

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL VE ENDÜSTRİYEL MİKROBİYOLOJİ BİLİM DALI**

**AYVALIK TUZLASI (BALIKESİR)’NDAN HALOFİLİK
BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK ENZİM
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mevlüt Mert YILMAZ

**Danışman
Prof. Dr. Mustafa OSKAY**



MANİSA-2019

**Mevlüt Mert
YILMAZ**

**AYVALIK TUZLASI (BALIKESİR)'NDAN HALOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU
VE BİYOTEKNOLOJİK ENZİM PORTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

2019

TEZ ONAYI

Mevlüt Mert YILMAZ tarafından hazırlanan “Ayvalık Tuzlası (Balıkesir)’ndan Halofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Biyoteknolojik Enzim Potansiyellerinin Araştırılması” adlı tez çalışması 28/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak savunulmuş ve ~~oyçokluğu~~ / oybirliği ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof. Dr. Mustafa OSKAY
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. A. Üsâme TAMER
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. İhsan YAŞA
Ege Üniversitesi



TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Mevlüt Mert YILMAZ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİL DİZİNİ	ix
TABLO DİZİNİ	x
TEŞEKKÜR	xi
ÖZET	xii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Halofilik Mikroorganizmaların Tarihçesi	4
2.2. Halofiller	4
2.2.1. Halofilik Arkelerin ve Bakterilerin Genomikleri, Evrimi ve Taksonomisi	5
2.2.2. Halofilik Virüsler	6
2.2.3. Halofilik Küf ve Mayalar	7
2.2.4. Halofilik Bakteriler ve Arkealar	8
2.3. Halofillerin Tuzlu Ortamlara Adaptasyonları	9
2.3.1. Selüler Adaptasyon	10
2.3.2. Yüksek Tuz Konsantrasyonunda Strateji	10
2.3.3. Düşük Tuz Konsantrasyonunda, Organik Çözünende Strateji	11
2.3.4. Enzim Adaptasyonu	12
2.4. Halofillerin Endüstriyel Uygulamaları	13
2.4.1. Gıda Uygulamaları	14
2.4.2. Çevre Uygulamaları	14
2.4.2.1. Hidrokarbon Degredasyonu	15
2.4.2.2. Tabaklama Sanayi	16
2.4.2.3. Tekstil Endüstrisi	16
2.4.3. Biyoyakıt Üretimi	16
2.4.4. Sağlık Uygulamaları	17
2.4.4.1. Biyoplastikler	17
2.4.5. Halofillerdeki Enzimler	18
2.4.5.1. Amilazlar	22
2.4.5.2. Proteazlar	24

2.4.5.3. Lipazlar ve Esterazlar	25
2.4.6. Özel Ürünler	26
2.4.6.1. Retinal Proteinler	27
2.4.6.2. Uyumlu Çözünenler	28
2.6.6.3. Halosinler ve Mikrohalosinler	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. MATERYAL	30
3.1.1. Çalışma Alanı, Ayvalık Tuzlası	30
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasallar	30
3.2. YÖNTEM	38
3.2.1. Tuzladan Su Örneklemelerinin Alınması	38
3.2.1.1. Tuzlu Su Örneklerinin Bazı Fiziko-Kimyasal Parametrelerinin Belirlenmesi	38
3.2.1.2. Tuzlu Su Örneklerinin İyon ve Metal Analizlerinin Yapılması	38
3.2.2. Halofilik Bakteri İzolasyonu ve Sayımı	38
3.2.3. Halofil Bakterilerin Ekstraselüler Enzim Potansiyellerinin Belirlenmesi	39
3.2.3.1. Katı Ortamda Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	39
3.2.3.2. Sıvı Ortamda Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	40
3.2.3.2.1. Fermentasyon Çalışmaları ile Enzim Üretimi	40
3.2.3.3. Enzim Aktivitesi Analizleri (Analitik Ölçümler)	40
3.2.3.4. Sıcaklık ve pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi	41
3.2.4. Seçilen Halofilik Bakterilerin Tanımlanması	41
3.2.4.1. Morfolojik ve Kültürel Testler	41
3.2.4.2. Moleküler Sistemik Çalışmaları	42
3.2.4.2.1. DNA İzolasyonu İçin Halofilik Bakterilerden Hücre Pelletinin Elde Edilmesi	42
3.2.4.2.2. Halofilik Bakterilerin Genomik DNA'larının İzolasyonu	42
3.2.4.2.2.1. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi	43
3.2.4.2.3. 16S rRNA Geninin PCR Amplifikasyonu	44
3.2.4.2.4. 16S rRNA Gen Dizi Verilerinin Analizi, Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması ve Filogenetik Dendogramlarının Oluşturulması	45
4. BULGULAR	46
4.1. Tuzlu Su Örneklerinin Alınması ve İstasyonlar	46
4.1.1. Tuzlu Su Örneklerinin Bazı Fiziko-Kimyasal Parametreleri	47

4.1.2. Tuzlu Su Örneklerinin İyon ve Metal Analiz Sonuçları	48
4.2. Halofilik Bakteri İzolasyonu ve Sayım Sonuçları	49
4.3. Halofil Bakterilerin Ekstraselüler Enzim Potansiyelleri	52
4.3.1. Katı Ortamda Enzim Aktivitesi	52
4.3.2. Sıvı Ortamda Enzim Aktivitesi	59
4.3.2.1. Fermentasyon Çalışmaları ile Enzim Üretimi	59
4.3.2.1.1. Sıcaklık ve pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi	61
4.4. Seçilen Halofilik Bakterilerin Tanımlanması	63
4.4.1. Morfolojik ve Kültürel Testler	63
4.4.2. Moleküler Sistemik Çalışmalar	67
4.4.2.1. DNA İzolasyonu, DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi	67
4.4.2.2. 16S rRNA Geninin PCR Amplifikasyonu	68
4.4.2.3. 16S rRNA Gen Dizi Verilerinin Analizi, Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması ve Filogenetik Dendogramın Oluşması	68
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	78
7. KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µm	Mikrometre
pH	Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması
ssp.	Subspecies (alt tür)
mL	Mililitre
gr	Gram
L	Gram/litre
g/mL	Gram/mililitre
rpm	Dakikada dönüş hızı (round per minute)
%	Yüzde
°C	Santigrad derece
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
DNaz	Deoksiribonükleaz
µL	Mikrolitre
OD	Optik densite
DNS	Di-nitrosalisilik asit
UV	Ultraviyole
EPS	Ekzopolisakkarit

ŞEKİL DİZİNİ	Sayfa
Şekil 2.1. Küçük Alt Ünite rRNA Gen Dizisilerine Dayanan Evrensel Filogenetik Yaşam Ağacı	9
Şekil 2.2. Halofillerin Hipersalin Çevrelere Adaptasyonları	10
Şekil 2.3. Haloarkea Bakteriyorodopsinin İki Boyutlu Zar Yapısı	27
Şekil 2.4. Halofiller Salin Ortamların Olumsuz Etkilerine Karşı Koyan Bazı Uyumlu Çözünenleri	28
Şekil 4.1. Su Örneklemelelerinin Yapıldığı Ayvalık Tuzlasının Genel Görünümü	46
Şekil 4.2. Örneklemelelerinin Yapıldığı Tuz Havuzlarından Bazı Görüntüler.	47
Şekil 4.3. İzolasyon Petrilerine ait Bazı Görüntüleri	50
Şekil 4.4. Bazı Halofilik Bakterilerin Farklı Sıvı Besiyerinde Gelişimi	50
Şekil 4.5. Halofilik Bakterilerin Nişasta İçeren Katı Ortamda Amilaz Üretimi	55
Şekil 4.6. Halofilik Bakterilerin BW-Ksılan İçeren Katı Ortamda Ksılanaz Üretimi	56
Şekil 4.7. Halofilik Bakterilerin CMC İçeren Katı Ortamda Selülaz Üretimi	58
Şekil 4.8. Halofilik Bakterilerin Citrus Pektin İçeren Katı Ortamda Pektinaz Üretimi	59
Şekil 4.9. AT-01-006 nolu Bakterinin Ksılanaz Aktivitesine Farklı pH ve Sıcaklıklarının Etkisi	61
Şekil 4.10. AT-07-002 nolu Bakterinin Selülaz Aktivitesine Farklı pH ve Sıcaklıklarının Etkisi	62
Şekil 4.11. AT-10-003 nolu Bakterinin Amilaz Aktivitesine Farklı pH ve Sıcaklıklarının Etkisi	62
Şekil 4.12. AT-10-003 nolu Bakterinin Pektinaz Aktivitesine Farklı pH ve Sıcaklıklarının Etkisi	63
Şekil 4.13. Seçilen ve Tanımlanan Halofilik Bakterilerin Koloni Görünümleri	64
Şekil 4.14. Bazı Halofilik Bakterilerden İzolatlardan Elde PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüleri	68
Şekil 4.15. Seçilen ve Tanımlanan Strainlerin Halofilik Bakteri Tip Türleri ile Evrimsel İlişkileri	70

TABLO DİZİNİ	Sayfa
Tablo 2.1. Bazı Halofilik Mikroorganizmaların Endüstriyel Öneme Sahip Enzimleri	18
Tablo 3.1. PCR Reaksiyonu Bileşenleri ve Konsantrasyonları	44
Tablo 3.2. PCR ile Ürün Eldesi için Belirlenen Koşullar	45
Tablo 4.1. Ayvalık Tuzlası Su Örneklerinin Bazı Fiziko-kimyasal Parametreleri	48
Tablo 4.2. Tuzlu Su Numunelerinin İyon Kromatografi Sonuçları	48
Tablo 4.3. ICP-OES Metal Analizi Sonuçları	49
Tablo 4.4. Farklı Besiyerine Ekim Sonucu Toplam Halofilik Bakteri Sayısı	51
Tablo 4.5. İzolatların Katı Ortamda Enzimatik Aktiviteleri	53
Tablo 4.6. Seçilen Halofilik Bakterilerin Zamana Bağlı Enzim Üretimleri	60
Tablo 4.7. İzolatların Bazı Kültürel ve Morfolojik Karakterleri	65
Tablo 4.8. DNA ve Protein Miktarı ile Saflık Oranları	67
Tablo 4.9. 16S rRNA Dizilerinin Gen Bankası Verileri ile Karşılaştırılması	69
Tablo 4.10. Strainlerin Nukleotit Frekansları ve Toplam Nukleotit Sayıları	71

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca bana böyle bir çalışma imkanı veren, araştırma konumun belirlenmesinde beni yönlendiren ve sonuçlanması için her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen aynı zamanda laboratuvar çalışmalarımda bana rehberlik eden, pratik ve teorik olarak tüm bilgi birikimlerini aktaran, kıymetli danışman hocam **Prof. Dr. Mustafa OSKAY**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, beni araştırmaya teşvik eden, çalışmalarına ilgi göstererek yönlendiren ve gözlemleyerek çeşitli önerilerde bulunan sayın hocam **Prof. Dr. İhsan YAŞA**'ya teşekkürlerimi sunarım.

Başta, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı sayın hocam **Prof. Dr. Kamil KOÇ** olmak üzere tüm Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine ve Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvar'ı çalışanlarına göstermiş oldukları iyi niyet ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim, ömür boyu ihtiyaç duyacağım desteklerini her an hissettiğim Yılmaz ailesine; manevi desteği için nişanlıma teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması, Manisa Celal Bayar Üniversitesi tarafından, Bilimsel Araştırma Projeleri (2016–153) kapsamında desteklenmiştir. Teşekkür Ederim.

Mevlüt Mert YILMAZ

Manisa-2019

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Ayvalık Tuzlası (Balıkesir)’ndan Halofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Biyoteknolojik Enzim Potansiyellerinin Araştırılması

Mevlüt Mert YILMAZ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa OSKAY

Yüksek tuz konsantrasyonlarında (%10 ve üzeri) optimum büyüeyebilen mikroorganizmalar, halofiller grubuna girmektedir. Halofiller, yaşamın ana domainleri Arkea ve Bakterileri de kapsayan, yüksek tuzlu koşullarda hayatta kalma kabiliyetine sahip çeşitli mikroorganizmaları içerir. Halofillerin bazı önemli biyoteknolojik ve ekolojik özellikleri, halofilik biyolojiyi daha derinden incelemek için bilim adamlarının dikkatini çekmektedir. Bu çalışma, bazı biyoteknolojik açıdan önemli enzimlere odaklanarak Ayvalık Tuzlasından halofilik bakterilerin izolasyonunu ve tanımlanmasını kapsamaktadır.

Farklı zaman aralıklarında Ayvalık tuzlasından su ve sediment örneklemeleri yapılarak çeşitli ortamlarda kültüre edilebilir halofilik bakteri izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Tuzlu su numunelerinin iyon kromatografisi ile bazı iyonları (Florür, klorür, nitrit, bromür, sülfat vb.) ve ICP-OES metal analizi ile bazı metalleri (Na, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn vb.) belirlenerek halofilik bakterilerin sayısı ve tipleri arasında ilişki olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. İzolasyonlar sonucunda tuzladan alınan su örneklerinde yaklaşık olarak 1.2×10^3 kob/mL kültüre edilebilir halofilik bakteri tespit edilmiştir. İzole edilen mikroorganizmaları temsilen 55 farklı Halofilik bakteri seçilerek hem katı hem de sıvı ortamda farklı enzimleri (Ksilanaz, amilaz, selüloz, pektinaz, proteaz ve lipaz) üretim kabiliyetleri belirlenmiştir. Katı ortamda yapılan testler 55 halofilik bakterinin 34 tanesinin araştırılan enzimlerden en az birini üretme kapasitesine sahip olduğunu 14 bakterinin ise yüksek miktarlarda enzim ürettiğini göstermiştir. Seçilen halofilik bakterilerin sıvı besiyerleriyle yapılan fermentasyonları sonucunda elde edilen enzim üretimleri ksilanaz için 2-21.9, selüloz için 2.2-22.2, amilaz için 2.4-18.2 ve pektinaz için 1.2-9.8 U/mL arasında farklılık göstermektedir. Üretilen enzimlerin ısıya karşı toleransları 40 °C civarında olmasına karşın yüksek (alkali) pH’larda aktiviteleri çok daha stabil ve yüksek bulunmuştur.

Seçilen 14 farklı bakterinin 11’i morfolojik, kültürel karakteristikleri ve 16S rRNA sekans verileri aracılığıyla tanımlanmışlardır. Belirlenen türler sırasıyla, *Halobacillus karajensis*, *Halobacillus alkaliphilus*, *Salegentibacter salarius*, *Halomonas alimentaria*, *Halomonas denitrificans*, *Actinopolyspora erythraea*, *Chromohalobacter beijerinckii*, *Marinobacter algicola*’dır. Ayrıca enzim ürettiği belirlenen 3 halofilik bakteri ise cins bazında (2 adet *Haloferax* sp., 1 adet *Saccharopolyspora* sp.) tespit edilebilmiştir.

Çalışmada tanımlanan Halofilik bakterilerin literatürde yer alan bazı halofilik bakterilerden çok daha yüksek miktarlarda farklı enzimleri üretebildikleri belirlenmiştir. Ancak daha sonraki çalışmalarda enzim üretimi optimizasyonu, saflaştırılması gibi bazı ileri testlerin tamamlanması ve bu enzimlerin biyoteknolojik olarak farklı alanlarda kullanılabilirliğinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ayvalık Tuzlası, Biyoteknoloji, Enzim Üretimi, Halofilik Bakteriler, İzolasyon.

2019, 108 sayfa.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

Isolation of Halophilic Bacteria from Balıkesir/Ayvalık Saltern and Determination theirs Biotechnological Enzyme Potential

Mevlüt Mert YILMAZ

Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa OSKAY

Microorganisms that grow at high salt concentrations (10% and above) are included in halophiles group. Halophiles include a diverse microorganisms with ability to survive in highly saline conditions, including major life domains Archaea as well as Bacteria. Some important biotechnological and ecological features of halophiles grabbing the the attention of scientists to further examine the halophilic biology. This study presents isolation and identification of halophilic bacteria from Ayvalık Saltern by focusing on some biotechnologically important enzymes.

Water and sediment samples were be sampled at different time intervals, and halophilic bacteria were isolated. Determination of some ions (fluoride, chloride, nitrite, bromide, sulphate etc.) by ion chromatography and some metals (Na, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn etc.) by ICP-OES metal analyses of saline samples, it is tried to determine whether there is a relationship between the frequency and the types of halophilic bacteria. As a result of isolations, approximately 1.2×10^3 cfu/mL culturable halophilic bacteria were determined in the water samples taken from the saltern. Representative 55 different halophilic bacteria for isolated microorganisms were selected and ability of the producing different enzymes (xylanase, amylase, cellulase, pectinase, protease and lipase) were determined in both solid and liquid medium. Tests in solid media showed that 34 of the 55 halophilic bacteria had the capacity to produce at least one of the enzymes investigated, while 14 of the bacteria produced high amounts of enzyme. As a result of liquid medium fermentation, the enzyme yields of the selected halophilic bacteria were 2-21.9 for xylanase, 2.2-22.2 for cellulase, 2.4-18.2 for amylase and 1.2-9.8 U/mL for pectinase. Although the temperature tolerance of the produced enzymes is around 40 °C, their activity at higher (alkaline) pHs is much more stable and higher.

11 of the 14 selected bacteria were identified by morphological, cultural characteristics and 16S rRNA sequence data. The species identified are *Halobacillus karajensis*, *Halobacillus alkaliphilus*, *Salegentibacter salarius*, *Halomonas alimentaria*, *Halomonas denitrificans*, *Actinopolyspora erythraea*, *Chromohalobacter beijerinckii* and *Marinobacter algicola*. In addition, 3 halophilic bacteria producing the enzymes were determined on genus level (2 *Haloferax* sp., 1 *Saccharopolyspora* sp.).

Halophilic bacteria identified in this study were able to produce much higher amounts of different enzymes than some halophilic bacteria studied in the literature. However, in later studies, to determine the usability of these enzymes in different fields of biotechnology, it is important to complete some more tests such as optimization of enzyme production and purification.

Keywords: Ayvalık Saltern, Biotechnology, Enzyme Production, Halophilic Bacteria, Isolation.

2019, 108 pages.

1. GİRİŞ

Mikrobiyal yaşam sadece spesifik ortamlarla sınırlı değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla mikrobiyal komünitelerin aşırı sıcaklık, basınç, tuzluluk ve pH dâhil olmak üzere çok farklı koşullarda bulunabileceği netleşmiştir. Ekstremofiller olarak adlandırılan bu organizmalar keşfedildikleri andan beri araştırmacılar için ilginç ve zorlu bir platform olmuştur. Ekstremofiller insanlar için 'aşırı' olarak tanımlanan, yüksek veya düşük sıcaklık, aşırı pH değerleri, yüksek tuz konsantrasyonları veya yüksek basınç gibi olumsuz çevresel koşulların varlığı ile karakterize edilen ekolojik nişlerde hayatta kalacak mikroorganizmaları içermektedir [1]. “Ekstremofil” terimi 1974 yılında MacElroy tarafından ilk kez tanıtılmıştır. Ekstremofillerin habitatları olarak; sıcaklık (Psikrofiller, Termofiller), pH (Nötrofiller, Asidofiller, Alkalifiller), tuz (Halofiller), ekstrem kuru koşullar (Kserofiller), kayalar (Endolitler), yüksek şeker içeriği (Ozmofiller) ve yüksek atmosferik basınç (Piezofiller) alanları örnek olarak verilebilir. Dünyanın birçok yerinde, jeotermal ortamlar, kutup bölgeleri, asit ve alkalın çevreler ve okyanusların soğuk basınçlı derinlikleri gibi yerler ekstrem yerler olarak kabul edilmektedir. Ekstrem çevrelerdeki şartların uç noktalarda olması nedeniyle bu bölgelerde yalnızca arkeal ve bakteriyel mikroorganizmalar (prokaryotlar) yaşayabilmektedir. Çok hücreli organizmalar, hücresel yapıları ve bölümlerinin farklılığı nedeniyle ekstrem koşullarda canlılığını sürdürememektedirler.

Halofiller, genellikle aşırı alkalın ortamlarda yaşayan ve büyümeleri için tuza gereksinim duyan organizmalardır. Alkalın ortamlarda genellikle prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalar bulunabilmektedir. Halofiller, çevrenin ozmotik basıncını dengeleyebilmekte ve tuzların denatüre etkilerine karşı dirençli hale gelebilmektedir. Tuz ve soda göllerinde, kayalarda ve tuz kristallerinde dormant hücreler olarak yaşamaktadırlar. Bu prokaryotik organizmalar evrim ağacında daha temel bir grup ya da dal olmaktan çok, bakteri gruplarındaki bazı evrimsel uyarlamalar ile ortaya çıkmaktadır [2]. Yaygın olarak bulunan ve iyi adapte olmuş ekstrem halofilik mikroorganizmalara örnek olarak *Halobacteriaceae* ailesinin *Halobacterial* ordosuna ait olan archaeal *Halobacterium* cinsi ve üyeleri verilebilir [3].

Halofiller, diğer organizmaların büyümesini sınırlayan ortamlarda hayatta kalabilmekte ve gelişebilmektedir. Halofilik arkealar, deniz ve karasal ekosistemlerde prokaryotik dünyanın önemli bir bölümünü temsil etmekte olup sıra dışı özellikleri yeni

biyoteknolojik süreçlerin ve endüstriyel uygulamaların geliştirilmesinde onları potansiyel olarak değerli bir kaynak yapmaktadır [4].

Günümüzde, halofil arkealar, yüksek tuzlulukta gelişen çok eski organizmaların bir bölümü olarak tanımlanmaya başlanmıştır. Ilımlı halofilik bakteriler, farklı cinslere ait heterojen bir fizyolojik mikroorganizma grubunu oluşturmaktadırlar. Bu bakteriler aşırı tuzlu ortamlarda gelişen çeşitli organizmaların oluşturduğu gruptur. Tuz konsantrasyonu gereksinimlerine bağlı olarak, halotolerant (%1-5 NaCl), zayıf halofiller (%2-5 NaCl), ılımlı halofiller (%5-20 NaCl) ve aşırı derecede halofiller (%20-30 NaCl) olarak sınıflandırılmaktadırlar [5].

Halofilik mikroorganizmaların endüstriyel uygulamaları çok çeşitlilik göstermektedir ve her iki domaindeki suşlar, büyük biyoteknolojik potansiyele sahiptir [6]. *Halobacteriaceae*, tuz kristalleştirici havuzlardaki ışığın emilmesini sağlarken buharlaşmanın da artmasına yardımcı olmakta ve bazı karotenoid pigmentlerin üretimine de katkıda bulunmaktadır. *Halobacterium salinarum* bilgisayar belleğinde holografik saklama malzemesi olarak kullanılan integral bir membran proteini olan bakteriyorodopsin üretmektedir. Archaea'dan bazı suşlara ait olan *Halobacterium*, *Haloferax* ve *Haloarcula* cinslerinin ürünleri bazı hidrokarbonların ve böcek öldürücülerinde kullanılmaktadır [7].

