar saltern in Korea,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2102–2105.