Farklı endüstrilerde kullanılan birçok mikrobiyal enzim olmakla beraber ekstrem sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarındaki kararlılıkları ve karakterizasyonları önemli bir konu olmaktadır. Halofilik bakterilerin enzimleri, yüksek iyonik koşullardaki kararlılıkları nedeniyle endüstriyel kullanımda tercih edilmektedir. Halobakteriyel enzimlerin çoğu yüksek sıcaklara karardır ve halobakterilerin ürettikleri ekzoenzimler biyoteknolojinin farklı alanlarında kullanılabilmektedir. Halofilik hidrolitik enzimlerin, deterjan endüstrisinde, yiyecek endüstrisinde ve kirli deniz sularının iyileştirilmesinde kullanılması örnek olarak verilebilir [8]. Halofillerdeki glikozid hidrolazlar, lipazlar, proteazlar ve nükleazlar gibi enzimler farklı alanlardaki endüstriyel uygulamalar için analiz edilmiş olmasına rağmen, hipersalin ortamlardaki hidrolitik yapılarının çeşitliliği nedeniyle daha kapsamlı taramalar halen sürmektedir [9]. Ayrıca biyopolimerler, yüzey aktif maddeleri, hücre dışı polisakaritler, bakteriyorodopsinler ve halosinler de dahil olmak üzere halofiller tarafından üretilen ikincil metabolitler, potansiyel biyoteknolojik uygulamaları nedeniyle yeni çalışmaların konusu da olmaktadır [10]. Bakteri çeşitliliği için bakteri

sınıflandırılması yapılması doğru fenotipik ve genotipik çalışmaların kombinasyonunu içermelidir [11].

Ekstrem tuzluluğa dayanıklı enzimleri, tuzluluğa karşı koyabilmek için geliştirdikleri hücre içi yapıları, zor şartlarda enerji üretimine olanak sağlayan özel proteinlerinin varlığı ve bunun gibi kendilerine has özellikleri halofilik bakterilerin biyoteknoloji alanındaki değerlerinden olup, ülkemizin tuz ihtiyacını karşılayan Balıkesir/Ayvalık Tuzlasından halofilik bakterilerin izole edilerek tanımlanması bu çalışmadaki başlıca amaçlardan birisi olmaktadır. Bu nedenle tuzlu alanlardaki halofilik bakterilerin tanımlanması ve biyoteknolojik enzim üretim potansiyellerinin ortaya konulması önem arz etmektedir. Bu bağlamda, çalışmada Balıkesir Ayvalık Tuzlası'ndan belli zaman aralıklarında su, toprak ve diğer organik materyallerden örnekleme yapılarak yüksek enzim (amilaz, selüloz, ksilanaz, pektinaz vb.) potansiyeline sahip halofilik bakteri izolasyonu ve tanımlanması hedeflenmektedir. Aynı zamanda sıvı ortamda enzim üretimi ve üretilen enzimlerin pH ve sıcaklığa karşı toleransları tespit edilmiştir. Bu çalışma ile önemli olan halofilik mikroorganizmaların Ayvalık deniz tuzlasından kapsamlı olarak ilk kez izolasyonları gerçekleştirilecek ve farklı enzimleri üretim potansiyelleri ortaya konulacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Halofilik Mikroorganizmaların Tarihçesi

M.Ö. 2700 yılında ilk halofilik mikroorganizmanın varlığı saptanmış olup hipersalin ortamlarda, kırmızı tuzlu suda bulunan mikroorganizmaların olduğu bilinmektedir [12]. Pierce tarafından, halofil izolasyonunu anlatan bir rapor da 1914 yılında sunulmuştur. 1920-1940 yılları arasında balık, hayvan derileri ve hamsi gibi birçok canlıdan halofilik bakteri izole edilmiştir. En önemlisi, Petter ve Hof tuza doymuş çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar konusunda 1932 ve 1935 yıllarında araştırmalar yapmıştır [13].

1936 yılında Volcani'nin yayınladığı "Ölü Denizde Yaşam" adlı makalesinde Ölü Denizin hipersalin çevrelerinin cansız ve steril olduğunu düşünmekteydi [14]. Petter ve Hop eserlerinden esinlenerek Volcani, Ölü Deniz'in sularından ve kıyılarından aşırı halofilleri, *Halobacterium trapanicum* ve *Micrococcus morrhuae*'yi ve orta derecede halofil olan *Chromohalobacterium marismortui*, *Pseudomonas halestrogusu* ve *Flavobacterium halmephium*'u izole etmiştir lakin bu araştırma takip edilememiştir ve Volcani yaklaşık 20 yıl çalıştıktan sonra araştırma odağını değiştirmiştir [15]. 1980'lerde Ventosa ve ark., [16] Volcani'nin bıraktığı yerden konuyu tekrar ele almışlar ve Ölü Deniz'de mikroorganizmaların yaşamı hakkında kapsamlı çalışmalar başlatmışlardır. Ören ve ark., [17] aynı zamanda hipersalin ortamlarda mikroorganizmaların ekolojisi, fizyolojisi, biyokimyası ve mikrobiyolojisi üzerinde de çalışma yapmışlardır.

2.2. Halofiller

Halofiller, aşırı alkalın ortamlarda yaşayan tuzu seven organizmalardandır. Bu çevredeki prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizma grupları çevrenin ozmotik basıncını dengelemektedirler ve yüksek tuz konsantrasyonlarının denatüre edici etkilerine karşı dirençlidirler. Normalde, tuz bakımından zengin ortamlarda yaşayan organizmalar su kaybetmekte ve osmoz sonucunda ölmektedirler. Halofiller tuzca zengin ortamlarda hayatta kalabilmek için, sitoplazmalarını çevre ile izotonik tutmalıdır. Bu olayı 2 farklı şekilde yapmaktadırlar. İlk olarak (bakteriler, bazı arkealar, mayalar, yosunlar ve mantarlar) organik bileşikler sitoplazmalarında depolamaktadırlar; bu tür bileşikler organizmaların ozmotik stresden kurtulmasına yardımcı olmaktadır. Bu proseste kullanılan en yaygın çözgen maddeler yüksüz amino asitler ve şekerlerdir. Bu yöntemin önemli bir dezavantajı organizmanın önemli miktarda enerji kullanmasını gerektirmesidir. İkinci olarak daha az tuza adaptasyon şeklinde, sitoplazmalarında potasyum (K^+) iyonlarının seçici alımını

içermektedir. Buna karşılık, organizma sodyum-potasyum pompası yardımıyla sodyum (Na^+) iyonlarını pompalamaktadır. Sodyum, potasyum iyonlarından daha az kullanılmaktadır. Bu adaptasyon sadece bir grup bakteri ordosu ve tek bir Archaea ailesi tarafından kullanılmaktadır. Bu yaklaşımın avantajı, daha önce bahsedilen uyarlamadan çok daha az enerji için kullanmasıdır. Çoğu halofil mikroorganizma bu mekanizmaların birisini kullanmaktadır ancak bir kaç halofil her iki mekanizmayı birden kullanabilmektedir [18].

Sonuç olarak, halofiller, ozmotik dengelerini korumak için hipersalin habitatlarda hayatta kalabilmektedirler. İzotonik çevrelerde konsantrasyonlarını sodyum klorür veya potasyum klorür (NaCl veya KCl) gibi tuzlar biriktererek uygun hale getirmişlerdir. Halofillerdeki proteinler çok yüksek tuz konsantrasyonlarıyla (4 M KCl konsantrasyonu ve 5 M daha üstü NaCl konsantrasyonlarında) baş etmelidirler [19]. Enzimler, yüzeylerindeki çökmeyi önlemek için yüzeylerinde çok miktarda negatif yüklü aminoasit kalıntıları biriktererek bu çevreye uyum sağlamaktadır. Bu nedenle, daha düşük tuz konsantrasyonlarına sahip ortamda, halofil enzimlerin çözünürlüğü genellikle çok zayıftır ve bu da halofillerin yaşam çevrelerini sınırlayabilmektedir [20]. Bununla birlikte, bu özellikleri sayesinde, sulu/organik ve sulu olmayan ortamlara da adapte olmuşlardır [21].

2.2.1. Halofilik Arkelerin ve Bakterilerin Genomikleri, Evrimi ve Taksonomisi

Halofilik archeaların aksine halofilik ve halotolerant bakterilerin birçoğunun filogenetik dalı bulunmaktadır. Bakteri domainlerinin birçoğu halofilik ve halotolerant organizmalar bakımından farklı bakteri taksonları içerisinde değerlendirilmektedir. Bazı iyi bilinen bakteri filumları şunlardır; Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes ve Bacteroidetes'dir [22]. Halofilik ve halotolerant aktinobakteri filum olarak Actinobacteria'ya aittir. Bu taksonun sonuçlarına, 16S rRNA fiologenetik ağacındaki dallanma pozisyonları ve taksona özgü 16S rRNA imzalarından ulaşılmıştır [23]. Ayrıca, 23S rRNA ve protein sekanslarındaki bazı korunmuş bölgeler, bakterilerden aktinobakterileri ayırt etmektedir [24].

DasSarma, bakteri gruplarından haloarkeal genomların farklı olduğunu göstermek için *Halobacterium* NRC-1'in genom dizisini yayınlamıştır [25]. Yakın zamanlarda genom dizileri tamamlanmış olan bu organizmalardan bazıları şunlardır; *Haloarcula marismortui*, *Natronomonas pharaonis*, *Haloquadratum walsbyi*, *Halorubrum lacusprofundi*, *Halomicrobium mukohataei*, *Halorhabdus utahensis*, *Halogeometricum borinquense*, *Haloterrigena turkmenica* ve *Haloferax volcanii*. Çoğu halofil mikroorganizma ekolojik

çeşitlilik göstermektedir. Xiang ve ark., *Haloarcula hispanica* ve *Haloferax mediterranei* genomlarının dizilimini ve analizlerini göstermişlerdir. DasSarma, haloarkaeal genom diziliminde üstel bir artış olduğunu göstermekte ve şuan ki ileri sekanslama yöntemleriyle, birkaç yıl içinde Halobacteriaceae türlerinin yayınlanmış genomlarının sayısının çok hızlı bir şekilde artacağını öngörmektedir. Büyük mega plazmidlerin ve mini kromozomların mevcudiyeti ve çekirdek asidik proteomların varlığı da dahil olmak üzere haloarkaeal genomların korunan yapılarından bazıları değerlendirilmiştir [26]. Veri analizi ayrıca, biyoteknolojide uygulanabilecek yeni gen sayısının artmasıyla genişleyen bir haloarchaeal pan genomunun kestirimini sağlamıştır [27].

DasSarma ve ark., tarafından da ek postgenomik çalışma yapılmıştır. Coker, haloarkelerdeki TATA bağlayıcı protein ve transkripsiyon faktörü B protein aileleri üzerine çalışmalar yaptığını bildirmiştir ve gen ekspresyonu ve stres regülasyonu için önemini göstermiştir [28].

Halofilik ve halotolerant bakterilerin sıralı genomlarının listesi henüz daha yeterli miktarda değildir. 30 yıl önce tanımlandığından beri en popüler model organizmalardan biri haline gelen ve biyoteknolojik uygulamalar da kullanılan organizma *Halomonas elongata*'yı bile içermemektedir. Genom sekansı bilgileri mevcut olan; anoksijenik halofilik fototrof *Halorhodospira halophila*, ekstrem tuza tolerant alkalifilik sülfür oksidasyonu gerçekleştiren *Thioalkalivibrio*, termofilik anaerobik halofil *Haloferax volcanii* ve aerobik heterotrofik *Chromohalobacter salexigens* ve *Salinibacter ruber*'dir [29].

2.2.2. Halofilik Virüsler

2001 ve 2004'te Sevilla ve Ljubljana'daki Halofiller sempozyumlarında, hipersalin ekosistemlerinde mantarların önemini vurgulanmıştır. 2010 yılındaki Halofiller adlı kongre de ise virüslerin önemi ortaya konmuştur. Aşırı halofilik Arkea'ya saldıran fajlar ilk kez 1974 yılında tanımlanmıştır, ancak o yıllar hipersalin ekosistemlerdeki virüslerin rolü daha keşfedilmemiştir [30].

Roine ve ark., halofilik Arkea'ya saldıran yeni virüs türlerini keşfetmişlerdir. Tek iplikçikli veya çift sarmallı bir DNA genomu içeren bir lipid zarfına sahip pleomorfik virüslerin izolasyonu ve karakterizasyonu, hipersalin ortamlardaki viral çeşitliliğin önceden varsayıldığından çok daha büyük olduğunu göstermektedir [31]. Heaphy, Moğolistan'da bir tuz gölünden izole edilen iki yeni litik baş/kuyruklu virüsü (Siphoviridae virüsü BJ1 ve Myoviridae virüsü BJ2) *Halorubrum kocurii*'ye enjekte etmiştir [32]. Birkaç archaeal virüs

genomu dizilenmiştir ve bunlardan birisi virüs BJ1 dizisidir (EMBL erişim numarası AM419438).

Utah'da Büyük Tuz Gölü'ndeki virüs dağılımı ve çeşitliliği hakkında kapsamlı bir araştırmanın ilk sonuçları Baxter tarafından sunulmuştur. Tuzlalarda, protozoa ve diğer yırtıcı hayvanlar olmadığından, virüs çeşitliliğini ve canlılıklarını incelemek için ideal ortamlardır ve prokaryotların ve virüs benzeri partiküllerin sayısı olarak: $> 10^7/\text{mL}$ ve $> 10^8-10^9/\text{mL}$ olarak verilmiştir. Rohwer tuza doymuş göletlerde virüs canlılıkları üzerine çalışmalar yapmıştır. İlk bakışta, tuzladaki arkea ve virüslerin mevcut ve öngörülebilir topluluklarında "öldür-kazan" davranışının olması böylesi bir ortamda mikrobiyal taksonların ve viral avcılarının hızla döngüsü sebebiyle farklılık göstermektedir. San Diego yakınlarındaki tuzlalarda virüslerin metagenomik analizi, mikrobiyal takson ve viral taksonların dağılımının zamanla sabit kaldığını ancak mikrobiyal suşların ve viral genotiplerin dağılımının dalgalanabilir olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, bireysel suşların ve viral genotiplerin popülasyonları "öldüren-kazanır" modelindeki dalgalanmalara bağlıdır [33].

Virüslerin faaliyetleri ekstrem halofilik bakteri *Salinibacter*'in (Bacteroidetes) dağılımı üzerinde derin etkilere sahip olabilmektedir. Santos ve ark., bacteria içinde bulunan halofilik temsilcilerin yaklaşık olarak %15 civarında ve halofiller arasında ise en yaygın olan *Salinobacter ruber* olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada viral toplulukların metagenomunu ortaya çıkarılmıştır. Biyoinformatik analiz sonuçları (GC içeriği ve dinükleotit frekans analizi) temel alınarak viral dizilerin yaklaşık %24'ü *Salinibacter* fajlarına karşılık gelmektedir [34].

2.2.3. Halofilik Küf ve Mayalar

Halofilik küfler uzun zamandır hipersalin ekosistemin üyeleri olarak görülmemekteydi ancak önemi son on yılda anlaşılmıştır. Gunde-Cimerman ve ark., yaygın olan halofil veya halotolerant küf ve mayaların biyolojisine genel bir bakış sağlamıştır. Bunlar arasında, en az 1.5 M NaCl'ye ihtiyaç duyan halofil *Wallemia ichthyophaga*, 5 M NaCl'ye kadar büyüyen siyah mayalardan *Hortaea werneckii* ve 3 M NaCl'ye kadar büyüyen *Aureobasidium pullulans* bulunmaktadır. Bunların hepsi genellikle hipersalin göllerinde ve birçok beklenmedik ortamlarda bulunmaktadır. Bu alanlar: ev bulaşık makineleri, kutup buzları ve muhtemelen çöl mağaralarında örümcek ağları üzerindedir [35].

Halofilik ve halotolerant küfler, ozmotik çözeltiler olarak gliserol, eritritol, arabitol ve mannitol gibi polioller kullanmakta ve sitoplazmalarında düşük tuz konsantrasyonlarını korumaktadırlar. Ana Plemenitas ve Janja Zajc tarafından *Hortaea werneckii* ve *Wallemia ichthyophaga*'nın ozmotik uyarlaması üzerine moleküler çalışmalar yapılmıştır. Sodyumun (Na^+) identifikasyonu ve yapısal özellikleri 3' fosfoadenozin- 5' fosfataz HwHal2'ye duyarlı olduğu bulunmuştur, *H. werneckii* halotolerans canlılardan birisidir ve bitkilerde tuza dayanıklılığı sağlamak için transgenik olarak çalışmaları yapılmıştır. Yüksek ozmolarite gliserol'ün (HOG) derinlemesine çalışılması üzerine bir anlayış elde edilmiştir ve bu anlayış gelecekte geliştirilecek tuza dayanıklı bitkilerin geliştirilmesine uygulanabilecektir. Gliserol-3-fosfat dehidrojenaz, hem *Wallemia* hem de *Hortaea* tarafından gliserol sentezinde kullanılmaktadır ve bu enzimi kodlayan genin heterolog ifadesi, yetersiz gliserol üretimindeki *Saccharomyces cerevisiae*'deki halotoleransı düzeltebilmektedir [36].

2.2.4. Halofilik Bakteriler ve Arkealar

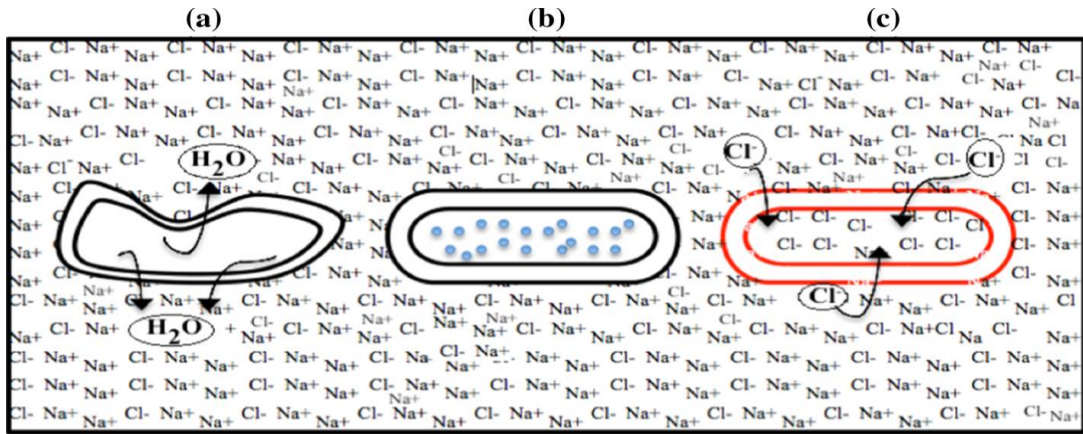
Yaşamın üç alanının her birinde de (Arkea, Bacteria, Eukarya) halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar bulunmaktadır. 100 g/l'nin üzerindeki tuz konsantrasyonunda büyüyen organizmalar filogenetik yaşam ağacındaki dalları aşağıdaki Şekil 2.1.'de gösterilmektedir [37].

Halobacteriales takımındaki aerobik halofilik Arkealar, *Halobacteriaceae* ailesi içerisindeki baskın halofillerdir. Ölü Deniz, Magadi Gölü, Kenya gibi hipersalin soda göletleri ve tuzlu kristalleştirici havuzlar gibi ortamlar mikrobiyal biyokütlenin ana bileşenleridir. Bu göletlerin kırmızı renklerinin çoğunun veya tamamının, ailenin birçok üyesinin membranlarında bulunan C-50 karotenoid pigmentlerinden (α -bakteriyoruberin ve türevleri) kaynaklanmaktadır [38]. Ayrıca, Euryarchaeota'nın metanojenik kolu, halofil temsilcileri içermektedir ve metanojenez, tuz konsantrasyonun doymuş seviyesine yaklaştığında meydana gelmektedir. Crenarchaeota alemi içinde hiçbir halofil henüz tespit edilememiştir [39].

Bakteriler, çok sayıda filogenetik alt gruba yayılmış birçok halofilik ve halotolerant mikroorganizmaları içermektedir. Bunların birçoğu Ventosa ve ark. tarafından çalışılmıştır. Proteobakterilerin halofilik temsilcilerinin farklı dalları, genellikle halofilik olmayan yakın akrabalarını içermektedir. Halofiller ayrıca Siyanobakteriler, *Flavobacterium* - *Cytophaga* dalı, Spiroketler ve Aktinomisitler arasında bulunur [40]. Halofiller, Gram-pozitif bakteri (Firmicutes) soyları içinde, aerobik dallarda (*Bacillus* ve ilgili organizmalar) ve anaerobik

2.3.1. Selüler Adaptasyon

Çok tuzlu ortamlara adapte olmamış mikroorganizmalar suyunu kaybederek hücrelerin ilk önce büzülmesine ve daha sonra hücresel yapının ve işlevinin kaybedilmesine neden olmaktadır (Şekil 2.2a.). Bu gibi koşullar altında aşırı su kaybını önlemek için, halofiller, sitoplazmalarının ozmotik aktivitesini dış ortamla eşitlemek için iki farklı stratejiyi geliştirmişlerdir; birinci olarak uyumlu organik çözünür maddeler üretirler (Şekil 2.2b.), ikinci olarak da hücreler içindeki toplam tuz konsantrasyonunu, sitoplazmalarındaki büyük tuz konsantrasyonlarıyla birleştirerek uyum sağlamaktadırlar (Şekil 2.2c.) [43].



Şekil 2.2. Halofillerin Hipersalin Çevrelere Adaptasyonları [43]. a) Turgor etkisi b) Uyumlu organik çözünür sentezi c) Çevresel tuz konsantrasyonlarının dengelenmesi.

2.3.2. Yüksek Tuz Konsantrasyonunda Strateji

Halofiller, çevrelerindeki tuz konsantrasyonunu dengelemek için inorganik klor iyonlarını kullanmakta ve hücreler arası olarak klor iyonlarını biriktererek, kendilerini tuzlu bir çevreden korumaktadırlar. Bu süreç, kloru ortamdan sitoplazmaya taşıyan sadece halofillerde bulunan klor pompalarını içermektedir. Arginin ve lizin, klor alınımlı ve bırakılmasını kolaylaştırmak için klor transport kanalının her iki ucunda bulunmaktadır [44].

Halobacterium salinarum, *Haloarcula marismortui*, *Halococcus morrhuae* gibi arkealar *Halobacteriaceae* ailesinin aşırı halofillerindendir. Bakteriyel *Halanaerbiales* ailesinden; *Haloanaerobium praevalens*, *Haloanaerobium acetetoethylicum*, *Halobacteroides halobius* gibi bakteriler hücreleri içerisindeki K⁺ iyonlarını konsantre ederek, ozmotik dengelerini korumuş olurlar [45]. Bu, membrana bağlı proton-pompa bakteriyodopsin, ATP sentaz, Na⁺/H⁺ antiportlar'ın uyumlu eylemiyle başarılmaktadır ve K⁺ uniport mekanizması yoluyla K⁺ 'nin hücelere alınımlı yönlendiren bir elektrik potansiyeliyle

sonuçlanmaktadır. Bu elektriksel potansiyel her zaman K^+ 'un difüzyon potansiyelinden daha büyük olmalıdır, böylece Cl^- karşıt iyonu birincil veya ikincil taşıyıcılar tarafından alınmaktadır. Işık yokluğunda, Na^+ / H^+ antiportu, ışıktan bağımsız bir Cl^-/Na^+ simportu ile değiştirilmekte, ancak bu tür taşıma mekanizması hakkında çok az şey bilinmektedir [46].

Salinibacter ruber, çevreyle ozmotik dengesini korumak için hücrelerinde K^+ biriktirmektedir. Bununla birlikte bugüne kadar *S. ruber*'de K^+ ve Cl^- alımına yönelik biyokimyasal bir test geliştirilmemiştir. *Salinibacter ruber* genomu analizi sonucunda, K^+ alımının muhtemelen bir tropomiyozin reseptör kinaz A ile ilgili taşıma mekanizması yoluyla meydana geldiğini düşündürmektedir. *Salinibacter ruber* genomu, bir lateral gen aktarım olayından kaynaklandığı düşünülen, tropomyosin reseptör kinaz A geninin iki kopyasını kodlamaktadır. Tropomiyozin reseptör kinaz A, NADH ve NAD^+ 'yi bağlayan bir sitoplazmik-yönlendirmeli membran proteinidir ve zar boyunca uzanan translokasyon altbirimi, taşıma aktivitesi için esastır. Buna ek olarak, halorodopsin vasıtasıyla *S. ruber* Cl^- pompaları üzerinden Cl^- 'yi hücre içine almaktadır. *S. ruber* 'in genomunda muhtemelen rodopsin kodlayan dört varsayımsal gen tespit edilmiştir. Sekans benzerliklerine dayanarak, iki gen bir sensör rodopsini, üçüncü gen bir proton pompasını ve dördüncü gen ise Cl^- pompasını kodlamaktadır. İlginç bir nokta ise, *S. ruber* 'de K^+ ve Cl^- birikiminde anahtar rol oynayan $Na^+ - K^+ / Cl^-$ yardımcı transportu için genin iki kopyasının ökaryotlarda bulunması, ancak prokaryotlarda bulunmamasıdır. X ışını mikro analizi bu yardımcı pompaların arkelerden ekstrem halofil olan *Halobacteriaceae* ailesinde bulunduğunu göstermiştir [47].

2.3.3. Düşük Tuz Konsantrasyonunda, Organik Çözünende Strateji

Ozmotik dengenin korunması ve farklı tuz ortamları altında uygun turgor basıncının oluşturulması için daha esnek bir yöntem daha uygun olabilmektedir [48]. Halofillerde hareketsiz uygun çözeltilerin (ozmolitler) alınımı evrimsel süreç içinde oluşmuştur, örneğin, uygun çözeltilerin dış çevreden sağlanması örnek olarak verilebilir. Bu ozmolitler, mikrobiyal proteinleri düşük tuz konsantrasyonunda suda denatürasyondan korurken, organizmanın da dış salin ortamındaki dalgalanmalarına karşı toleransını artırmaktadır. *Halorhodospira halochlor* 'daki glisin betain, ilk bildirilen bakteri ozmoliti olmuştur [49].

Mezofilik kökenli ozmolitler genellikle kutupsal, yüksek çözünürlükte olan bileşiklerdir. Diğer taraftan Arkelerde bulunan ozmolitler, örneğin; gliserol, glikosil gliserol, betainler, prolin, glutamat, glutamin ve ektoinler [50] fizyolojik pH'da negatif yüklüdür. Buna ek olarak, şekerler sükroz ve trehaloz, mikrobiyal membranları stabilize etmek için

hayati önem taşıyan osmolitlerdir [51]. Osmolitler iyon birikiminden enerjisel olarak daha masraflı olsalarda, halofiller tarafından da sentezlenebilirler [52].

Organik olarak uygun çözünenlerin birikimi genetik düzeyde incelenerek, bu maddelerin mikroorganizmaların hücrelerindeki konsantrasyonlarının, hücrenin dışındaki tuz konsantrasyonuna göre düzenlendiğini göstermiştir [53]. Ilımlı halofilik bir bakteri olan *Halobacillus halophilus* (prokaryotlarda klorür bağımlı büyüme için bir örnek) glutamin biriktirerek turgoru ayarlamakta ve glutamat, glnA2'nin (bir glutamin sentetaz kodlayan) transkripsiyonuyla, glutamin sentetaz aktivitesinin klorüre bağlı adımlardan biri olmasıyla da elde edilebilmektedir. Yüksek tuzluluklarda *H. halophilus* organik olarak uygun çözünen madde olarak prolin üretmektedir. *H. halophilus* 'de osmolit strateji büyüme fazından durgun faza geçişte prolin yerine ektoin üretmektedir [54]. Bazı durumlarda, tek bir plazmidin iyileştirilmesi sonucu halotolerans *H. elongata* 3.4 M %20 NaCl'de büyüme yeteneğini kaybetmiştir ve bu plazmidlerin varlığına bağlı olabildiğini raporlamıştır [55]. *Spirillum luteum*'da da benzer bir gözlem bildirilmiştir [56]. Hücrelerdeki osmolit konsantrasyonlarının nicel olarak belirlenmesi için kolon kromatografisi, yüksek çözünürlüklü nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi de kullanılmaktadır.

2.3.4. Enzim Adaptasyonu

Yüksek tuzlu bir çevre, protein çözünürlüğünü ve stabilitesini büyük ölçüde etkilemektedir [57]. Bu gibi ortamlarda, hücresel proteinlerin dehidrasyonu, dıştaki iyonik mineraller içinde su molekülü tutulumundan dolayı hücre içerisindeki su içeriğinin azalması olarak belirginleşmektedir. İç mikrobiyal proteinlerin bozulmasına neden olan olumsuz etkileşimler, net yükler düzenlenerek modüle edilebilmektedir. Halofiller ve halofil olmayan proteinler arasındaki göze çarpan bir fark, halofillerin proteinlerinin aspartat ve glutamat yüzdesinde daha büyük bir orana sahip olmasıdır [58].

Mikrobiyologlar, halofilik enzimlerin moleküler halo-adaptasyonlarının önemli sayıda protein yükleri ve hidrofobisitenin artmasından sorumlu olduğunu belirtmişlerdir [59]. Halofil proteomlarının negatifliği, ilk olarak *Halobacterium* sp. NRC-1'in genom dizilemesi ile açığa çıkarılmıştır. En az sekiz amino asidi sentezleyen enzim eksikliği dışında, bir grup sinyal trans dönüştürücülerin (transducer) ve transkripsiyonel düzenleyicilerin kodlanması, bunların halojen oluşumlarında çok uygun olabilmektedir. İlginç bir örnek, halofilik genomların kombine özelliklerine sahip olan *H. marismortui*'nin ikinci halofil genom dizisi,

asidik proteom içermektedir, genel transkripsiyon faktörlerinin çoklu kopyaları ve çoklu replikonlar (yüksek G+C oranına sahip) muhtemelen timin dimeri oluşumu ve zararlı mutasyonlar gibi UV kaynaklı hasarları önlemek için yararlı olmaktadır [60]. Ancak bu tür kombinasyonlar nadir olmakla beraber G+C içeriği eğiliminin halofillerin evrensel bir özelliği olamayacağı kesinleşmiştir. *Haloquadratum walsbyi*, *Halothermothrix orenii* ve *Salinicoccus kunmingensis*' in genel G+C içeriği %42.9 ve 47.9 arasında bulunmaktadır. Bu nedenle, nükleotid içeriği ile birlikte diğer spesifik haloadaptasyon özellikleri de tanımlanmalıdır.

Nispeten çok sayıda negatif yüklü amino asit elde etme eğilimleri, *H. marismortui*' den α -amilaz, *Planococcus* sp. SL4'den ksilanaz ve *Halobacterium* sp. suşu LBU5030'dan proteaz üretimi ile gösterilmiştir. Ayrıca halofilik protein dizilerinin biyoinformatik analizi ile proteinlerin daha az polar kalıntı içerdikleri (örneğin serin) ve bu kalıntıların yüksek tuzlu ortamlarda dehidrasyona karşı koruma sağlamadığı tespit edilmiştir [61].

2.4. Halofillerin Endüstriyel Uygulamaları

Halofiller, kıyı ve derin deniz havuzlarındaki doğal tuzlardan, tuz minerallerine ve güneş tuzlarına kadar uzanan gezegenin her yerinde bulunmaktadır. Halofillerin ticari önemleri antik zamanlardan bu yana kaydedilmiştir. Örneğin, ödemelerinin bir parçası olarak Romalı askerlere 'tuz para' verilirmiş (*salaryum argentum*) ve bu uygulamadan İngilizce sözcük 'maaş' (*salary*) türetilmiştir. Güneş tuzlarında halofilik mikroorganizmaların kırmızılaşması eski kültürlerde (Çin ve Orta Doğuda) başarılı bir tuz üretimi için biyolojik belirteç olarak kullanılmıştır. Günümüzde bile, halofilik mikroorganizmalar tuz üretimi için kritiktir; kırmızı-mor renkleri güneş radyasyonunun absorpsiyonunu artırır, buharlaşma sürecini hızlandırır, uygun boyut ve şekle sahip kristaller tuz üretimini artırmaktadır. Halofiller, soya gibi sosların hazırlanmasında, peynir, tuzla işlenmiş et ve balık gibi diğer ürünlerin üretiminde kullanıldığı gıda endüstrilerinde de önemlidirler [62].

Halofillerin modern kullanımı içerisinde doğal besin takviyeleri, β -karoten, vitaminler ve insan tüketimi için yeşil alg *Dunaliella* katkılı diğer bileşenlerin üretimine kadar geniş bir alanı kapsamaktadır [63]. Ayrıca biyosensör uygulamaları için arkeal *Halobacterium* üyelerinin iki boyutlu mor membran proteini olan bakteriyel rodopsin kullanılmaktadır. Bu ürünleri üreten birçok firma ticari olarak başarılı olmuştur. Halofillerin uyumlu çözümleri kozmetik ve gıda endüstrisinde nemlendiriciler ve koruyucular olarak yaygın şekilde

kullanılmaktadır. Kimyasal, çevresel, biyoyakıt, farmasötik ve sağlık endüstrilerinde bulunan birkaç uygulama da gelecekte kullanıma sunulması muhtemel olacaktır.

2.4.1. Gıda Uygulamaları

Halofiller geleneksel olarak bazı fermente gıdaların üretiminde önemlidirler. Fermente edilmiş veya korunmuş bazı tuzlu gıda ürünlerinin üretimi genellikle yüksek bir ölçekte yapılmaktadır [64]. Ayrıca, diğer ürünlerden, soya ve balık sosunun büyük ölçekli sanayi üretimi de yapılmaktadır. Halofillerdeki hidrolazlar ve izomerazların gıda endüstrisinde kullanımı artan uygulamalardandır. *Halobacteria*, *Halococci* ve *Natronococci* gibi bazı halofiller fermente gıdalar ve kimchi sosundan izole edilmişlerdir [65].

Yeşil tek hücreli alg olan *D. salina*, yüksek tuzluluk derecesinde karotenoidler biriktirmektedir ve %24 NaCl'de optimum bir β -karoten verimi elde etmektedir. Bilinen en iyi β -karoten kaynağıdır ve büyük ölçekli açık hava tesislerinde sürekli şekilde 30-40 g kuru ağırlık/m²/gün miktarında ticari olarak üretilmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonu, protozoal türlerin ve karotenoid içermeyen *Dunaliella* üyelerinin azalmasına neden olmaktadır.

β -karoten, endüstriyel uygulamalarda lipid ve yağda çözünür bir ürün olarak, bitkisel yağda solüsyon, margarin, pişmiş ürünler ve bazı hazır gıdalarda gıda renklendiricisi amacıyla kullanılmıştır. Suda çözünür, dağılıbilir ve emülsiyon formülasyonları veya mikrokapsüllü boncuklar şeklinde gazlı içeceklerle eklenmektedir. β -karoten, yüksek dozlarda zehirsiz olduğu için A vitamini için mükemmel bir kaynak olmuştur. β -karoten'e ek olarak, *D. salina*'da zeaksantin, kriptoksantin ve lutein gibi karoten ve ksantofiller de bulunmaktadır [66].

2.4.2. Çevre Uygulamaları

Dünyadaki atıkların yaklaşık %5'i salin veya hipersalin ortamlardadır ve bu ortamlarda büyüyüp gelişebilen halofiller, biyoremediasyonda kullanım potansiyeline sahiptir [67]. Endüstriyel atıklardan toprak kirleticilerine kadar atıkların biyolojik açıdan giderilmesi (biyoremediasyon) için halofillerin kullanımları araştırılmaktadır. Kâğıt, tekstil ve petrol sanayilerinden gelen salin atık suyu halofillerin belirlenmesinde ve bu atık suların iyileştirilmesinde kullanılabilecek enzimlerin kaynağı olarak araştırılmasına yol açmıştır. Halofillerin çok çeşitli ve yaygın oluşu ve ayrıca çok sayıda kontaminasyon bölgesinin genellikle salin oluşu nedeniyle, halofillerin çevresel uygulamaları oldukça önemlidir [68].

2.4.2.1. Hidrokarbon Degredasyonu

Petrol üretim yerlerindeki atıklarla ilişkili halofiller incelenmiştir ve petrol-tuzlu toprakta hidrokarbonları degrade eden halofil ve halotolerant bakteriler rapor edilmiştir. Halofillerden olan *Marinobacter* sp. benzen, tolüen, etilbenzen ve ksilenleri CO₂'e dönüşümünü gerçekleştirmektedir [69]. Aromatik maddeler için yapılan diğer çalışmalar arasında, yüksek salinli endüstriyel atıkların biyolojik olarak iyileştirilmesi için *Haloferax* ve *Halorubrum* üzerinde yapılmıştır [70]. Hipersalinli ve yağ suyuyla kontamine topraktan izole edilen *Haloferax* sp. D1227 suşu, tek karbon kaynağı olarak aromatik bileşiklerden faydalanmıştır [71]. Zeytinyağı atık suyundan izole edilen *Halomonas* sp. HTB24'ün, tirozolu, antioksidan hidroksitirazol (HT) ve 3.4 dihidroksifenilasetik asit (DHPA)'ya dönüştürdüğü ve bunları da süksinat ile piruvata kadar parçaladığı rapor edilmiştir [72].

Halobacterium sp. NRC-1 gaz vezikülleri olarak adlandırılan benzersiz gaz dolu organeller üretmektedir. Bu organeller mikroorganizmanın yüzeyde durmasına olanak sağlamaktadır. Bilim adamları gaz vezikülleri üretiminin genetik temelini karakterize etmişlerdir ve biyomühendislik çalışmaları için hidrokarbonları degrade eden bir vektör tasarlamışlardır [73]. Genetik mühendisliğindeki bu mikroorganizmalar kitlesel olarak üretilerek, hem hidrokarbonları indirgenmesi için hem de hidrokarbonların bulunduğu yere yüzmesi için ikili yetenek kazandırılmaktadır. Süreç aynı zamanda diğer biyolojik arıtmanın yanı sıra bira ve şarap yapımı gibi fermentasyon süreçlerine de uygulanabilmektedir. Hidrokarbonların biyolojik olarak parçalanmasına yönelik geliştirilmekte olan bir başka yaklaşım, halofillerin kendilerinin veya enzimlerinin kullanılmasıdır. Petrol ve tuz yatakları genellikle birbirleriyle bağlantılıdır. Bu nedenle, bazı halofillerin hidrokarbonları kullanabileceği ve potansiyel olarak daha inert materyal haline getirebileceği akla yatkın gelmektedir.

Sanayide, hidrokarbon döküntüleri ve kirleticilerinin iyileştirilme çalışmalarında, hidrofobik bileşikleri çözmek ve dağıtmak için yüzey aktif bileşikler (biyosürfektanlar) ve emülsiyonlar kullanılmaktadır. Yapılan bir araştırma, halofillerin biyoteknolojik uygulamalarda potansiyel biyosürfektanlar ürettiğini göstermiştir [74]. Damla çöküşü ve emülsiyonlaşma aktivitesi denemelerinde, besiyeri ortamında yüzey gerilimini %15 w/v NaCl'ye indirgeyen birkaç halofilik suş bulunmuştur. Başka bir çalışmada İran petrol rezervuar tuzlu suyundan, yüzey aktif maddeler üreten, sıcaklık ve tuzluluğa toleranslı fakültatif bakteri suşları keşfedilmiştir [75].

2.4.2.2. Tabaklama Sanayi

Tabaklama işlemi sırasında, yüzülmüş hayvan derileri önce koruma amaçlı tuza yatırılmaktadır. Sonra derideki tuz uzaklaştırılarak suyla nemlendirilmektedir. Elde edilen %1-10 w/v ıslatma çözeltisi atığı, organik madde ile doldurulmakta ve su genellikle buharlaştırma yoluyla uzaklaştırılmaktadır. Organik yükü azaltmak için uygun yöntemler geliştirilebilirse, buharlaştırma yoluyla üretilen tuz deri soyulması ve diğer tabaklama işlemlerinde yeniden kullanılabilir. Deniz ve tabaklama salin atıksu numunelerinden elde edilen dört bakteri; *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus flexus*, *Exiguobacterium homiense* ve *Staphylococcus aureus* biyolojik arıtmada kullanılabilmektedir [76].

Aşırı derecede halofil arkealar, diğer halofil arkeaların büyümesini engellemek veya inhibe etmek için antimikrobiyal kimyasallar olarak halosinler üretmekte ve deri endüstrisinde de kullanılabilmektedir. Tabaklama işleminin yapıldığı, optimum su koşulları ve sıcaklıklarda deri üstündeki halofiller lipoliziz deriyi olgunlaştırmaktadırlar. Deri endüstrisi uzun yıllardır bakterisidler kullanmaktaydı fakat bakteri direnci artınca bunlar yetersiz kalmış ve haloarkealara karşıda etki gösterememişlerdir. Bir grup Türkiye'deki tuzalarda mikrobiyal popülasyonlar üzerindeki çalışmalarında, haloarkeler dahil olmak üzere onlarıda yok eden lipaz negatif halosin üreten suşları belirlemişlerdir [77].

2.4.2.3. Tekstil Endüstrisi

Tekstil endüstrisi, azo boyaları, fenolü ve toksik anyonları içeren büyük miktarda kirli atık su üretmektedir. Atık su aynı zamanda tuzludur ve %15-20'lik tuz konsantrasyonlarına sahiptir. Bu atık sulardan *Salinicoccus iranensis* ve *Halomonas* sp. üyeleri gibi orta derecede halofiller izole edilmiş, azo boyaları renksizleştirdiği (boya giderimi), birincil karbon ve enerji kaynağı olarak fenolü kullanabilecekleri ortaya çıkarılmıştır [78]. Aynı çalışmada ayrıca tekstil endüstrisindeki organik kirleticilerin arıtılması da rapor edilmiştir.

2.4.3. Biyoyakıt Üretimi

Hipersalin ortamlarda mikroalgler biyokütle ve biyoyakıt üretiminde karbondioksit, su ve güneş ışığı kullanılarak yetiştirilmektedir. Yakın gelecekte dünya çapında taşımacılık sektörünün önemli bir kısmını biyoyakıtların oluşturacağı vurgulanmaktadır. Sonuç olarak, bu mikroorganizmaların mono-kültürlerinin üretilerek, büyük ölçekli kültürlerinin geliştirilmesi ve bu tekniklerin oluşturulması için büyük çaba harcanmalıdır. Bazı araştırmacılar petrol üretimi aşamalarında halofilik mikroorganizmaların kullanımını

araştırmaktadır. Yılda bir dönüm başına soya fasulyesinden yaklaşık 50 galon yağ üretilirken, kanoladan yaklaşık 130 galon ve bazı yosunlardan ise yılda yaklaşık 4000 galon üretilmektedir [79]. Mevcut teknoloji kullanılarak, bazı tek hücreli alglerin taşımacılıkta kullanılabilecek biyoyakıtlara dönüştürülmesi ve işlenebilir olabileceği rapor edilmiştir. Bu prosesin önemli bir avantajı, şuan kullanılan temiz su ve ekilebilir kültür arazilerini en aza indirmek ve bunların yerini tarıma elverişli olmayan arazi ve suyun almasını sağlamaktır. Ayrıca tek hücreli alglerin üretimleri mevsimsel değil, günlük olarak yapılabilecek ve hasat edilebilecektir.

2.4.4. Sağlık Uygulamaları

Halofillerin tıbbi uygulamalar için kullanımı henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, bu mikroorganizmaların bazı yeni özellikleri, güvenilirlikleri ve büyüme potansiyelleri gelecekteki uygulamalar için önemli bir faktör teşkil etmektedir. Haloarkelerin adjuvan protein, yağ vezikülleri, mikrosidal halosinler ürettiği ve plastikleri biyodegrade edebildiği gösterilmiştir. Ayrıca haloarkelerin reaktif oksijen türlerinin hasarlarını hafifleten fitokimyasal maddeler ve hücreleri zararlı radyasyona karşı koruyan DNA onarım enzimleri de bulunmaktadır. Halofilik ürünlerin tıbbi ve ilaç endüstrisinde uzun vadede kullanılabilme potansiyelleri bulunmaktadır.

2.4.4.1. Biyoplastikler

PHA, mikroorganizmalar tarafından sıklıkla bir karbon depolama amacıyla kullanılan heterojen bir poliester grubudur. Halofilik arkeler biyodegrade edilebilir plastikler olarak yüksek miktarda PHA üretmektedir. En yaygın olanı polibetahidroksibütirattır (PHB). PHA'lar termoplastikler yerine kullanılabilir, biyolojik olarak parçalanabilir ve suya dayanıklıdır. Bu nedenle, cerrahi dikişlerde, protezlerde ve gecikmeli salım yapan ilaçlarda kullanılmak üzere tıp ve eczacılık alanında önemi büyüktür [80]. *Haloarcula marismortui* ve *Haloferax mediterranei* gibi haloarkeler, substrat olarak glukoz veya nişastayı kullanarak büyük miktarlarda PHA üretebilmektedirler. *Haloarcula marismortui*, glukoz ile desteklenmiş minimal bir ortamda büyütüldüğünde, hücre kuru ağırlığının %21'ine kadar PHB biriktirdiği görülmüştür [81]. *Haloferax mediterranei*, nişasta takviyeli kültür ortamında büyütüldüğünde litre başına yaklaşık 6 g (toplam biyokütle kuru ağırlığının %60'ı) PHB biriktirmektedir bu da çok ucuz bir substrat olarak karşımıza çıkmaktadır [82]. Haloarkeal hücrelerin saf suda (tuzsuz) kolayca liziz olmaları, PHA granüllerinin izolasyonunu nispeten kolaylaştırmaktadır.

2.4.5. Halofillerdeki Enzimler

Halofillerdeki enzimler, yüksek tuz konsantrasyonlarında kararlılık göstermektedirler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında optimum aktivite göstermeleri, yapılarının bozulmamasında tuzun koruyucu rolünün olması, denatürasyona karşı dirençli olmaları ve düşük su içeren ortamlarda veya sulu olmayan ortamlarda katalizör yeteneklerinin olması halofilik enzimlerin özellikleri olarak belirtilmektedir [83]. Halofillerin endüstriyel enzimleri ve bazı özellikleri Tablo 2.1. 'de özetlenmiştir [84].

Tablo 2.1. Bazı Halofilik Mikroorganizmaların Endüstriyel Öneme Sahip Enzimleri [84].

Enzimler	Mikroorganizmalar	Özellikler
Alkol dehidrogenazlar	<i>Haloferax volcanii</i>	Kararlı çözücü
Alkalın fosfatazlar	<i>Halomonas</i> sp. 593	Fosfomonoester hidrolizi
α -amilazlar	<i>Amphibacillus</i> sp. NM-Ra2	Tuz, sıcaklık ve sürfektan kararlılığı
	<i>Exiguobacterium</i> sp.	Kararlı çözücü ve ekmek endüstrisi
	<i>Marinobacter</i> sp. EMB8	Kararlı çözücü ve maltooligosakkarit sentezi
	<i>Saccharopolyspora</i> sp. A9	Deterjan formülasyonu
	<i>Nesterenkonia</i> sp. strain F	Nişasta hidrolizi
Selülazlar	<i>Aspergillus terreus</i> UniMAP AA-6	İyonik sıvıya dayanıklı ve lignoselülazların sakkarifikasyonu
	<i>Thalassobacillus</i> sp. LY18	Kararlı çözücü
	<i>Marinobacter</i> sp. MSI032	Alkalın pH'da kararlılık
Kitinazlar	<i>Planococcus rifitoensis</i> strain M2-26	Tuz ve ısıya kararlılık
Esterazlar	<i>Haloarcula marismortui</i>	Alkalın ve tuza kararlılık
β - Galaktosidazlar	<i>Halorubrum lacusprofundi</i>	Tuz ve kararlı çözücülük
	<i>Haloferax alicantei</i>	Tuza kararlılık
Lipazlar	<i>Haloarcula</i> sp. G41	Alkalın ve tuza kararlılık
	<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19	Alkalın, tuz ve ısıya kararlılık
	<i>Salicola</i> sp. strain IC10	Alkalın ve tuza kararlılık
Nükleazlar	<i>Bacillus</i> sp.	Alkalın, tuz ve ısıya kararlılık
	<i>Micrococcus varians</i>	Alkalın ve tuza kararlılık
	<i>Bacillus</i> sp. EMB9	Deterjan formülasyonu ve kararlı çözücü
Proteazlar	<i>Geomicrobium</i> sp. EMB2	Deterjan formülasyonu ve kararlı çözücü
	<i>Halobacterium</i> sp.	Alkalın, tuza kararlılık ve balık sosu kullanımı
	<i>Halobacterium halobium</i>	Kararlı çözücü ve peptit sentezi
Ksilanazlar	<i>Gracilibacillus</i> sp. TSCPVG	Alkalın, tuz, ısı ve aside kararlılık
	<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> NTOU1	Tuza kararlılık
	<i>Halophilic bacterium</i> CL8	pH, tuz ve ısıya kararlılık

Halofilik enzimler yüksek tuzlu ve hipersalin koşullarda endüstriyel uygulamalar için büyük öneme sahiptir. Halofillerdeki amilazlar, proteazlar, nükleazlar, selülozlar, kitinazlar, ksilanazlar, esterazlar ve lipazlarda endüstriyel açıdan öneme sahip özellikler bildirilmiştir. *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Halobacillus* ve *Halothermothrix* cinslerinde bu enzimler incelenmiştir.

Halofillerden yeni ve endüstriyel olarak önemli enzimlerin izolasyonu, karakterizasyonu; tuzun, sıcaklığın, alkali ve organik çözücü stabilitesinin benzersiz özellikleri, endüstriyel olarak stabil enzimlerin farklı alanlarda talebini karşılayabilmektedir. Halofillerin çok farklı ekstrem koşullar altında istikrarlı oldukları açıktır. Bu nedenle bunlar hipersalin kirliliklerin iyileştirilmesinde, peptit sentezlerinde, deterjanlarda, tekstil, ilaç ve gıda endüstrisi gibi bazı endüstriyel uygulamalarda tercih edilen katalizörler olarak önerilmektedirler [85].

Enzimlerin kaynağı olarak orta dereceli halofilik bakteriler çok yönlü olarak kullanılabilirler. Bu durum, aşırı halofillere kıyasla bir avantajdır, zira orta dereceli halofil bakterilerin ekstrem tuz ihtiyacı yoktur ve geniş tuz aralığı içinde büyümektedirler. Bu halofilik izolatlardan elde edilen amilaz, lipaz ve proteazın çözücü kararlılığı, oligosakkaritler, esterler ve peptidlerin sentezinde su içermeyen ortamlarda enzimoloji çalışmaları için potansiyel olarak yararlı olabilmektedir [86].

İran'da çöl bölgesinde bir hipersalin gölü olan Howz Soltan Playa'dan 231 orta derecede halofilik bakteri izole edilmiştir ve lipaz, amilaz, proteaz, inulinaz, ksilanaz, selüloz, pullulanaz, DNaz ve pektinaz aktivitesi açısından taranmıştır [87]. Sonuç olarak, Gram-pozitif halofilik çubuklar, Gram-negatif bakteriler ile karşılaştırıldığında daha fazla hidrolitik aktivite göstermişlerdir. Bir başka örnek olarak, halofilik bakteriler, Güney Okinawa Çukurunun derin deniz çöktellerinden izole edilmiştir ve sonuçlar, izolatların %72,4'ünden fazlasının amilaz, proteaz, lipaz ve DNaz gibi ekstraselüler hidrolitik enzim aktivitesi gösterdiğini ve yaklaşık %59,2'sinin soğukta aktif ekzoenzim üreticileri olduğunu göstermiştir. Hem RNaz hem de DNazdan oluşan nükleazlar halofilik *Bacillus* sp. ve *Micrococcus varians*'dan izole edilmiştir. Saflaştırılmaları jel filtrasyonu, kromatografi, ön-çöktürme gibi klasik saflaştırma işlemleriyle elde edilmiştir. *Bacillus* sp. ve *M. varians* 'ın optimum pH'ları birbirlerine yakındır. Bununla birlikte, halofilik *Bacillus* sp. DNaz aktivitesi 50 °C ve RNaz aktivitesi 60 °C iken *M. varians* 'ın optimum sıcaklığı 43 °C veya daha düşüktür [88]. Bir başka çalışmada, *Salinicoccus* cinsine ait türlerin, amilaz, proteaz,

inulinaz ve jelatinaz gibi hücre dışı enzimleri üretme potansiyeline sahip olduklarını, ancak lipaz aktivitelerine sahip olmadıklarını göstermiştir [89].

Halofilik mikroorganizmalar endüstriyel Polihidroksialkanatlar (PHA) üreticileridir. PHA, plastik endüstrisinde geniş bir potansiyel uygulaması olan mikrobiyal hücre içi biyopolimerdir. İki *Halomonas* suşunun (yeni bir izolat olan, *Halomonas* sp. O-1 ve genomu sekanslanmış suş *Halomonas elongata* DSM2581) PHA sentaz genleri (phaC1 ve phaC2) yakın zamanda klonlanmıştır ve ifade edilmiştir [90]. Klonlanmış phaC1HO1 ve phaC1He genlerinin, *Escherichia coli* JM109 ve *Ralstonia eutropha* PHB-4'te eksprese edildiğinde işlevsel oldukları bulunmuştur. Bu rekombinant PHA sentaz enzimi ilk halofilik ve polimer üreten enzim olmuştur.

Ksilanazlar, hemiselüloz kompleksinde ksilan'ı parçalayan enzimlerdir, bu da, kullanılabilir biyokütle için büyük bir rezervi temsil etmektedir [91]. Yeni bir halofilik bakteri olan CL8 suşundan iki aşırı derecede halo-toleranslı endo-ksilanaz Xyl1 ve Xyl2 saflaştırılmış ve ilk kez karakterize edilmiştir [92]. Enzimlerin saflaştırılması, anyon değişimi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Xyl1 ve Xyl2 enzimleri sırasıyla 43 kDa ve 62 kDa'lık bağlı molekül kütlelerine sahiptirler. Enzim aktivitesi Ca^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Li^{+2} , NaN_3 ve izopropanol tarafından uyarılmıştır. En iyi aktivite 1 M NaCl'de gözlemlenmiştir, ancak her iki enzim için de önemli miktarda aktivite 5 M NaCl'de azalmıştır. Başka bir tarama çalışmasında, evaporatif havuzlardan 87 bakteri izolatu elde edilmiştir ve karakteristik özelliklerine göre gruplara ayrılmıştır. İzolatlar, ksilanaz, mannanaz ve selüloz aktiviteleri için taranmıştır. *Nesterenkonia* sp. Sua-BAC020, %10 NaCl'de pH 8'de kültüre edildiğinde bir halofilik ksilanaz üreticisi olarak bulunmuştur [93]. Aerobik ksilanolitik *Gracilibacillus* sp. TSCPVG, düşük ve yüksek tuzlulukta (%1-30) ve nötr ile alkalik pH (6.5-10.5) aralığında hayatta kalabilen benzersiz geniş istikrar profiliyle bildirilmiştir. Ksilanaz kısmen aseton, etanol ve amonyum sülfat içeren çökeltme aşamalarıyla saflaştırılmıştır. Bu *Gracilibacillus* sp. suşu hemiselülozu degrade eden haloalkali-termotolerant enzim kaynağı olarak ilk kez rapor edilmiştir [94]. Denizden *Bacillus pumilus* suş GESF-1'den elde edilen haloalkalin ksilanaz da rapor edilmiştir [95]. Enzim aktivitesi, iyonlarla (Ca^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+}), organik reaktiflerle (β -merkaptotanol, EDTA) ve ağır metallerle (Hg^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , Cd^{+2} ve Zn^{+2}) inhibe olmaktadır. Başka bir çalışmada, ekstrem bir halofilik ksilanaz, *Chromohalobacter* sp. TPSV 101'den, ultrafiltrasyon, hidroksilapatit ve jel filtrasyon kromatografisiyle hazırlanmıştır. Ksilanazın

moleküler ağırlığı, literatürde bildirilen ksilanazlar arasında en düşük olan 15 kDa olarak rapor edilmiştir. Ksilanaz, pH 9.0 ve 65 °C'de maksimum aktiviteye sahipken, pH 7.0-9.0 aralığında ve sıcaklık 50 °C ile 70 °C arasında %15-25 NaCl varlığında sabittir. *Chromohalobacter* sp. TPSV 101'in ksilanaz aktivitesi, Hg⁺² iyonları tarafından tamamen engellenmiş fakat Ca⁺², Cu⁺² ve Pb⁺² iyonları tarafından kısmen engellenmiştir; Zn⁺², Mn⁺² ve Co⁺² iyonları aktivitesini arttırmıştır [96]. Halofilik ksilanazların rekombinant üretimiyle ilgili araştırmalarda bulunmaktadır. *Bacillus subtilis* cho40'ın xyn40 geni, *E. coli*'de klonlanmıştır ve eksprese edilmiştir [97]. Benzer şekilde *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1'in xynFCB geni *E. coli* BL21 (DE3)'e eksprese edilmiştir [98].

Selülozlar, selülozun şekerlere hidrolizini katalize eden hidrolitik enzimlerdir ve biyoetanol ve biyo-esaslı ürünlerin eldesiyle enerji üretmek üzere fermente edilebilirler. Halofilik ya da halotolerant bakterilerden izole edilen selülaz üzerine çeşitli çalışmalar bildirilmiştir. *Salinivibrio* sp. NTU-05'den halostabil selülaz [99]; yeşil deniz yosunu *Ulva lactuca*'dan izole edilen *Bacillus flexus*'tan alkali-halotolerant selülaz [100]; deniz bakterisi *Bacillus aquimaris*'den organik çözücü stabil alkalın selülaz [101]; ve *Artemia salina*'den elde edilen karboksimetil selülaz bu çalışmalara örnek olarak verilebilir [102].

Salinibacter ruber'den iki farklı sitoplazmik glutamat dehidrogenaz (GDHI ve GDHII) aktivitesi bildirilmiştir [103]. GDHII, hem aktivite hem de stabilite için yüksek tuz konsantrasyonlarına bağımlı iken, GDHI, sadece stabilite için yüksek tuz konsantrasyonlarına güçlü bir bağımlılık göstermiş olup, tuzların yokluğunda ise maksimum aktiviteye sahiptir.

Bakteriyel glisin-betain sentezleyen enzimler, günümüzde genetik olarak stres toleransını hedefleyen strese dirençli transgenik bitkilerin oluşturulmasında büyük bir ilgi odağı haline gelmiştir. Daha önce belirtildiği gibi, uyumlu çözünenler su eksikliği olan koşullar için değerlidir. Glisin-betain, bir betain-aldehit ara ürünü vasıtasıyla kolin'in kolin dehidrojenaz (EC 1.1.99.1) tarafından oksidasyonu ile katalize edilmektedir. Bu nedenle, varsayımsal bir kolin dehidrojenaz kodlayan orta dereceli halofil *Halomonas elongata* betA geni, *E. coli*'ye klonlanmış ve eksprese edilmiştir, ancak saflaştırma, enzimin in vitro kararsızlığı nedeniyle engellenmiştir [104].

Alkalın fosfataz (ALP), nükleotidler, proteinler ve alkaloidler gibi iyi bilinen periplazmik enzimlerin de bulunduğu pek çok molekülün fosforilasyonundan sorumlu enzimdir. Halofilik Archaea'ya kıyasla, orta derecede halofil bakterilerin ALP raporları

neredeyse *Vibrio* sp. üyeleri ile sınırlıdır. Orta dereceli halofil *Halomonas* sp. 593'ten alınan alkalın fosfataz geni (HaALP), *E. coli* BL21Star (DE3) pLysS geni aktif olmayan biçimde eksprese edilmiştir [105]. Jel filtrasyonu ile dört fraksiyona ayrılarak saflaştırılmış rekombinant HaALP, inaktive edilerek, fraksiyonlar, 3 M NaCl ihtiva eden 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)/2 mM MgCl₂ tamponuna karşı diyalize tabi tutulmuştur ve sonuçta, bu dört fraksiyondan biri tam etkinlik için aktive edilmiştir.

β -laktamaz antibakteriyel direncin ana nedenidir ve Gram negatif bakterilerde periplazmik bölgeye lokalizedir. β -laktamazların ısıya dayanıklı olduğu rapor edilmiştir; bununla birlikte, orta derecede halofilik bakteri *Chromohalobacter* sp. 560'dan bir halofilik β -laktamaz, ısı inaktivasyonuna karşı oldukça kararlıdır, yani 0.2 M NaCl varlığında 5 dakika kaynatıldıktan sonra aktivitesinin %75'ini korumuştur [106]. Bu çalışma halofilik β -laktamazın yüksek sulu çözünürlüğe sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, β -laktamaz, protein çözünürlüğünün artırılması, "katlanması zor" heterolog hedef proteinlerin katlanması ve ekspresyonu için yeni bir füzyon etiketi proteini olarak seçilmiştir.

2.4.5.1. Amilaz

α -amilazlar (E.C.3.2.1.1), nişasta içindeki glikozidik bağların hidrolizini katalize eden ve glikoz, maltoz ve maltotrioz birimlerinden oluşan düşük molekül ağırlıklı polimerler oluşturan enzimlerdir [107].

Amilazlar, gıda, fermentasyon, tekstil, kâğıt, enerji ve ilaç endüstrileri ile ilgili çeşitli proseslerde yaygın potansiyel uygulamaları olan en popüler endüstriyel enzimlerdendir. Gıda endüstrisinde, amilaz esas olarak nişastayı, fruktoz ve glikoz şuruplarına dönüştüren nişasta sıvılaştırma sürecinde kullanılmaktadır [108]. Şurup üretiminin yanı sıra, işlenmiş gıda endüstrisinde, pişirme, demleme, sindirim yardımcıları ve meyve suları hazırlama işlemleri ile ilgili olarak da kullanılmaktadır. Amilazlar nişasta içerikli gıdalardan (örneğin, patates, krema, çikolata) daha küçük oligosakkarit kalıntıları temizleme özelliği olan deterjanları geliştirmek için, çamaşır ve bulaşık sıvı deterjanlarında yaygın olarak kullanılan enzimlerden biridir. Amilazlar ayrıca biyoetanol üretiminde de kullanılmaktadır, çünkü neredeyse her coğrafi bölgede düşük fiyat ve kullanım kolaylığı nedeniyle nişasta en yaygın kullanılan substrat olmuştur. Amilazlar, mayalar tarafından biyoetanol üretiminin sakkarifikasyon adımı nişastayı glikoz gibi mayalanabilir şekere dönüştürmek için kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde desikasyon işlemleri için amilazlar kullanılmaktadır. Her bir enzim uygulaması farklı optimal koşullar gerektirmektedir. Örneğin, nişasta

endüstrisinde düşük pH aktivitesine sahip amilazlar tercih edilmektedir. Öte yandan, daha düşük sıcaklıklarda ve daha yüksek pH'da aktivite ve oksidatif stabilite, deterjanlardaki amilazların tercihi için önemli kriterlerdir; buna karşın, daha yüksek sıcaklıktaki aktivite, leke giderme süresini kısaltmak için gereklidir [109].

Halofilik mikroorganizmalar tarafından üretilen amilazlar yüksek tuzluluk derecelerinde aktif olabilmektedir ve bu nedenle deterjan endüstrisinde ve nişasta hidrolizinde sert işlem koşullarında kullanılabilirler [110]. Halofilik amilazlar ile ilgili erken araştırmalar *Halobacterium halobium*'da incelenmiş ancak diğer halofil bakteriler de dahil olmak üzere birçok organizmada araştırılmıştır [111]. Halofilik amilazlar, *Chromohalobacter* sp., *Halobacillus* sp., *Halomonas meridiana*, *Streptomyces* sp., *Marinobacter* sp., *Bacillus dipsosauri* gibi halofil bakterilerden elde edilmiştir [112].

Halofilik bakterilerden elde edilen amilazlar için enzim aktivitesi optimum pH 6-7 aralığında ve optimum sıcaklık ise 45-65 °C aralığındadır. Halofil bakterilerden *Marinobacter* sp. EMB8'den elde edilen amilaz, 80 °C'de aktiviteye sahiptir. Bakterilerce üretilen halofilik amilazların moleküler ağırlığı *Thalassobacillus* sp. LY18'de 31 kDa, *Nesterenkonia* sp. suşu F'de 100 kDa'dır. Bununla birlikte, halobakteriyel amilazların geri kalan kısmı moleküler ağırlığı 50 kDa ile 65 kDa arasında değişmektedir. Halofilik amilazların rekombinant üretimleri de gerçekleştirilmiştir. Amilaz geni amyA *Halothermothrix orenii*'den saflaştırılmıştır. Aktivitesi için en uygun tuz konsantrasyonu %5 olan enzimin, rekombinantının tuz toleransı %25'e kadar çıkabilmektedir [113]. *Escherichia coli* JM109'dan elde edilen bir halofilik α -amilaz (EAMY) geni başka bir *E. coli* suşuna eksprese edilmiştir ve rekombinant protein saflaştırılmıştır. *E.coli* halofilik olmamasına rağmen, EAMY'nin enzimi yüksek Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarının varlığında aktivite göstermiştir. Bu amilazın en yüksek aktivitesi 55 °C'de ve pH 7.0'de 2 M NaCl varlığında görülmüş ve halofilik olmayan bakteriden elde edilen ilk çalışma olarak bildirilmiştir [114].

Halofilik amilazların kristal yapılarını açığa çıkaran çok az çalışma bulunmaktadır. *Halothermothrix orenii*'den AmyA'nın kristal yapısı, yüksek tuzlulukta protein stabilitesi için gerekli olduğu düşünülen korunmuş asidik bir yüzeyi olduğunu göstermiştir. Ek olarak, aynı bakterinin membrana bağlı, halofilik ve termostabil α -amilaz, AmyB'nin kristal yapısı da bildirilmiştir [115].

2.4.5.2. Proteazlar

Proteazlar, proteinleri sulu ortamda daha küçük polipeptitlere, peptit veya amino asitlere kadar dönüştürmektedir. Proteazların çoğu genellikle inaktiftir çünkü düşük su veya çözücü ortamında ters reaksiyon oluşmaktadır. Deterjan, deri, gıda ve eczacılık gibi çeşitli endüstrilerde farklı proteaz tipleri tercih edilmektedir [116].

Proteazlar, mikrobiyal orijinli hidrolitik enzimlerin en yaygınıdır ve en büyük çalışma grupları arasındadır. Proteazların en yaygın kullanımı deterjan ve gıda endüstrisinde göze çarpmaktadır. Son zamanlarda ilaç endüstrisinde ve biyolojik iyileştirmede kullanılması nedeni ile daha fazla dikkat çeken enzimlerdendir. Deterjanlarda ve gıda endüstrilerinde kullanılmaları nedeniyle proteazlar üzerine yoğun araştırma yapılmıştır. *Pseudomonas* sp. A-14 suşu tarafından üretilen bir hücre dışı proteazın optimum etkinliğinin %18 NaCl ve pH 8 olduğu tespit edilmiştir [117].

Serin proteazları, aktif bölgede serin grubunun varlığı ile karakterizedir ve farklı gruplara ayrılmışlardır. Serin alkalın proteazlar, tirozin, fenilalanin veya lösin içeren bir peptid bağı hidrolize etmektedir ve yüksek pH'da optimum aktivite göstermektedir. Subtilin, ticari olarak öneme sahip olan *Bacillus* kaynaklı serin proteazıdır. Metalloproteazlar, aktivite için iki değerli bir metal iyonu gereksinimi olan katalitik tip proteazların en bilinenidir. Bu proteazlara ek olarak, aspartik proteazlar da dahil olmak üzere birçok başka proteaz tipide bilinmektedir. Ticari proteazlar çoğunlukla mezofilik organizmalardan, özellikle *Bacillus*'dan saflaştırılmıştır; bununla birlikte, halofillerdeki proteazların, yüksek tuzluluk ve geniş alkalın pH aralığında aktif olmasının yanı sıra farklı avantajları da vardır. Endüstriyel değerli proteazların solvent ortamında kararlı olması beklenmektedir. Bilinen proteazların çoğu, organik çözücüler içerisinde inaktive edilmekte veya düşük katalitik aktiviteler göstermektedir. Son yıllarda, *Salinivibrio* sp. suş AF-2004'ten elde edilen halofilik serin metalloproteaz, *Geomicrobium* sp. EMB2'den ve *Virgibacillus* sp. SK33'den elde edilen halofilik serin proteazların organik çözücülerde kararlı olduğu rapor edilmiştir. Dahası, *Geomicrobium* sp. EMB2, haloalkalifik *Bacillus* sp. ve *Bacillus mojavensis* A21'den elde edilen serin proteazlarının, deterjan endüstrisinde kullanıldığı bildirilmiştir [118].

Halofilik proteazlar, *Chromohalobacter* sp., *Halobacillus* sp., *Bacillus* sp. ve *Pseudoalteromonas ruthenica* gibi halofil bakterilerden izole edilmiştir. Halobakterlerin yanı sıra, halotolerant mikroorganizmalardan saflaştırma girişimleri de vardır. Örneğin Ateş ve meslektaşları 2007'de alkalın proteaz üreticisi olarak halotolerant *Bacillus licheniformis*

BA17 suşunu bildirmiştir. Halofilik proteazların rekombinant üretimleri de sınırlı sayıdaki çalışmalarla elde edilmiştir. RapT geni proteaz üretmek için klonlanmıştır ve *Vibrio metschnikovii* suş RH530'dan hücre dışı bir SDS'ye dirençli alkalın proteazın (VapT) 3D yapısı karakterize edilmiştir [119]. 2011 yılında Karan ve arkadaşları, *Geomicrobium* sp. EMB2'den bir halofil serin proteaz geni klonlamış ve sekanslamışlardır.

2.4.5.3. Lipazlar ve Esterazlar

Esterazlar (EC 3.1.1.X), esterlerin bir asit veya bir alkol içerisine hidrolizini katalize etmekte ve ester bağlarını sentezlemektedirler. Lipazlar (E.C. 3.1.1.3), esteraz enzim grubunun karboksil ester hidrolazlarıdır ve uzun zincirli açıl gliserollerin ayrışmasını ve oluşumunu katalize etmektedirler. Lipazlar, çeşitli ökaryotlar ve prokaryotlar gibi birçok farklı mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir [120]. Lipazlar esasen suda çözünmeyen substratlara karşı aktiftir, ayrıca uzun zincirli yağ asitlerinden oluşan trigliseritlerden oluşmaktadırlar ve basit esterleri katalize etmektedirler [121].

Lipazların çok özel kimyasal veya biyolojik dönüşümünü gerçekleştirme kabiliyeti, onları gıda, deterjan, kâğıt, kozmetik, organik sentez, zirai mücadele, yakıt ve ilaç endüstrilerinde ve ayrıca kirlilik kontrolünde popüler hale getirmiştir [122]. Soğuğa adapte edilmiş lipazlar çevresel işlemlerde özellikle atıksu arıtımı alanında, yağla kontamine soğuk ortamda biyoremediasyon ve aktif bileşiklerin üretiminde öneme sahiptirler. Benzer nedenlerden ötürü, lipazlar çamaşır deterjanlarında yağ lekelerinin giderilmesi için yararlı bileşenler olmuştur. Öte yandan lipazlar, biyodizel üretiminde yağ asitlerinin esterifikasyonunda önemli bir potansiyele sahiptirler. Mikrobiyal lipazlar biyoteknolojik olarak, organik çözücülerde kararlılığı ile farklı sıcaklıklara adapte edilmiş ve kofaktörlerin yardımı olmadan aktif hale getirilmiştir [123]. Lipazları diğer esteraz tiplerinden ayıran ilginç özellikleri de vardır, suda çözünür kısa zincirli açıl esterleri hidrolize etmektedirler. Genellikle, çözünür substratlar ile esteraz reaksiyonları Michaelis-Menten kinetiği sergilemektedir. Çözünmeyen gliseridlere karşı düşük aktiviteleri vardır ve doygunluk noktasından önce azami reaksiyon hızı elde edilmektedir (Çözünmüş monomerin azami konsantrasyonu). Triaçilgliserol lipazlar su-lipid arayüzünde aktive edilir, substrat monomerik formda iken düşük aktivite gösterirler, lipidlerin emülsiyon oluşturmaya başladığı çözünürlük sınırının üstünde etkinlikleri artmaktadır [124].

Halofilik esterazların, özellikle bakterilerin ürettiği lipazların çok fazla bir örneğine rastlanmamıştır. 2003'te Sanchez-Porro ve ark., [125], İspanya tuzlalarından 892 orta

derecede halofil ve halotolerant eubacteria çevresel izolatu taramışlardır; üretilen hidrolazın daha ileri karakterizasyonu için 122 suş seçmişlerdir. 892 suşun sadece %23'ünde ekstraselüler lipolitik aktivite görülmüştür. Lipolitik enzim aktivitesi ayrıca, Kenya alkalin soda gölünden izole edilen *B. halodurans*, *B. alcalophilus* ve *B. licheniformis* suşlarından da bildirilmiştir [126]. İran'da çeşitli ortamlardan 50 halofilik bakteri ekstraselüler lipolitik aktivite tayini için izole edilmiştir ve daha ileriki çalışmalar için yalnızca *Salinivibrio* sp. SA-2 ayrılmıştır. Bu bakterinin hücre dışı lipazı 0.5 M NaCl'de 50 °C sıcaklıkta ve pH 7.5'da optimum aktivite sergilemektedir [127].

Halofilik lipazların üretimi ile ilgili bazı moleküler çalışmalar da bulunmaktadır. *Vibrio vulnificus* CKM-1'den bir lipaz ve lipaz etkinleştirici protein klonlanmıştır ve ifade edilmiştir [128]. Özellikle Omega-3 PUFA'ların zenginleştirme sürecinde gıda endüstrisinde kullanılabilecek mükemmel özelliklere sahip olan halofil bakteri *M. lipolyticus*'da lipolitik bir enzim gözlemlenmiştir [129]. Orta derecedeki halofil *Marinobacter lipolyticus* SM19'dan bir lipolitik enzim LipBL, *E. coli*'ye klonlanmış ve rekombinant lipaz olarak saflaştırılmıştır. Şaşırtıcı bir şekilde, bu enzimin maksimum etkinliğinin NaCl yokluğunda olduğu bulunmuştur. 0.5 M NaCl ilavesi aktiviteyi %80 inhibe etmiştir, ancak enzim 4 M NaCl konsantrasyonlarında ise %20 aktivite gösterebilmiştir.

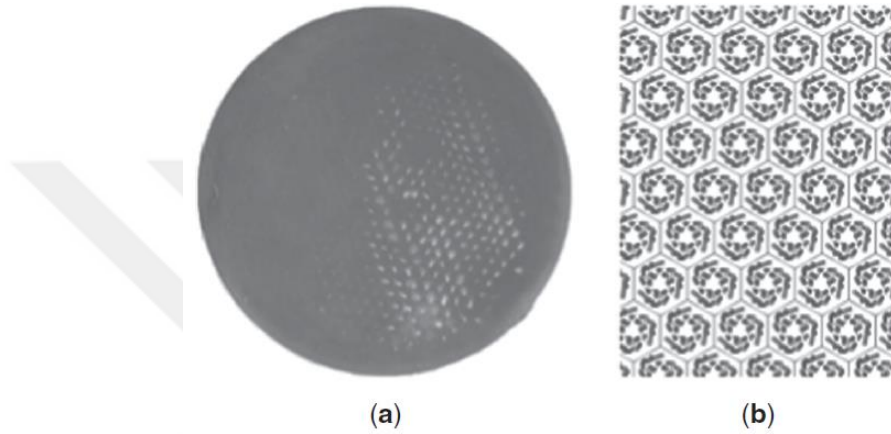
Halofilik lipazların ve enzimlerin biyoteknolojik uygulamalar için ilginç olması, düşük su koşullarında aktiviteyi sürdürme kabiliyetlerinden kaynaklanmaktadır. Sert endüstriyel ortamlarda bu uyarlamalar, DMSO gibi enzimatik reaksiyonların bir organik çözücü içinde yapılmasını gerekebilecek yararlarındandır [130].

2.4.6. Özel Ürünler

Halofiller ticari ilgi uyandıran ve halihazırda kullanılan yeni biyomoleküller üretebilmektedirler. Bunların arasında halofilik arkea retinal proteinleri, ışıkla çalışan proton pompası, bakteriyorodopsin, fototrofik büyüme sağlayan mor membran ve fototaktik tepkilere izin veren sensör rodopsin bulunmaktadır. Örneğin retina proteinlerinden, fotosensör olarak, çeşitli optik cihazlar geliştirilmektedir. Halofil uyumlu çözümler endüstri tarafından yem katkı maddelerinden kozmatik ürünlere kadar geniş bir yelpazede kullanılmaktadırlar [131].

2.4.6.1. Retinal Proteinler

Halobacterium'daki bakteriorodopsin yaklaşık 80 adet ABD patenti ve çeşitli şirketlerin ticari üretimi ile halofillerden türeyen en tanınmış ürünlerden biridir. Bir klorofil sisteminde ışığı kimyasal enerjiye dönüştürme yeteneği ilk olarak haloarkelerde keşfedilmiştir. Bunun için sorumlu apoprotein, bakteriyodopsin yapmak için bir retinal protein ile birleştirilir ve daha sonra haloarkedaki mor renkli membranda iki boyutlu bir kristal diziye dönüştürülmektedir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Haloarkea Bakteriorodopsininin İki Boyutlu Zar Yapısı [132]. a) Üst düzey üreticiler mor renkte hücrelere neden olmaktadır, b) Mor membrandaki iki boyutlu altıgen bakteriorodopsin dizisi, x-ışını difraksiyonuyla gözlemlenmiştir.

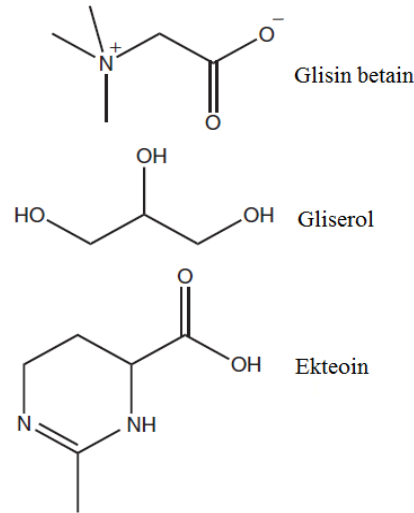
Bakteriorodopsin, güneş enerjisinin en basit biyolojik elektron yakalama molekülüdür ve proton elektrokimyasal potansiyelinin zar geçişli bir gradyanı oluşturmak için ışığı kullanmaktadır [132]. Bakteriorodopsinin birincil yapısı 1970'lerde çözülmüş ve bu başarıyla gerçekleştirilen ilk membran proteinlerinden birisi olmuştur [133]. Bakteriorodopsinin endüstriyel ortamda faydalı olmasını sağlayan birkaç nitelik vardır: İlki, sıcaklık aralığı (0-45 °C) ve pH değerleri (1-11)'inde çok kararludur, ikincisi, reaksiyonları kendi kendine yenilenebilir ve kimyasal, genetik veya immünolojik olarak manipüle edilebilmektedir [134].

ATP sentezi engellenirse, bakteriorodopsin proton gradyanından bir elektrik potansiyeli üretecektir. Mor membrandaki bakteriorodopsin son derece kararludur ve katı substratlar üzerinde tek bir katmanda immobilize edilebilmekte ve fotoelektrik sinyaller üretebilmektedir [135]. Bu özellikler birçok endüstriyel uygulama için ilgi çekici olmaktadır. *Halobacterium* bakteriorodopsini, ışık sensörleri, doğrusal olmayan optikler ve optik veri

işleme için pazarlanmaktadır [136]. Aynı zamanda, silinemez bir fotokromik film olarak da kullanılmak üzere düşünülmektedir. NASA Kennedy Uzay Merkezi'nde, gaz sızıntılarının uzaktan algılanabilmesi için, beyaz ışıklı aydınlatmalı adaptif bir görüntü ızgarası olarak bir bakteriyorodopsin filmi kullanan bir schlieren görüntüleme cihazı önerilmiştir [137]. Bu türden film, kimyasal işleme gerektirmez ve tekrar tekrar kullanılabilir. Ayrıca, bakteriyorodopsin filmleri elektrik sinyallerini iletebilen, modern bilgisayarların entegre devrelerini değiştirebilecek potansiyele sahiptir [138]. Bakteriyorodopsin ışığı elektriksel uyarılara dönüştürebileceğinden, ışık algılayıcı olarak da kullanılabilir. Bunu yapmak için pigmentin ince bir filmi oksit elektrot ile iletken bir jel arasına yerleştirilir. Işık sensöre çarptığında, bakteriyorodopsin tarafından yer değiştiren yük elektrota iletilmektedir. Ayrıca endüstriyel robotlarda bakteriyel rodopsinin kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

2.4.6.2. Uyumlu Çözünenler

Halofiller tuzlu ortamlardaki hücresel su kaybını ya ozmotik olarak dengeli iç tuz seviyelerini artırarak ya da biyomoleküllerin stabilitesini korumak için uyumlu çözeltiler ya da ozmolitler üreterek önlemektedirler. Bu ozmolitler genellikle metabolik işlemleri bozmayan ve fizyolojik pH'da net yükü olmayan şeker (Sukroz, trehaloz), polioller (gliserol) veya amino asitlerdir (glisin-betain, ektoin) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Halofillerin Salın Ortamların Olumsuz Etkilerine Karşı Koyan Bazı Uyumlu Çözünenleri [139].

Halotolerant mayalar ve yeşil algler polioller biriktirirken, çoğu halofilik ve halotolerant bakteri dipolar (çift kutuplu) bileşenler toplamaktadırlar. Uyumlu çözünen

maddeler, biyosentez, de novo (kendiliğinden oluşan), depolama veya ortamdan doğrudan alım yoluyla birikebilir [139].

Ektoin ve türevleri, kozmetikte nemlendirici olarak ve polimeraz zincir reaksiyonlarında stabilizatörler olarak patentlenmiştir [140]. Yaygın bir ozmotit olan glisin betain, yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Biyosentetik olarak *Ectothiorhodospira halochloris* genleri, *Escherichia coli*'de eksprese edilmiş, betain birikimine ve gelişmiş tuz toleransına yol açmıştır. *Halomonas boliviensis*'in, sürekli kesik kültürlerinde ektoin üretimi araştırılmaktadır [141]. Yeşil alg, *Dunaliella salina*, bir emülgatör, yumuşatıcı, koruyucu ortam, besleyici ve besin takviyeleri olarak gliserolün iyi bir ticari kaynağıdır [142].

2.4.6.3. Halosinler ve Mikrohalosinler

Bakterilerin diğer bakterilerin üremesini engelleyen bakteriyosinler ürettikleri yaygın olarak gösterilmiştir ancak arkelerde üretilen antimikrobiyal maddeler hakkında sınırlı bilgiler vardır. Arkelerin antibiyotik duyarlılıklarının bakterilerden önemli ölçüde farklı olduğu bilinmektedir ve bununla birlikte haloarkelerin antibiyotik özellikli moleküller ürettikleri gösterilmiştir [143]. Bu moleküllere halosinler ve mikrohalosinler denmektedir ve sırasıyla proteinler ve peptitlerden oluşmaktadır [144]. Rekabetin azaltılması ve diğer organizma hücrelerinin kendi besinlerini tamamlamaya uygun hale getirilmesinde yardımcı oldukları hipotezi ileri sürülmektedir.

Halosin protein konsantrasyonu artırılarak ortadan kaldırılan bakteri hücreleri miktarının belirlenmesi ile halosinlerin antibiyotik olarak test edilmesi araştırılmaktadır. Antimikrobiyal özelliklerine ilaveten, halocin H6, memeli hücrelerinde Na^+/H^+ eşanjörünü (NHE) inhibe edebilmektedir. Bu özellik miyokard dâhil olmak üzere dokuları, kan iskemik koşullardan sonra oluşan hasarlardan korumaktadır. Halen halosin H6, memeli hücrelerinin NHE'sinde spesifik bir önleyici etki yapan tek bilinen biyolojik moleküldür. Mikrohalosinler "pro-proteinler" olarak başlarlar ve daha sonra halen araştırılmakta olan bir mekanizma yoluyla nihai formlarına dönüştürülürler. Örneğin, haloarkeal S8a suşundan alınan mikrohalosin S8, hidrofobiktir ve bu durum etki tarzını aydınlatmayı zorlaştırmaktadır. Halosin ve mikrohalosin hedeflerini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır. Konukçu organizmalar haloarkeler ve bakterilerdir. *Haloferax gibbonsii* (Ma2.39)'den H6 ve mikrohalosin S8'in 100 °C'ye yakın sıcaklıklarda yaklaşık etkinliklerinin %50'sini muhafaza ettiği bulunmuştur. Bu proteinlerin gelecekte antimikrobiyal ve farmasötik ürün geliştirme de umut verici uygulamaları bulunmaktadır [145].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışma Alanı, Ayvalık Tuzlası

Proje materyali olarak halofilik bakterilerin kaynağını literatür taraması sonucu detaylı çalışılmamış bir alan olduğunu tespit ettiğimiz Ayvalık Tuzlası (Balıkesir) oluşturmaktadır. Halofilik bakteri izolasyonu için Ayvalık Tuzlası'nın birbirinden farklı 10 tuz havuzu seçilerek, farklı zaman aralıklarında usulüne uygun olarak tuzlu su örneklemeleri gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasallar

Çalışmada Sodyum Klorür (NaCl), Potasyum Klorür (KCl) Atabay marka MW74.55, Magnezyum Sülfat (MgSO₄) BioShop MAG522.500 , Yeast Ekstrat Oxoid LP0021, Agar agar Oxoid LP0011, Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O) Riedel-de Haen 25116, Sodyum Klorid Dihidrat (CaCl₂.2H₂O) BioShop CCL302.1, Pepton Oxoid LP0037, Çözünür nişasta (C₆H₁₀O₅) Merck, Demir Sülfat Heptahidrat (FeSO₄.7H₂O) Sigma-Aldrich, D(+) Glukoz Monohidrat Fluka 49158 olarak kullanılmıştır.

İzolatların enzim potansiyellerinin belirlenmesi için kullanılan substratların ticari marka ve kodları: Kazein Fluka 22080, Pektin Sigma P9135, Karboksi Metil Selüloz (CMC) Fluka 21900, Çözünür Nişasta Merck 1.01252.0250, Ksilan Sigma X0502 ve Tribütirin Agar (TBA) Sigma-Aldrich 91015'dir.

Besiyerleri

Besiyeri 1: SG Medium Modifiye 1 (SGM-1)

Sodyum sitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	3	Gram (g)
Maya Özütü	1	g
Tuzlu Su (HV-5)	1	Litre (L)
Agar	20	g
pH	7.5	

Besiyeri hazırlandıktan sonra ilk pH'sı 5.7'dir. pH 1 N NaOH ile 7.5'e ayarlanmış ve otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edilmiştir. Ekstrem halofil mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmıştır.

Besiyeri 2: SG Medium Modifiye 2 (SGM-2)

Glukoz	3	g
--------	---	---

Maya Özütü	2	g
Agar	20	g
Tuzlu Su (HV-5)	1000	Mililitre (mL)
pH	7.5	

Besiyerinin hazırlandıktan sonra ilk pH'sı 6.87'dir. pH 1N NaOH ile 7.5'e ayarlanmış ve otoklavda 121 °C' de 20 dakika steril edilmiştir. Ekstrem halofil mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmıştır.

Besiyeri 3: SG Medium Modifiye 3 (SGM-3)

NaCl	150	g
KCl	2	g
CaCl ₂ .6H ₂ O	2	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	10	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0023	g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	3	g
Maya Özütü	1	g
Pepton	1	g
Agar	20	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.5	

Besiyeri hazırlandıktan sonra ilk pH'sı 6.7'dir. pH 1N NaOH 7.5'e ayarlanmış ve otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edilmiştir. Ekstrem halofil mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmıştır.

Besiyeri 4: Seyreltmeli SGM-2 İzolasyon Besiyeri

Besiyeri 2.'nin 2 tane 10-1 'lik seyreltme suyunun (% 15 deniz tuzu + 120 ml steril su şeklinde) hazırlanmış halidir.

NaCl	% 9 deniz tuzu + 60 g ekstra deniz tuzu	
Glukoz	3	g
Maya Özütü	2	g
Pepton	2	g
Agar	20	g
Su (HV-5)	1000	ml
pH	7.5	

Besiyeri pH'sının ilk ölçümü 6,3'dür. Besiyeri 1N NaOH 7,5'e ayarlanır ve seyreltme sularıyla beraber otoklavda 121 °C' de 20 dakika steril edilmiştir. Steril hazır petri kaplarına 20 ml dağıtılarak kullanıma hazırlanmıştır. Ekstrem halofil mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmıştır.

Besiyeri 5: SG Medium Modifiye 2 Broth

Besiyeri 2.'nin agar içermeyen şeklidir. Broth zenginleştirme amaçlı kullanılmıştır. Çalkalamalı olarak 28 °C'de 7-28 gün inkübe edilmiştir.

Besiyeri 6: SG Medium Modifiye 3 Broth

Besiyeri 3.'nün agar içermeyen şeklidir. Broth zenginleştirme amaçlı kullanılmıştır. Çalkalamalı olarak 28 °C'de 7-28 gün inkübe edilmiştir. İzolatların sıvı kültürlerinin ve stoklarının oluşturulmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 7: Enzim Aktivitesi Belirleme Ortamı

Substrat (Ksilan, CMC, Pektin, Kazein, Çözünür Nişasta; her birinden ayrı ayrı)	0.8-1	g
Pepton	5	g
Yeast Ekstrakt	3	g
NaCl	50	g
Agar	17	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.5-8.0	

Ayrı ayrı olmak üzere her bir substrattan 0.8-1.0 gr olacak şekilde besiyerine eklenerek, içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış, ortam pH'sı 7.5'ye ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Besiyeri halofilik bakterilerin katı ortamda enzim hidroliz zonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 8: Tributirin Agar

Tributirin Agar Base (Sigma-Aldrich 91015)	20	g
Tributirin	10	mL
NaCl	50	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.5-8.0	

Besiyeri 9: Sıvı Ortamda Enzim Üretim Besiyeri

Substrat (Ksilan, CMC, Pektin,

Çözünür Nişasta; her birinden ayrı	1	g
ayrı)		
Pepton	5	g
Yeast Ekstrakt	3	g
NaCl	100	g
Distile Su	1000	ml
pH	7.5-8.0	

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış ve 121 °C’ de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda sıvı ortamda fermentasyon ile enzim üretiminde kullanılmıştır.

Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

İyodür Solüsyonu

Potasyum iyodür	2	g
İyot	1	g
Distile su	300	ml

Kullanılan iyodür solüsyonu; potasyum iyodür ve iyotun havan içerisinde iyice ezilerek karıştırılması ve yavaş yavaş su eklenmesi ile hazırlanmıştır. Işıktan korumak için koyu renkli şişelerde saklanmıştır. İzole edilen Halofilik bakterilerin, ksilanaz, pektinaz, selülaz ve amilaz hidroliz zonlarının katı ortamda belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Kristal Violet

Kristal viole	0.125	g
Etil alkol (%95 lik)	10	mL
Amonyum oksalat	0.4	g
NaCl	5	g
Distile Su	40	mL

10 mL etanolde 0.125 gr Kristal Violet ve 40 mL tuzlu distile suda 0.4 gr amonyum okzalat çözülür bu çözeltiye alkolde çözülmüş olan Kristal Violet ilave edilir [146]. Halofilik bakterilerin gram reaksiyonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

NaOH

NaOH	2	g
Distile Su	500	ml

500 mL 0.1 N için 2 g NaOH hassas tartıda tartılır ve bir miktar saf suyla çözündükten sonra 500 mL'ye tamamlanır. Işıktan korumak için koyu renkli şişelerde saklanmıştır. Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak için kullanılmıştır.

Dinitrosalisilik Asit (DNS) Reaktifi

2 N NaOH (%8)	20	mL
3.5-Dinitrosalisilik Asit (DNS)	1	g
Sodyum Potasyum Tartarat (SPT)	30	g

20 mL 2 N NaOH içerisine 1 g DNS ilave edilip manyetik karıştırıcıda ve hafif ısıda iyice erimesi sağlandıktan sonra hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Üzerine 30 g SPT ilave edilerek 5-10 dk. karıştırıldıktan sonra çözelti hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti oksijenden etkilendiği için ağzı hava almayacak şekilde sıkıca kapatılarak karanlıkta saklanmıştır. Ksilanaz, amilaz, pektinaz ve selüloz aktivitesinin sıvı ortamda analitik ölçümleri amacıyla indikatör olarak kullanılmıştır.

DNS Substratları

Substrat (Ksilan, Selüloz, Çözünür Nişasta veya Pektin)	1	g
Uygun Tampon	100	mL

DNS testi ile ksilanaz, selüloz, pektinaz ve amilaz aktivitesi ölçümleri için substrat olarak sırasıyla ksilan (Birchwood xylan; BW-xylan), Karboksimetil selüloz (CMC), Citrus pektin (CP) ve çözünür nişasta kullanılmıştır. Bu substratlar uygun tampon çözeltileri içine %1.0 g olacak şekilde ilave edildikten sonra ısıtmalı manyetik karıştırıcıda ısıtılarak, dipte çökelme olmayıncaya kadar iyice erimeleri sağlanmıştır. Substrat tamamen eriyince, özellikle Glisin/NaOH tamponu için ve deneme sıcaklığında, pH tekrar kontrol edilmiştir.

Tamponlar

0.2 M Tris (hidroksimetil amino metan)/HCl Tamponu (pH: 8.5)

Tris [Hidroksimetil amino metan (Sigma T-6068)]: MW: 121.14 g/mol	24.228	g/L
pH	8.5	
dDH ₂ O	1000	mL

Tris tamponu, istenilen molaritede hazırlandıktan sonra derişik HCl ile pH istenilen değere getirilmiştir. pH ölçümleri çözeltinin kullanılacağı sıcaklıkta, ısı problu ve kalibrasyonu yapılmış Hanna pH 211 marka dijital pH metre ile gerçekleştirilmiştir.

Fosfat tamponu: NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ (pH: 6.0 ve 7.0 için)

NaH ₂ PO ₄ , MW: 119.98 g/mol (0.2 M) (A solüsyonu)	23.996	g/L
Na ₂ HPO ₄ , MW: 141.96 g/mol (0.2 M) (B solüsyonu)	28.392	g/L

Toplam 100 mL 0.2 M fosfat tamponu hazırlamak için A ve B solüsyonlarından alınacak miktarlar aşağıdadır:

A(mL)	B(mL)	pH
87.7	12.3	6.0
39.0	61	7.0
16.0	84.0	7.5
5.3	94.7	8.0

Glisin/NaOH Tamponu (pH: 9.0 ve 10.0 için)

Glisin: Moleküler ağırlık: 75.07 g/mol (0.2 M) (A solüsyonu)	15.014	g/L
NaOH: Moleküler ağırlık: 39.992 g/mol (0.2 M) (B solüsyonu)	7.99	g/L

25 mL glisin stok solüsyonu (A) ile X mL 0.2 M NaOH solüsyonu (B) karıştırılır ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Oranlar aşağıda verilmiştir:

0.2 M Glisin (mL) (A solüsyonu)	0.2 M NaOH (mL) (B solüsyonu)	pH
25	2.0	8.6
25	4.4	9.0
25	13.6	9.8
25	19.3	10.4
25	22.75	10.6

1 M Tris, pH 8

Tris (Merck)	121.1	g
dDH ₂ O	1000	ml

600 mL dDH₂O içerisine 121.1 g tris ilave edildi ve manyetik karıştırıcı üzerinde 45 °C sıcaklık muamelesi ile berraklaşınca kadar çözülerek oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. pH 8'de 1 M Tris elde etmek için solüsyon içerisine 42 mL %37'lik HCl ilave edildi. Son hacim dDH₂O ile

1000 mL'ye tamamlandı. Bölünerek 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

TBE Tamponu (Tris-Borik asit-EDTA; 10x, pH 8)

Tris	121.10	g
EDTA (susuz)	5.84	g
Borik asit (Merck)	61.83	g
dDH ₂ O	1000	mL

Bütün içerikler 1000 mL'lik beher içerisine kondu. İçerisine 500 mL dDH₂O eklenerek berraklaşmaya kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak. pH 8'e ayarlandı ve +4 °C'de saklandı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesinde tampon olarak kullanılmıştır.

TEA Tamponu (Tris, asetik asit, EDTA, 10x pH:8)

Tris base	48.4	g
Glacial acetic acid	11.42	mL
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	7.44	g
dDH ₂ O	1000	mL

Bütün içerikler 1000 mL'lik beher içerisine kondu. İçerisine 500 mL dDH₂O eklenerek berraklaşmaya kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak. pH 8'e ayarlandı ve +4 °C'de saklandı. İzole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezinde yürütülmesinde tampon olarak kullanılmıştır.

0.5 M EDTA (pH:8)

Diaminoetan tetraasetik asit (FW 372.2 g/mol)	18.6	g
dDH ₂ O	100	mL

Orta sıcaklıktaki hotplate üzerinde karıştırılarak, NaOH ile pH:8' e ayarlanmalıdır. DNA izolasyonunda ekstraksiyon aşamalarında kullanılmıştır.

Lizozim (20 mg/mL)

1 M Tris-HCl (pH:8)	60	μL
Lizozim	120	mg
dDH ₂ O	5.40	mL

Verilen miktarlarda her seferinde taze olarak hazırlanan lizozim solüsyonu Aktinobakteri olduğu düşünülen izolatların DNA ekstraksiyon aşamasında hücre duvarının kolayca parçalanması amacıyla kullanılmıştır.

%0.8 Agaroz Jel

Agaroz	0.8	g
TAE tamponu	100	mL

0.8 g agaroz tartılarak 100 mL TBE tamponuna alınmış, eriyinceye kadar mikrodalga fırında bekletilmiştir. 65 °C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine 10 µL DNA boyası ilave (İnvitrogen, SYBR, Safe DNA Gel Stain) edilerek manyetik karıştırıcıda homojen karışımı sağlanmış, uygun şekilde dökümü yapılarak donması beklenmiştir. İzolatların DNA'larının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi ve saflıklarının kontrolü uygulamalarında kullanılmıştır.

%1 Agaroz Jel

Agaroz	1	g
TAE tamponu	100	mL

1 g agaroz tartılarak 100 mL TAE tamponuna alınmış, eriyinceye kadar mikrodalga fırında bekletilmiştir. 65 °C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine 10 µL DNA boyası ilave (İnvitrogen, SYBR, Safe DNA Gel Stain) edilerek manyetik karıştırıcıda homojen karışımı sağlanmış, uygun şekilde dökümü yapılarak donması beklenmiştir. İzolatların PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi ve saflıklarının kontrolü uygulamalarında kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Tuzladan Su Örneklemelerinin Alınması

Ayvalık Tuzlası'nda belirlenen 10 farklı tuz havuzundan, Eylül 2017/Şubat 2018 tarihlerinde, her bir havuzu temsil edecek şekilde kompozit örnekleme (havuzun 5 farklı yerinden alınıp karıştırılarak) yöntemine göre örneklemeler yapılarak, polipropilen conta kapaklı amber renkli cam şişelere alınmış, soğuk zincir ile en kısa sürede laboratuvara getirilmiştir. Halofilik bakteri izolasyonlarına örnekler laboratuvara ulaştıktan sonra en kısa sürede başlanmıştır. Bazı tuzlu su örnekleri ileriki bakteri izolasyonları ve metal, iyon analizlerinde kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.1.1. Tuzlu Su Örneklerinin Bazı Fiziko-Kimyasal Parametrelerinin Belirlenmesi

Tuzlu su örneklerinin alındığı tuz havuzlarında pH, sıcaklık, nisbi nem (%RH), mV-ORP ve ışık şiddeti gerçek zamanlı olarak arazi bölgesinde ölçülmüştür. Su örneklerinin sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesi için Hanna marka HI 8314 (pH meter), nem değerlerinin belirlenmesi için Hanna marka HI 8564 (Thermo hygrometer), ışık şiddeti ölçümü için Hanna marka HI 97500 (Lux meter), oksidasyon indirme potansiyeli ölçümleri için Hanna marka HI 98201 (ORP-mV) analiz cihazları kullanılmıştır.

3.2.1.2. Tuzlu Su Örneklerinin İyon ve Metal Analizlerinin Yapılması

10 Farklı tuz havuzundan alınan tuzlu su örneklerinin metal ve iyon analizleri Üniversitemiz DEFAM Merkezi Araştırma Laboratuvarında Hizmet alımı kapsamında yaptırılmıştır.

3.2.2. Halofilik Bakteri İzolasyonu ve Sayımı

Halofilik bakterilerin izolasyonu için dökme plaka ekim yöntemi uygulanmıştır. Bölüm 3.1.2.'de açıklanan besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra petriler 28-30 °C'de en az 21 gün inkübasyona tabi tutularak, inkübasyon sonrası her bir farklı besiyerinde gelişen halofilik bakteri sayımları elde edilmiştir.

Halofilik bakteri izolasyonu için literatürde mevcut besiyerleri taranarak değerlendirilmiş, farklı bileşimlerde karbon, azot ve diğer bileşenler denenerek izolasyon için en uygun besiyeri Formülaları ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca besiyeri hazırlamada Ayvalık tuzlasından alınan su kullanılarak izolasyon şansı artırılmaya çalışılmıştır. İlk

denemelerimizde su numuneleri 10^{-4} dilüsyona kadar seyreltilerek ekimler gerçekleştirilmiş sonrasında dilüsyon yapılmayan durumlarda bakteri izolasyonunun daha iyi olduğuna karar verilerek seyreltme yapmadan ekim çalışmaları yürütülmüştür. Besiyeri bileşimine eklenen NaCl'de tuzladan alınmıştır. İzolasyonlarda minimum tuz oranı %15-20 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir tuz havuzundan alınan numunelerden en az üç tekrarlı olacak şekilde halofilik bakteri izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Halofil Bakterilerin Ekstraselüler Enzim Potansiyellerinin Belirlenmesi

İzolasyonlar sonucu elde edilen toplamda 6369 izolatu temsil ettiğini düşündüğümüz farklı izolatlardan 55 tanesi seçilerek katı ve sıvı ortamda ekstraselüler enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla uygun sıvı ortamlarda geliştirilmiş ve stokları oluşturulmuştur. Ekstraselüler enzim tarama çalışmaları sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.

3.2.3.1. Katı Ortamda Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Sıvı ortamda (SG medium, Besiyeri 6) büyütülen kültürden 40 µL alınarak Bölüm 3.1.2.'de bileşimi verilen katı besiyerinde (Besiyeri 7, %1 oranında ayrı ayrı BW ksilan, Pektin, CMC veya nişasta ilave edilmiş) açılan 5 mm çaplı kuyucuklara aktarılmıştır. Bu şekilde sıvı aktif kültür aktarımı yapılan katı ortamlar 28 °C' de 3 gün aerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında gelişen bakterilerin çevresinde beliren berrak ksilanaz, selülaz, pektinaz ve amilaz hidroliz zonlarının belirlenebilmesi için petrilere plak yüzeyini kaplayacak miktarda gram iyodür (lugol) solüsyonu ilave edilmiş, 5 dk. reaksiyona girmesi beklendikten sonra enzim aktivitesi göstergesi olan hidroliz zonları açısından değerlendirilmiştir. Hidroliz zonları milimetrik olarak ölçülmüş ve ortalama değerleri göz önünde bulundurulmuştur.

Proteaz aktivitesi, 3.1.2.'de bileşimi verilen Besiyeri 7.'ye uygun miktarda (%1) kazein ilavesi yapılmış besiyerinde belirlenmiştir. Ortama bakteri inokülasyonu yukarıda açıklandığı şekliyle aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bu ortamda proteaz aktivitesi opak alanda açık renkli kazein hidroliz zonu görülmesi ile değerlendirilmiştir.

Lipaz aktivitesi, %1 tribütirin içeren tribütirin agar (Besiyeri 8) ortamında incelenmiştir. Açık ve temiz zon görünmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Katı ortamda gerçekleştirilen proteaz ve lipaz aktiviteleri düşük çıktığı için sıvı ortam çalışmalarında bu iki enzim ölçümleri yapılamamıştır.

3.2.3.2. Sıvı Ortamda Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Katı ortamda enzimatik aktivitesi belirlenen ve seçilen halofilik bakteriler fermentasyon çalışmalarına alınarak sıvı ortamda enzim üretim kabiliyetleri belirlenmiştir. Yöntem aşağıda açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2.1. Fermentasyon Çalışmaları ile Enzim Üretimi

Katı ortamda büyütülen aktif kültürlerden 1 öze dolusu alınarak Bölüm 3.1.2.'de bileşimi verilen uygun substrat ilave edilmiş, agarsız SGM-3 ortamına (Besiyeri 3) (100 mL'lik erlenlerde 25 mL olacak şekilde) aşılama yapılmış, 28 °C, 160 rpm çalkalamalı inkübatörde 48 h geliştirilerek inokulumlar hazırlanmıştır. Sonrasında 600 nm'de spektrofotometre (Varian Carry 50) ile hücre konsantrasyonu 2×10^5 hücre/mL'ye ayarlanarak doğrulaması katı ortamda yapılmıştır. Aynı miktarda hücre içeren aşı kültüründen 250 mL'lik erlenlerdeki 50 mL Besiyeri 9 ortamına aktarılarak fermentasyonlar yukarıda açıklanan koşullarda 72-96 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon esnasında belli zamanlarda aseptik koşullarda alınan sıvı örnekler +4 °C ve 8000 rpm'de 10 dakika santrifuj edilerek hücreler uzaklaştırılmış üst sıvı faz (süpernatant) (ham kültür filtratı), steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Sonrasında enzim aktivite analizlerinde kullanılmak amacıyla +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.3. Enzim Aktivitesi Analizleri (Analitik Ölçümler)

Bölüm 3.2.3.2.'de verilen yöntemle ve her bir enzimin substratının ayrı ayrı eklendiği Besiyeri 9'da yapılan fermentasyon sıvıları ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu fermentasyon sıvılarında enzim aktivitesi ölçümleri aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir: Ksilanaz, selüloz, pektinaz ve amilaz aktivitesi ölçümleri, açığa çıkan indirgen grupların belirlenmesi esasına göre modifiye edilen DNS yöntemi ile belirlenmiştir [147]. Kısaca, 250 µL %1 substrat (BW ksilan, CMC, pektin veya çözünen nişasta) içeren fosfat tamponu (pH:7 ve 7.5 için) ve 100 µL ham enzim solüsyonu homojen karıştırılmış ve 30 °C' de 10 dk durgun koşullarda inkübe edilerek reaksiyona bırakılmıştır. Süre sonunda reaksiyon 750 µL DNS reaktifi eklenerek durdurulmuş ve paralelinde 100 °C' de 5 dk. renk oluşumu için inkübe edilmiş, soğutularak 8000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek solüsyonda çözünmeyen substratın ayrılması sağlanmıştır. Kontrol amaçlı olarak, tüplerden birine enzim solüsyonu hariç, substrat ve diğer reaksiyon sıvı karışımları (tampon + %1 substrat), diğerine ise substrat hariç diğer reaksiyon sıvı karışımları (tampon + enzim solüsyonu), hazırlanarak paralel olarak aynı reaksiyon koşullarında işlemlerden geçirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan

bütün örnekler Varian Carry50 marka UV-visible spektrofotometre de 540 nm dalga boyu kullanılarak, köre (sırasıyla, 100 µL inaktive enzim + 750 µL DNS + 250 µL substrat/tampon karışımı) karşı okuma (Ölçümler öncesinde, kör çözeltileri ile spektrofotometrenin transmisyon değeri %100'e, absorbans değeri 0.00'a ayarlanmıştır) yapılmıştır (İnaktive enzim; ham enzim solüsyonunun 20 dk. 100 °C'de bekletilmesi ile elde edilmiştir). Bir ünite (U) enzim aktivitesi sırasıyla ksilanaz için dakikada 1 µmol ksiloz, selüloz ve amilaz için glukoz, pektinaz için ise 1 µmol galakturonik asit salınmasını sağlayan enzim miktarı olarak standartla karşılaştırılarak belirlenmiştir (100 µL enzim yerine, 100 µL galakturonik asit bulunan reaksiyon karışımı yukarıda açıklanan aynı koşullarda işleminden geçirilerek pozitif kontrol amaçlı olarak ölçümlerde kullanılmıştır). Her test üç kez tekrarlanarak sonuçlar ortalama değerler olarak verilmiştir.

3.2.3.4. Sıcaklık ve pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın saptanması için enzim farklı sıcaklık aralığındaki (28-70 °C) su banyosunda 10 dk. bekletilmiştir. Aktivite tayini için 100 µL enzim ve 250 µL substrat/tampon (optimum pH değerinde hazırlanmış) karıştırılarak 5 dk. süreyle inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonunda kalan (residüel) enzim aktivitesi Bölüm 3.2.3.3.'de açıklanan standart aktivite tayini ile belirlenmiştir.

Enzimin aktivite gösterdiği en iyi pH profilinin belirlenmesi amacıyla substratının da içinde bulunduğu ve farklı pH (4.5-10)'lara ayarlanmış uygun tamponlara (optimum sıcaklıktaki) 100 µL enzim ilave edilerek 10 dk. süreyle inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonunda residüel enzim aktivitesi Bölüm 3.2.3.3.'de açıklanan standart aktivite tayini ile belirlenmiştir.

3.2.4. Seçilen Halofilik Bakterilerin Tanımlanması

Enzimatik aktivitelerinin belirlenmesi için seçilen 55 farklı halofilik bakteriden 14 tanesinin hidrolitik enzim üretme kapasitesi yüksek bulunmuş ve bu bakterilerin tanımlanmasında aşağıda belirtilen testler uygulanmıştır.

3.2.4.1. Morfolojik ve Kültürel Testler

Halofilik bakteriler, SG Medium Modifiye 1 (SGM-1), SG Medium Modifiye 2 (SGM-2), SG Medium Modifiye 3 (SGM-3), Seyreltmeli SGM-2 İzolasyon Besiyerinde, 21 gün boyunca gelişmeye bırakılmış ve inkübasyon sonrası koloniler; koloni morfolojisi, formu, yükseltisi, kenar tipi, büyüklüğü, yüzey görünümü, yoğunluğu, rengi, kokusu ve ışık

geçirgenliği gibi kriterleri belirlenmiştir. Koloni morfolojileri çıplak gözle ve gerektiğinde mikrometrik okülerli, 10X büyütme ışık mikroskobu kullanılarak, pigmentasyon ise görsel açıdan değerlendirilmiştir.

Ortalama 4 hafta gelişen sıvı kültürlerden hazırlanan preparatlar gram reaksiyonunun belirlenmesi amacıyla gram boyama işlemine tabi tutulmuştur. 1 öze dolusu sıvı kültürlerden alınan örnekler lam üzerine 1 cm² büyüklüğünde yayılarak açık hava ortamında kurutulup tespit edildikten sonra kristal violet boyasıyla 1.5 dk. boyanıp fazla boya akıtılarak %10'luk tuzlu suyla yıkanmıştır, üzeri lugol ile kaplanarak 1 dk. bekledikten sonra tekrar hafifçe yıkama yapılmış, %95'lik etanolle 10 saniye muamele edilmiştir. Kalan etanol hafifçe yıkanarak uzaklaştırılmış ve sonrasında karşıt boya safraninle boyama yapıp 1 dakika reaksiyona girmesini takiben nazikçe tekrar yıkanmış havada kurutularak immersiyon objektifi ile ışık mikroskobunda incelenmiştir. Mor siyah renkli boyanan hücreler Gr(+), karşıt boya rengi (pembe) boyanan hücreler Gr(-) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.2. Moleküler Sistemik Çalışmaları

3.2.4.2.1. DNA İzolasyonu İçin Halofilik Bakterilerden Hücre Pelletinin Elde Edilmesi

Katı ortamda aktif olan halofilik bakterilerden bir öze dolusu alınarak içerisinde 20 mL SGM-3 sıvı besiyerinin bulunduğu 50 mL'lik erlenlere transfer edilmiş, çalkalamalı inkübatörde 28 °C'de 3 - 6 gün 160 devirde geliştirilmiştir. Bu suretle bakterilerden DNA izolasyonu için uygun biomass sağlanabilmiştir. Her bir broth kültürden aseptik olarak 1.5 mL alınarak steril 2 mL'lik eppendorflara transfer edilmiş ve 15000 rpm'de 5 dk. +4 °C'de santrifüj işlemiyle hücre pelleti çöktürülmüştür. Hücre pelletinin üstünde kalan sıvı faz atılarak hücre pelleti steril dDH₂O su ile 3 kez yıkanmış ve DNA izolasyonuna geçilmiştir.

3.2.4.2.2. Halofilik Bakterilerin Genomik DNA'larının İzolasyonu

Elde edilen hücre pelletlerinden Genomik DNA izolasyonu, Promega firmasının belirttiği koşullara uygun bir şekilde "Wizard^R Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120)" izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Prosedür kısaca aşağıdaki gibidir:

1. Hücre pelleti 480 µL 50 mM EDTA' da çözülmüştür,
2. Üzerine 120 µL litik enzim lizozim ilave edilmiş ve 37 °C' de 60 dakika inkübe edilmiştir,
3. Süre sonunda 15.000 rpm' de 2 dk. santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılmıştır,

4. Hücre lizisi için üzerine 600 µL Nukleus Lisis Solüsyonu ilave edilerek nazikçe karıştırılmıştır, 5 dk. 80 °C’de su banyosunda inkübe edilerek süre sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur,
5. Üzerine 3 µL RNaz Solüsyonu ilave edilerek karıştırılmış ve 37 °C’de 60 dk. bekletilmiş sonrasında oda sıcaklığına kadar soğuması sağlanmıştır,
6. Sonrasında üzerine 200 µL Protein Çöktürme Solüsyonu ilave edilmiş, 5 dk. soğuk buzda bekletilmiştir, süre sonunda 14.000 rpm’ de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant; içerisinde 600 µL isopropanol (2-propanol, oda sıcaklığındaki) bulunan eppendorf tüplerine alınmıştır,
7. Karışım 15.000 rpm’de 2 dk. santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır,
8. Üzerine oda sıcaklığında bulunan %70’lik etanolden 600 µL ilave edilmiştir,
9. Etanol 15 dk. süreyle oda sıcaklığında aspire edilmiştir,
10. Elde edilen pellet üzerine DNA rehidrasyon solüsyonundan 70 µL eklenerek 1 saat 65 °C’ de inkübe edilerek DNA eldesi tamamlanmıştır.

Elde edilen DNA’lar PCR reaksiyonları gerçekleştirilinceye kadar -20 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.2.2.1. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi

DNA örneklerinin miktar tayini ve saflık derecesi, nanodrop (Thermo 2000c) 260 ve 280 nm’lerdeki absorpsiyonları dikkate alınarak belirlenmiştir. 260 nm’de ölçülen absorpsiyon değerleri (A260) DNA çözeltisindeki DNA miktarını ve 280 nm’de ölçülen absorpsiyon değerleri (A280) ise protein miktarını göstermektedir. A260/A280 oranı 1.90 ve üzerinde olan DNA örneklerine saf olarak kabul edilmiştir [148].

Elde edilen DNA örnekleri, izolasyon işleminin bir sonucu olarak geleneksel bir metot olan agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. DNA saflık kontrolleri %1 (w/v)’lik 10 µL DNA boyası (Invitrogen, SYBR, Safe DNA Gel Stain) eklenerek hazırlanmış agaroz jel elektroforezi ile ilk kuyucuğa DNA marker (1 kb DNA Ladder, Geneaid DL006) diğerlerine DNA örneği aktararak [(1.2 µL DNA loading boyası (biotech rabbit 6x DNA loadind dye), + (6 µL DNA örneği)] 100 V 45 dk. süreyle TAE tamponu kullanılarak yapılmıştır. Sonrasında DNA örnekleri UV transillüminatör’de (gLite gel scanner) incelenerek tek saf olarak bank oluşturan DNA örnekleri PCR reaksiyonuna alınmıştır.

3.2.4.2.3. 16S rRNA Geninin PCR Amplifikasyonu

Her bir izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan, 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için, evrensel iki primer 27F (forward primer: 16S rRNA'nın başlangıç bölgesine bağlanan evrensel primer, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ve 1525R (reverse primer: 16S rRNA'nın son bölgesine bağlanan evrensel primer 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3') kullanılmıştır [149-150]. PCR için optimize edilen reaksiyon karışımları Tablo 3.1. ve optimize PCR koşulları Tablo 3.2.'de görülmektedir. Bu koşullarla PCR ürünü için çalışmalar Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler ile gerçekleştirilmiş ve nihayetinde elde edilen PCR ürünleri için elektroforez %0.8 agaroz jelde, ilk kuyucuğa DNA marker (100 bp DNA Ladder, Geneaid DL007) diğerlerine PCR ürünü aktarılacak (1.2 µL DNA loading boyası, 6x + 6 µL PCR örneği) TBE tamponu ile 100 V 30 dk. süreyle yapılmıştır. Sonrasında PCR ürünleri UV transillüminatör'de (gLite gel scanner) incelenerek tek saf olarak bank oluşturanlar sekans analizleri için ayrılarak -20 °C'de saklanmıştır.

Tablo 3.1. PCR Reaksiyonu Bileşenleri ve Konsantrasyonları.

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyondaki Son Konsantrasyonu	Son Hacim (µL)
DMSO	100 %	4 %	2.0
Triton-X100	100 %	0.3 %	0.15
PCR Bufer	10X	1X	5
Mg solüsyonu*	20 mM	2.0	5
dNTP	10 mM (her birinden)	0.2 mM (her birinden)	1
Forward primer	20 µM	0.5 µM	1.25
Reverse primer	20 µM	0.5 µM	1.25
Polimeraz*	5.0 U/µL	2.0 U/µL	0.40
Template DNA	50/70 ng/µL	50	0.7
PCR grade su	--	--	38.24
Toplam reaksiyon hacmi	--	--	50

* ThermoScientific, DreamTaq DNA polymerase, EP0702. Bu enzimle beraber gelen PCR buffer bileşiminde 20 mM MgCl₂ bulunduğu için ayrıca reaksiyon bileşimine MgCl₂ eklenmemiştir.

Tablo 3.2. PCR ile Ürün Eldesi için Belirlenen Koşullar.

Adım	Sıcaklık	Süre	Çevrim
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	4 dk	1
Denatürasyon	95 °C	30 s	36
Bağlanma	49 °C	30 s	
Uzama	72 °C	60 s	
Son Uzama	72 °C	10 dk	1

Elde edilen PCR ürünleri sekans analizi için GATC Biotech (Almanya) firmasına gönderilmiş ve firmadan 16S rRNA kromatogramları alınmıştır.

3.2.4.2.4. 16S rRNA Gen Dizi Verilerinin Analizi, Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması ve Filogenetik Dendogramlarının Oluşturulması

16S rRNA ve sekans analizleri yurtdışında hizmet alımları kapsamında yaptırılmıştır. Elde edilen ham sekans verileri degenaratif bazların karşılığı için BioEdit Sequence Alignment Editor programı (V, 7.2.5.) ile düzenlenerek yine aynı program kullanılarak ileri ve geri okuma sekansları birleştirilmiştir. Elde edilen sekansların düzenlenmesi ise MEGA X (V, 10.0.4) programı ile gerçekleştirilmiştir. Sonrasında işlenmiş ve düzenlenmiş sekans verileri muhtemel türlerin belirlenmesi amacıyla gen bankasındaki verilerle karşılaştırmak için blastlanmıştır. 16S rRNA gen analizi filogenetik dendogramları için, gen databanklarından elde edilen Halofilik bakteri tip örneği 16S rRNA gen dizileri (referans sekanslar) ile test bakterilerinin gen dizileri karşılaştırılarak seçilen halofilik bakterilerin tür veya cins seviyesinde tanılamaları yapılmıştır. Filogenetik dendogramları Neighbour-joining, Maximum Composite Likelihood algoritmaları kullanılarak oluşturulmuştur. Filogenetik analizler için MEGA X (V, 10.0.4) paket programından yararlanılmıştır [151].

4. BULGULAR

4.1. Tuzlu Su Örneklerinin Alınması ve İstasyonlar

Halofilik bakteri izolasyonu için Ayvalık Tuzlası'ndan 10 farklı tuz havuzu seçilerek örneklemeler yöntem 3.2.1'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Örneklemelerin yapıldığı istasyonlar Şekil 4.1.'de, tuz havuzlarına ait bazı görüntüler ise Şekil 4.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Su Örneklemelerinin Yapıldığı Ayvalık Tuzlasının Genel Görünümü.

Balıkesir/Ayvalık Akdeniz ikliminin etkisi altındadır. Kış mevsimi Akdeniz iklim tipinde olduğu gibi, en çok yağışlı geçen mevsimdir ve ılık geçmektedir. Ancak tipik Akdeniz ikliminin bütün özellikleri burada görülmemektedir. Yaz aylarına ait ortalama sıcaklıkların daha düşük olması ve yaz süresinin kısıllığı, önemli farklardan birisini meydana getirir [152]. Balıkesir/Ayvalık ilinin yıllık ortalama sıcaklığı 14.6 °C'dir. Yıllık ortalama yağış miktarı ise 48.1 kg/m² dür. Yılın en sıcak ayı 31.3 °C ile Ağustos ayıdır. Ocak ayında ortalama sıcaklık 4.9 °C olup yılın en düşük ortalamasına sahiptir. Minimum sıcaklık değeri ise -18.8 °C ile 2004 yılı Şubat ayıdır. Yıllık ortalama yağışın %52 ile kış ve en az yağışın %2.8 ile yaz mevsimine düştüğü görülür. Toplam yağış içinse İlkbaharda düşen yağış %21.7, Sonbahar'da düşen yağış ise %23.5' lik bir paya sahiptir. Bu karakteri ile de Ayvalık Akdeniz Yağış Rejimi tipine girmektedir.

Ülkemizdeki önemli tuz üretim yerlerinden biri olan Balıkesir/Ayvalık Tuzlası, İzmir iline 133 km, Manisa iline 163 km ve Balıkesir iline 107 km uzaklıktadır. Türkiye'nin deniz

kaynaklı tuzlarından birisidir. Ayvalık Tuzlası geniş alana yayılmış buharlaştırma havuzları ve kristalizasyon havuzlarıyla önemli bir sulak alandır. Su depolama havuzları, buharlaştırma havuzları ve kristalizasyon havuzları bulunmaktadır.



Şekil 4.2. Örneklemelerinin Yapıldığı Tuz Havuzlarından Bazı Görüntüler.

4.1.1. Tuzlu Su Örneklerinin Bazı Fiziko-Kimyasal Parametreleri

3.2.1.1.'de verilen yöntemle göre 10 farklı tuz havuzu su örneklerinin bazı fiziko-kimyasal parametreleri 3 tekrarlı olarak gerçek zamanlı arazi bölgesinde belirlenerek Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Mikroorganizmaların çeşit ve sayısında önemli etkileri sahip olan pH örnekleme yapılan tuz havuzlarında 6.88-7.88 aralığındadır, ortalama olarak çoğu havuz için nötr pH'ya yakındır. Sıcaklık ise yaz döneminde ortalama olarak 30 °C civarı, kış döneminde ise 11 °C civarındadır. İzolasyon çalışmaları sonucu en fazla sayıya yaz döneminde yapılan örneklemlerde ulaşılmıştır.

Tablo 4.1. Ayvalık Tuzlası Su Örneklerinin Bazı Fiziko-kimyasal Parametreleri.

Örnek No*	pH	Sıcaklık (°C), (Su-Hava)	RH(%)	mV-ORP	Işık (lux)	Koordinat (Enlem-Boylam)
AT_01	6.87	31.4 - 27.0	50	0.016 - 0.040	19.40	39°26'06"N-26°72'13"E
AT_02	6.90	29.8 - 27.0	56	0.014 - 0.034	19.36	39°26'06"N-26°72'13"E
AT_03	6.96	30.8 - 31.7	45	0.009 - 0.120	19.33	39°26'06"N-26°72'13"E
AT_04	6.90	37.8 - 29.7	44	0.013 - 0.130	19.35	39°26'52"N-26°70'35"E
AT_05	7.65	33.5 - 30.2	47	0.036 - 0.060	19.34	39°26'52"N-26°70'84"E
AT_06	7.70	10.8 - 12.5	46	0.024 - 0.040	18.21	39°26'35"N-26°72'03"E
AT_07	7.88	11.2 - 13.0	44	0.032 - 0.065	10.20	39°26'35"N-26°71'59"E
AT_08	7.30	11.5 - 13.2	40	0.025 - 0.146	18.24	39°26'35"N-26°71'55"E
AT_09	7.81	11.3 - 13.5	42	0.017 - 0.143	18.23	39°26'33"N-26°71'59"E
AT_10	6.75	11.9 - 13.8	46	0.023 - 0.122	10.24	39°26'35"N-26°71'55"E

* AT: Ayvalık Tuzlası

4.1.2. Tuzlu Su Örneklerinin İyon ve Metal Analiz Sonuçları

10 Farklı tuz havuzundan alınan örneklerin metal ve iyon analizleri Üniversitemiz DEFAM Merkezi Araştırma Laboratuvarında hizmet alımı kapsamında yaptırılmıştır. İyon analiz sonuçları Tablo 4.2’de metal analiz sonuçları ise Tablo 4.3.’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Tuzlu Su Numunelerinin İyon Kromatografi Sonuçları.

Örnek No	İyon (mg/L)						
	Florür	Klorür	Nitrit	Bromür	Nitrat	Fosfat	Sülfat
AT_01	3	205027	< 0.1	1280	439	62156	< 0.1
AT_02	57	163595	< 0.1	1152	290	52949	< 0.1
AT_03	100	182298	< 0.1	1068	280	50189	< 0.1
AT_04	< 0.1	200971	< 0.1	1000	283	45138	< 0.1
AT_05	< 0.1	102518	< 0.1	663	1205	29340	< 0.1
AT_06	< 0.1	25766	< 0.1	415	304	9899	< 0.1
AT_07	279	60850	< 0.1	505	315	16901	< 0.1
AT_08	49	42487	< 0.1	450	322	13065	775
AT_09	86	32392	< 0,1	418	340	9964	< 0.1
AT_010	< 0.1	49858	< 0.1	479	479	14828	< 0.1

10 farklı tuz havuzundan alınan örneklerin iyon ve metal değerleri açısından önemli farklılıklar bulunmaktadır. Halofilik mikroorganizmaların gereksinim duyduğu iyonlar (örneğin klorür), Na, Ca, Mg, Mn gibi metaller özellikle ilk 3 havuzda oldukça yoğun miktarlarda tespit edilmiştir. Havuzlardan yapılan izolasyonlarda Halofilik mikroorganizma yükü bu ilk 3 havuzda oldukça yüksek olup tesadüfi değildir. Tuz havuzlarında yaşayan

halofiller osmatik dengeyi korumak için yüksek çözünün miktarına ihtiyaç duymaktadır. İyon ve metal analizi sonuçları ile havuzlarda bulunan halofillerin sayı ve çeşitliliği arasında daha fazla ilişkilendirme yapabilmek için bu bölgeyle ilgili daha fazla örnekleme yapılarak izolasyonlara devam edilmeli ve daha fazla halofil mikroorganizmanın tanımlanması gerekmektedir.

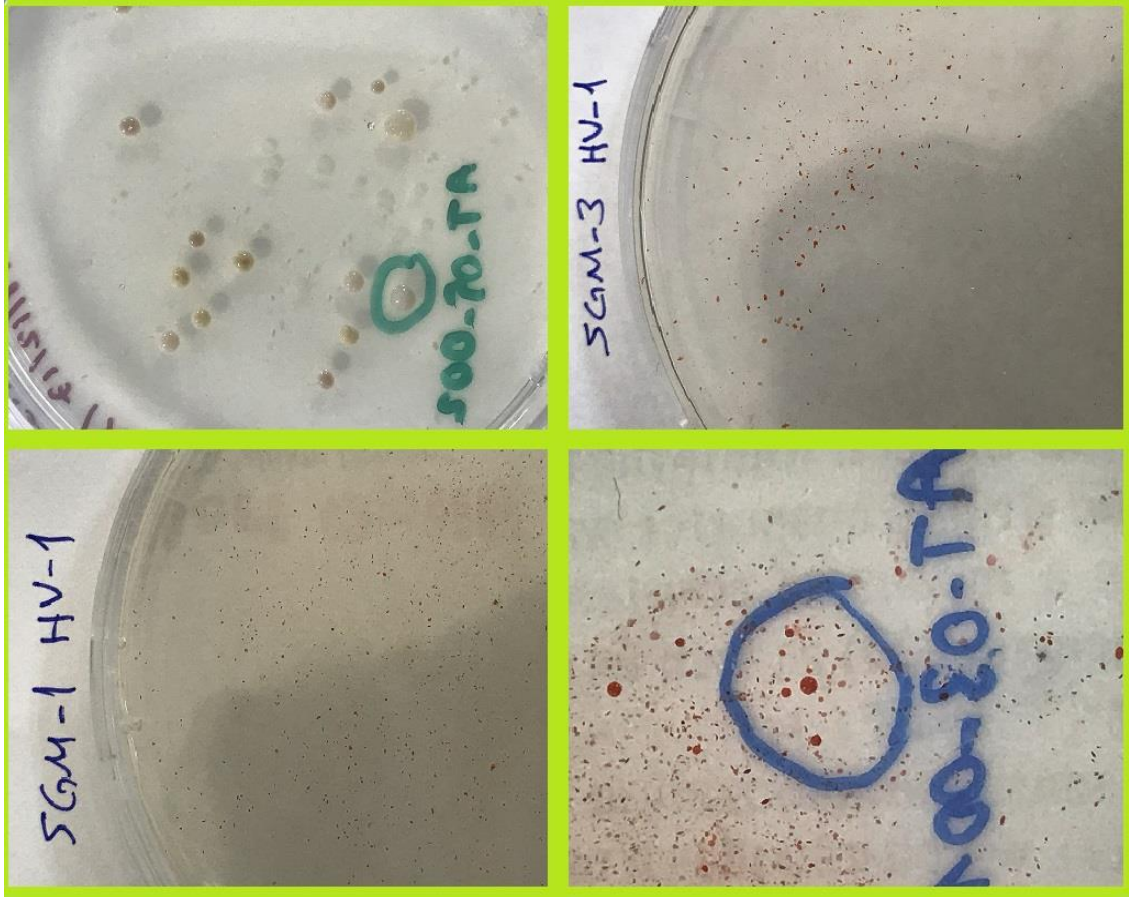
Tablo 4.3. ICP-OES Metal Analizi Sonuçları.

Örnek No	Na*	Ca	Mg	Cd	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Pb
AT_01	12.990	10.453	23.922	0.879	<1.00	1.660	4.727	<1.00	1.892	43.360
AT_02	12.391	0.305	24.756	0.910	0.093	1.563	4.714	<1.00	1.611	41.81
AT_03	11.987	0.411	20.998	0.898	0.189	1.526	4.717	<1.00	0.775	40.59
AT_04	11.551	0.355	16.175	0.860	0.072	1.487	4.714	<1.00	0.159	41.34
AT_05	5.688	1.534	6.326	0.800	<1.00	1.572	4.347	<1.00	<1.00	21.23
AT_06	1.256	11.174	2.032	0.737	<1.00	1.719	4.367	<1.00	0.385	6.77
AT_07	3.476	1.306	5.159	0.763	<1.00	3.316	4.558	<1.00	4.769	14.08
AT_08	2.135	1.216	3.271	0.752	<1.00	1.635	4.400	<1.00	0.123	9.24
AT_09	1.285	1.063	2.291	0.733	<1.00	1.602	4.358	<1.00	<1.00	5.73
AT_010	2.371	1.176	3.321	0.743	<1.00	1.588	4.362	<1.00	<1.00	8.33

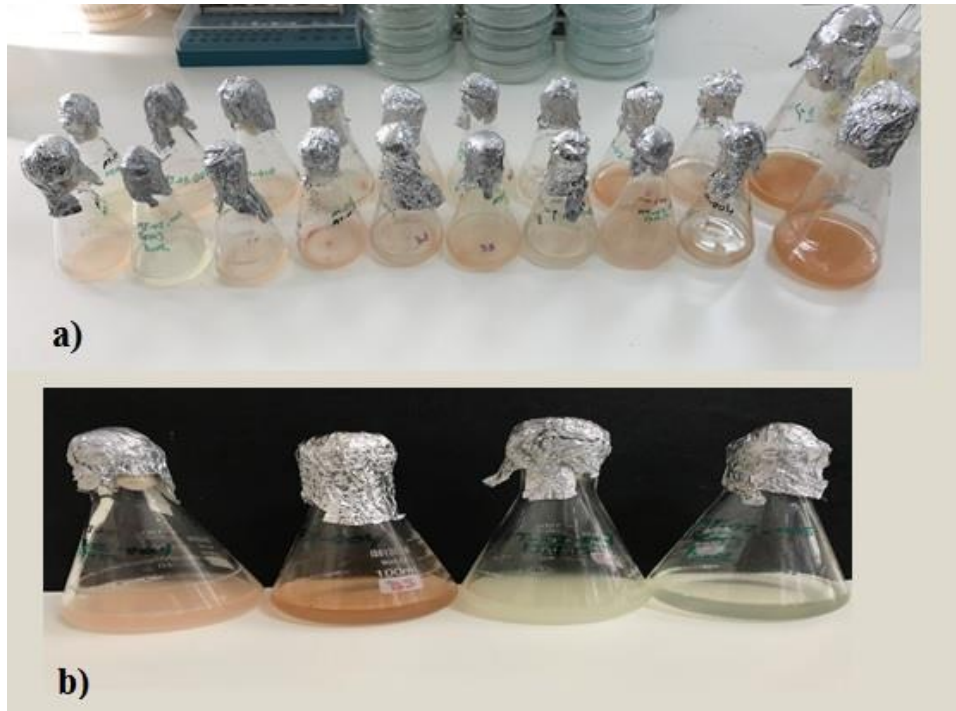
* Na, Ca ve Mg: g/L, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn ve Pb: mg/L olarak hesaplanmıştır.

4.2. Halofilik Bakteri İzolasyonu ve Sayım Sonuçları

Halofilik bakterilerin izolasyon çalışmaları için ön denemelerde farklı bileşimlere sahip çok sayıda besiyeri denenmiş en iyi sonuç aldığımız 4 farklı besiyeriyle çalışmalar sürdürülmüştür. Bu besiyerleri ile halofilik bakteri izolasyonları Bölüm 3.2.2.'de verilen yönteme göre yapılmış ve sonuçlarımız Tablo 4.4.'de verilmiştir. En iyi halofilik bakteri izolasyonu Bölüm 3.1.2.'de bileşimi ve hazırlanışı verilen SGM-3 ile sağlanmıştır. Dolayısıyla enzim aktivitesi için seçilen bakterilerin çoğunun izolasyonu da bu besiyerinde gerçekleştirilmiştir. İzolasyon ortamlarında sayımı yapılan toplam halofilik mikroorganizma sayısı 6369 olup mililitrede ortalama olarak 1.2×10^3 cfu kulture edilebilir halofilik organizma bulunduğu tespit edilmiştir. Birbirinden farklı 55 adet halofilik bakteri seçilerek uygun ortamlarda büyütülmüş ve stokları hazırlanarak +4 °C ve -80 °C'de saklanmaktadır. İzolasyon petrilere ait bazı görüntüler Şekil 4.3., sıvı besiyerlerinde büyüme ise Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.3. İzolasyon Petrilerine ait Bazı Görüntüler.



Şekil 4.4. a) Bazı Halofilik Bakterilerin Farklı Sıvı Besiyerinde Gelişimi, b) SGM 3 Sıvı Besiyerinde Gelişimi (28 °C ve 160 rpm çalkalama hızıyla 14 günlük inkübasyon).

Tablo 4.4. Farklı Besiyerine Ekim Sonucu Toplam Halofilik Bakteri Sayısı.

<i>Seçilen ve Numaralandırılan İzolatlar</i>	<i>Geliştiği Besiyeri</i>	<i>Ortalama Sayım Sonucu</i>
AT-01-001	SGM-2	41
AT-01-002	SGM-2	201
AT-01-003	SGM-3	284
AT-01-004	SGM-3	244
AT-01-005	SGM-3	224
AT-01-006	SGM-3	108
AT-01-007	SGM-2	132
AT-01-008	SGM-1	340
AT-01-009	SGM-3	252
AT-01-010	SGM-2	44
AT-01-011	SGM-3	140
AT-01-012	SGM-3	244
AT-01-013	SGM-2a	6
AT-01-014	SGM-1	440
AT-02-001	SGM-3	308
AT-02-002	SGM-3	216
AT-02-003	SGM-3	224
AT-02-004	SGM-3	202
AT-02-005	SGM-3	148
AT-02-006	SGM-3	134
AT-02-007	SGM-3	140
AT-02-008	SGM-3	155
AT-02-009	SGM-3	75
AT-03-001	SGM-3 PÜRÜVATLI	211
AT-03-002	SGM-3 PÜRÜVATLI	178
AT-03-003	SGM-3	225
AT-04-001	SGM-3	254
AT-04-002	SGM-3	235
AT-05-001	SGM-3	12
AT-05-002	SGM-3	16
AT-05-003	SGM-3	32
AT-05-004	SGM-3	35
AT-06-001	SGM-3	7
AT-06-002	SGM-3	12
AT-06-003	SGM-3	19
AT-06-004	SGM-3	9
AT-07-001	SGM-3	41
AT-07-002	SGM-3	55

AT-07-003	SGM-3	61
AT-07-004	SGM-3	27
AT-07-005	SGM-3	44
AT-07-006	SGM-3	68
AT-07-007	SGM-3	73
AT-07-008	SGM-3	62
AT-08-001	SGM-3	33
AT-08-002	SGM-3	25
AT-08-003	SGM-3	31
AT-09-001	SGM-3	11
AT-09-002	SGM-3	5
AT-09-003	SGM-3	9
AT-09-004	SGM-3	6
AT-10-001	SGM-3	28
AT-10-002	SGM-3	32
AT-10-003	SGM-3	44
AT-10-004	SGM-3	27
Ortalama (cfu/mL)	--	1.2 x 10 ³

4.3. Halofil Bakterilerin Ekstraselüler Enzim Potansiyelleri

4.3.1. Katı Ortamda Enzim Aktivitesi

İzole edilen halofilik bakterilerin uygun koşullarda aktivasyonu sağlandıktan sonra farklı substratlar ile oluşturulmuş katı ortamda uygun şartlarda inkübasyonu (30 °C’de 3-5 gün, çalkalama hızı 160 rpm) yapılarak ekstraselüler enzim (açık zon oluşturanlar) üretenler Bölüm 3.2.3.1.’de anlatılan yöntemle belirlenmiş ve enzim aktivitesi göstergesi olan ortalama hidroliz zon çapları sonuçları Tablo 4.5.’de verilmiştir. Bu amaçla izolatlar arasında amilaz, lipaz, ksilanaz, pektinaz, selülaz ve proteaz enzimini üretenleri belirlemek için katı ortama sırasıyla nişasta, tribütirin, ksilan, pektin, karboksimetilselüloz (CMC) ve kazein substrat olarak eklenmiş, inkübasyon sonrası petriler taranmıştır. Ayrıca halofilik bakterilerin katı ortamda enzim aktivitelerine ilişkin görüntüler, Şekil 4.5., 4.6., 4.7. ve 4.8.’de gösterilmektedir.

Tablo 4.5. İzolatların Katı Ortamda Enzimatik Aktiviteleri (açık zon çapı, mm).

Sıra No	İzolat No	Enzimatik Aktivite (zon çapı, mm)					
		Amilaz	Ksilanaz	Selüloz	Pektinaz	Proteaz	Lipaz
1.	AT-01-001	-	-	-	8k*	-	-
2.	AT-01-002	-	-	-	10	-	-
3.	AT-01-003	-	-	-	-	-	-
4.	AT-01-004	-	-	-	-	-	-
5.	AT-01-005	-	-	-	8k	-	-
6.	AT-01-006	24	45	34k	10k	30k	-
7.	AT-01-007	-	-	10k	-	-	-
8.	AT-01-008	-	-	10k	-	-	-
9.	AT-01-009	-	-	12k	-	-	-
10.	AT-01-010	-	13	10k	10k	-	-
11.	AT-01-011	-	-	12k	10k	-	-
12.	AT-01-012	-	-	10k	12k	-	-
13.	AT-01-013	-	-	-	-	-	-
14.	AT-01-014	-	-	-	12k	-	-
15.	AT-02-001	-	18	-	-	-	-
16.	AT-02-002	-	12	24	12k	-	-
17.	AT-02-003	-	-	-	8k	-	-
18.	AT-02-004	-	12	12	8k	-	-
19.	AT-02-005	-	-	-	-	-	-
20.	AT-02-006	-	-	-	-	-	-
21.	AT-02-007	-	-	-	-	-	-
22.	AT-02-008	-	-	-	-	-	-
23.	AT-02-009	-	-	-	-	-	-
24.	AT-03-001	-	-	-	-	-	-
25.	AT-03-002	-	-	-	12k	-	-
26.	AT-03-003	-	-	-	10k	-	-
27.	AT-04-001	26	34	30	12	25k	-
28.	AT-04-002	-	-	-	-	-	-
29.	AT-05-001	-	-	-	-	-	-
30.	AT-05-002	-	-	-	-	-	-
31.	AT-05-003	-	-	-	-	-	-
32.	AT-05-004	-	-	-	-	-	-

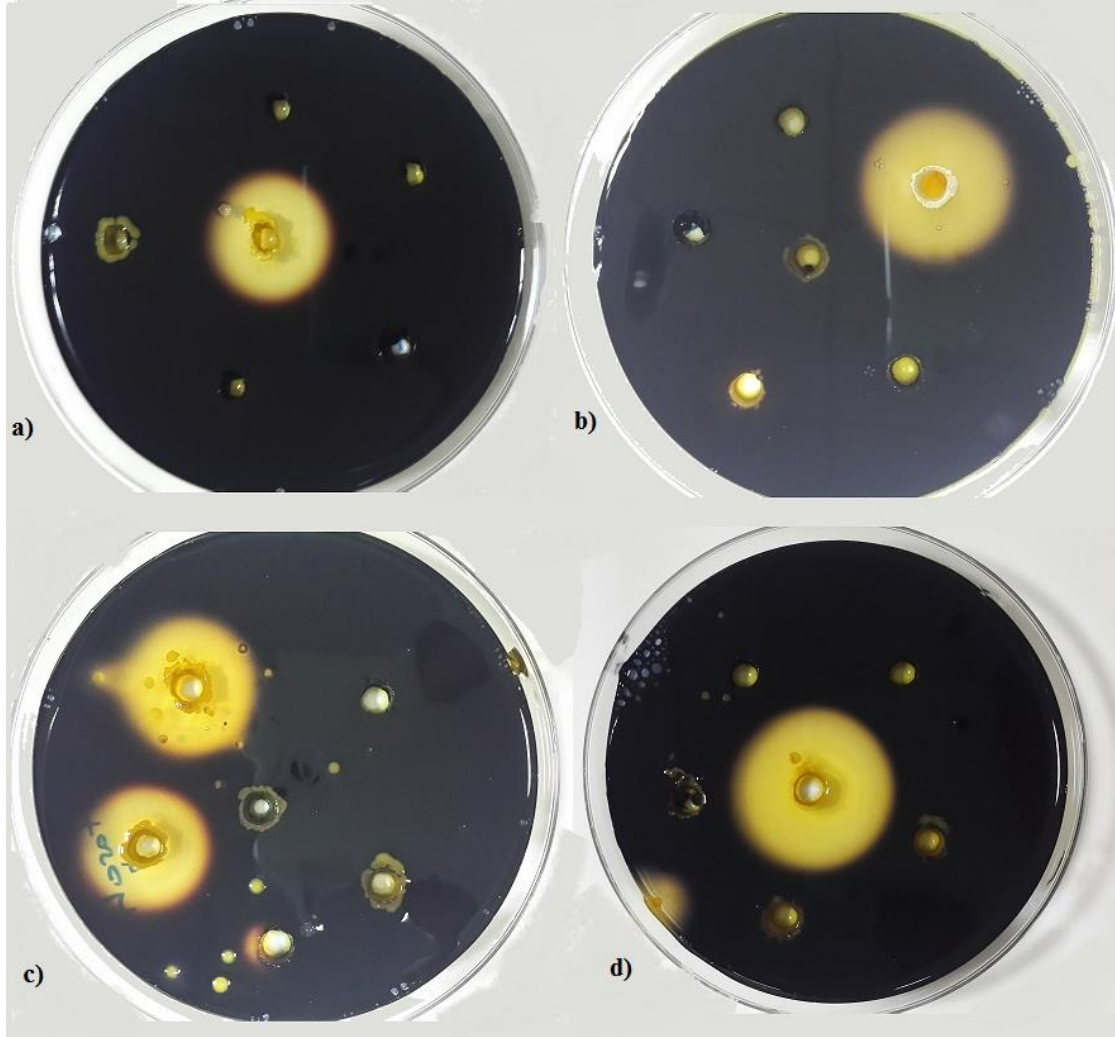
33.	AT-06-001	-	-	-	-	-	-
34.	AT-06-002	22	26	26	-	-	-
35.	AT-06-003	-	-	-	-	-	-
36.	AT-06-004	-	-	-	-	-	-
37.	AT-07-001	22	20	18	14k	16k	-
38.	AT-07-002	24	28	34	12k	-	8k
39.	AT-07-003	-	-	-	12k	7	-
40.	AT-07-004	-	-	-	-	-	-
41.	AT-07-005	-	-	8	-	-	-
42.	AT-07-006	-	-	-	-	24k	-
43.	AT-07-007	-	-	-	8k	-	-
44.	AT-07-008	7	-	-	-	-	-
45.	AT-08-001	-	-	22	14	-	-
46.	AT-08-002	8	-	20	8k	-	-
47.	AT-08-003	-	-	-	-	-	-
48.	AT-09-001	-	-	12	-	-	-
49.	AT-09-002	-	-	-	-	-	-
50.	AT-09-003	-	20k	22	16	20k	-
51.	AT-09-004	-	20k	28	12k	12	-
52.	AT-10-001	-	-	-	-	11	-
53.	AT-10-002	-	-	-	-	-	-
54.	AT-10-003	30	26	30	16	-	-
55.	AT-10-004	10	-	22	10k	34k	-

*Katı ortamda hidroliz zon çaplarına kuyucuk çapı (5 mm) dâhildir, k; kısmi zon oluşumu, -; negatif.

Sonuçlarımıza göre 14 farklı izolat önemli sayılabilecek miktarlarda farklı enzimleri üretebilme kapasitesine sahiptir. En fazla enzim üretim kapasitesine sahip izolat AT-01-006 nolu bakteri olarak görülmektedir.

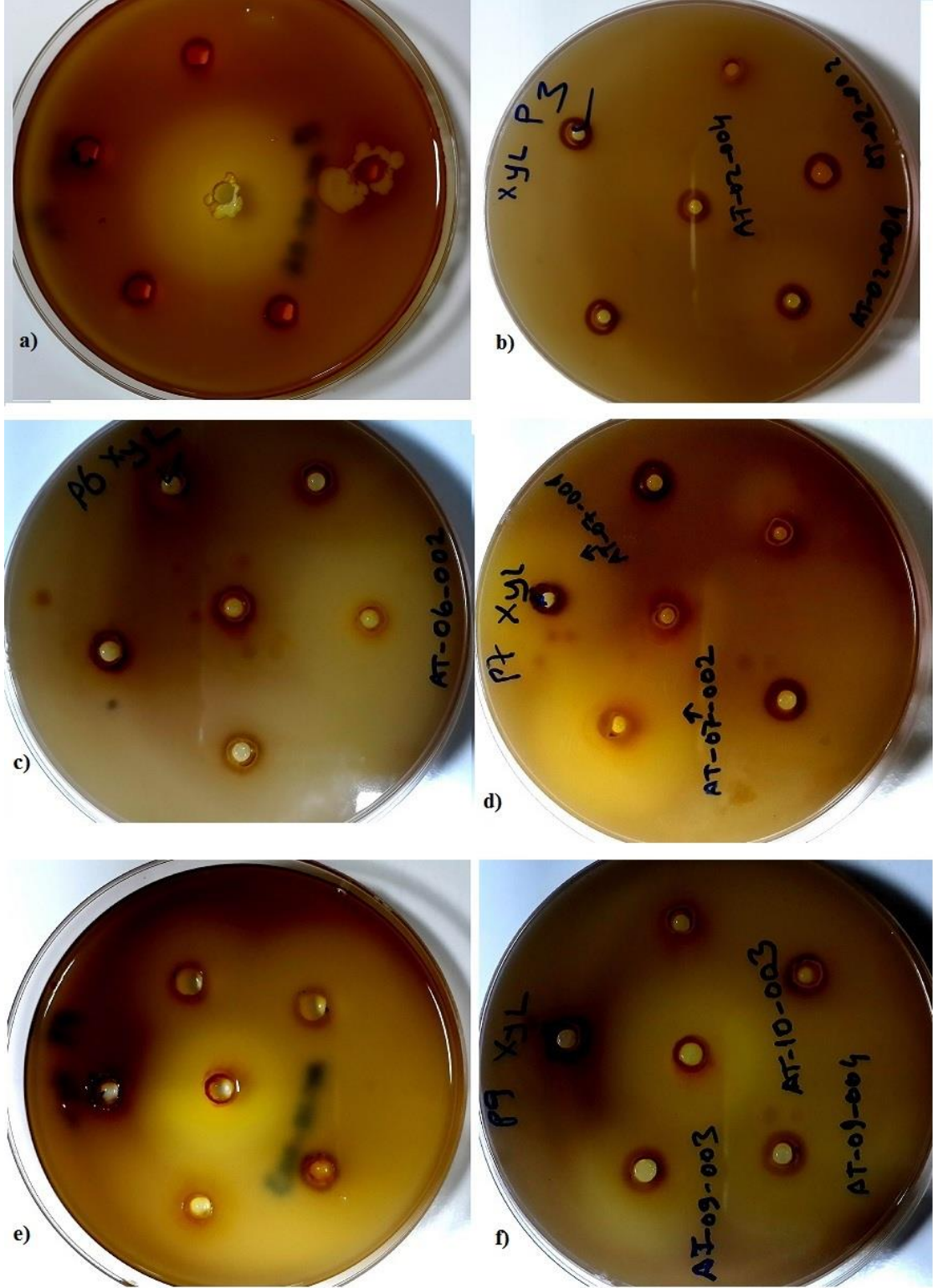
Amilaz değerlendirilmesi, %0.8 nişasta içeren katı besiyerine inoküle edilen izolatların inkübasyonu sonrası petrilerin gram iyodür ile muamelesi sonrası gerçekleştirilmiştir. İyodür testi sonrasında maviye boyanan besiyeri üzerinde izolatların nişastayı parçaladığı bölgeler renksiz olarak kalmış ve amilaz üretimi pozitif kabul edilmiştir. Yapılan tarama sonucunda pH 7.5 ve %10 tuz konsantrasyonlu besiyerinde izolat AT-01-006 koloni etrafında 24 mm açık zon oluşturmuştur. AT-01-006 izolatının amilaz enzimi üreticisi olduğu açıkça söylenebilir. Diğer izolatlar; AT-04-001, AT-06-002, AT-07-001, AT-07-002, AT-07-008,

AT-08-002, AT-10-003 ve AT-10-004 tarafından sırasıyla 26, 22, 22, 24, 7, 8, 30 ve 10 mm belirgin bir zon çapı görülmüştür (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Halofilik Bakterilerin Nişasta İçeren Katı Ortamda Amilaz Üretimi (Soldan sağa sırasıyla izolat a) AT-01-006, b) AT-04-001, c) AT-07-001, AT-07-002 ve d) AT-10-003).

%10 tuz konsantrasyonunda hazırlanan %0.8 BWC içeren katı besiyerine ekilen izolatlar, 30°C’de 3 gün inkübe edilmiş ve büyümeleri gerçekleştirilmiştir. BWC içeren katı besiyerinde izolatların ksilanı hidrolize etmeleri sonucunda temiz ve açık zon görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.6.). AT-01-006 izolatı %10 tuz konsantrasyonunda ksilan enzimi üreticisi olduğu açıkça söylenebilir. İzolat AT-01-006, AT-01-010, AT-02-001, AT-02-002, AT-02-004, AT-04-001, AT-06-002, AT-07-001, AT-07-002, AT-09-003, AT-09-004 ve AT-10-003 sırasıyla 45, 13, 18, 12, 12, 34, 26, 20, 28, 20, 20 ve 26 mm çapında ksilan hidroliz zonu oluşturmuştur.



Şekil 4.6. Halofilik Bakterilerin BW-Ksilan İçeren Katı Ortamda Ksilanaz Üretimi.

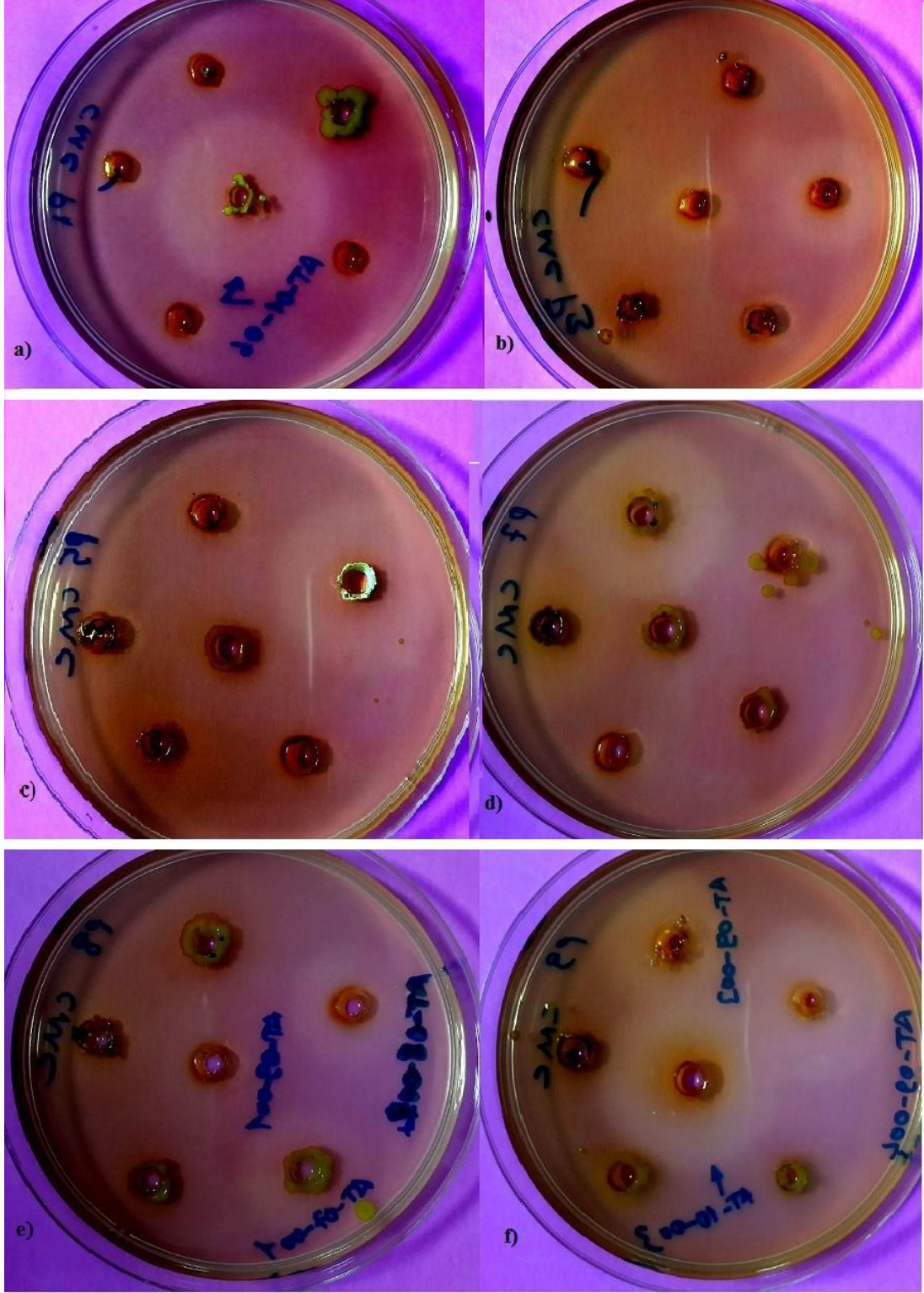
%10 konsantrasyonunda tuz ilaveli %1 CMC içeren katı besiyerine ekilen izolatlar, 30 °C’de 3 gün inkübe edilerek geliştirilmişlerdir. Selüloz içeren katı besiyerinde izolatların selülozu hidrolize etmeleri sonucunda temiz ve açık zon görülmesi pozitif olarak

değerlendirilmiştir. Zon oluşumu selülozun selülaz enziminin hidrolizini ifade etmektedir (Şekil 4.7.). AT-09-003, AT-09-004 ve AT-10-003 izolatlarının %10 tuz konsantrasyonunda selülaz enzimi üreticisi olduğu açıkça söylenebilir. İzolat AT-01-006, AT-01-007, AT-01-008, AT-01-009, AT-01-010, AT-01-011, AT-01-012, AT-02-002, AT-02-004, AT-04-001, AT-06-002, AT-07-001, AT-07-002, AT-07-005, AT-08-001, AT-08-002, AT-09-001, AT-09-003, AT-09-004, AT-10-003 ve AT-10-004'in sırasıyla 34, 10, 10, 12, 10, 12, 10, 24, 12, 30, 26, 18, 34, 8, 22, 20, 12, 22, 28, 30 ve 22 mm çapında selüloz hidroliz zonu oluşturduğu belirlenmiştir.

Citrus Pektin içeren katı besiyerlerine ekilen izolatlar, 30 °C'de 3 gün inkübe edilerek geliştirilmişlerdir. Büyümlerin gerçekleştiği koloni etrafındaki bölgelerde açık pektin hidrolizi zonlarının görülmesi pektinaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.8.). Yapılan tarama sonucunda AT-09-004 izolatının %10 tuz konsantrasyonunda pektinaz enzimi üreticisi olduğu açıkça söylenebilir. İzolatlarımız 8-16 mm arasında değişen oranlarda pektinaz hidroliz zonu göstermişlerdir.

%0.8 kazein içeren katı besiyerlerine ekilen izolatlar, 30 °C'de 3 gün inkübe edilerek geliştirilmişlerdir. Büyümlerin gerçekleştiği koloni etrafındaki bölgelerde açık kazein hidrolizi zonlarının görülmesi kazeinaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Koloni etrafında kazeinin hidrolizi sonrası izolatlarımız 8-34 mm aralığında değişen oranlarda kısmi zon çapı oluşturmuştur.

%1 tribütirin içeren farklı tuz konsantrasyonlarında hazırlanan besiyerinde izolatların çevresinde transparan zonların oluşmadığı gözlenmiş ve izolatların lipaz enzimi üretmediği tespit edilmiştir. Sadece AT-07-002 nolu izolatın koloni etrafında kısmi bir zon oluşumu gözlenmiştir (Tablo 4.5.).



Şekil 4.7. Halofilik Bakterilerin CMC İçeren Katı Ortamda Selüloz.

Tablo 4.6. Seçilen Halofilik Bakterilerin Zamana Bağlı Enzim Üretimleri.

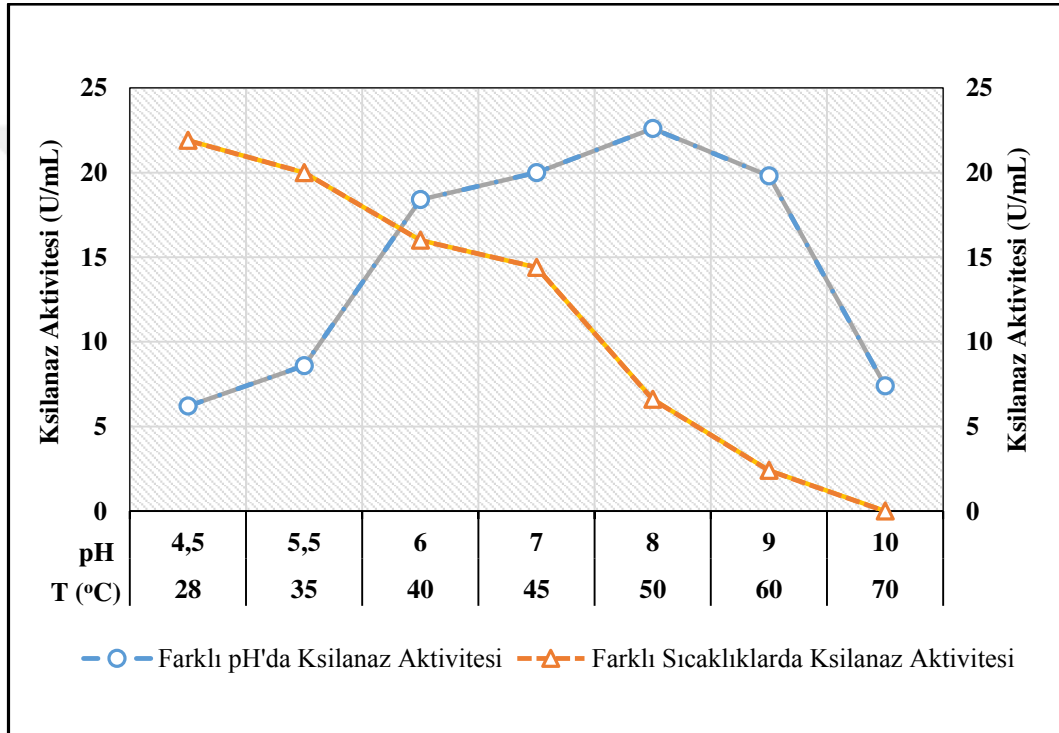
	Enzim Aktivitesi (U/mL)											
	Ksilanaz			Selülaz			Amilaz			Pektinaz		
	Zaman (h)			Zaman (h)			Zaman (h)			Zaman (h)		
İzolot No ^a	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
AT-01-006	8.3 ± 0.30 ^b	14.3 ± 0.56	21.9 ± 0.75	ND	ND	ND	3.2 ± 0.28	8.5 ± 0.30	11.6 ± 0.30	ND	ND	ND
AT-02-001	2.3 ± 0.23	6.4 ± 0.25	9.2 ± 0.38	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AT-02-002	2.0 ± 0.28	5.2 ± 0.46	8.6 ± 0.30	6.4 ± 0.36	10.3 ± 0.74	18.4 ± 0.58	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AT-04-001	4.8 ± 0.80	13.4 ± 0.30	18.6 ± 0.86	6.0 ± 0.26	13.8 ± 0.42	20.3 ± 0.84	3.8 ± 0.34	10.4 ± 0.52	16.3 ± 0.72	1.6 ± 0.22	3.8 ± 0.26	6.4 ± 0.52
AT-06-002	6.0 ± 0.40	12.8 ± 0.44	19.4 ± 0.75	5.2 ± 0.30	12.4 ± 0.36	18.8 ± 0.90	2.4 ± 0.38	8.2 ± 0.66	14.9 ± 0.64	ND	ND	ND
AT-07-001	3.6 ± 0.24	10.2 ± 0.58	14.4 ± 0.34	2.2 ± 0.80	6.6 ± 0.32	10.1 ± 0.75	2.8 ± 0.24	5.2 ± 0.53	10.6 ± 0.82	ND	ND	ND
AT-07-002	6.3 ± 0.28	14.1 ± 0.64	17.8 ± 0.66	6.0 ± 0.30	13.4 ± 0.34	22.2 ± 0.78	2.9 ± 0.30	8.8 ± 0.40	15.3 ± 0.88	ND	ND	ND
AT-08-001	ND	ND	ND	3.4 ± 0.22	10.6 ± 0.48	12.6 ± 0.58	ND	ND	ND	1.2 ± 0.33	4.4 ± 0.32	6.8 ± 0.66
AT-08-002	ND	ND	ND	3.0 ± 0.34	6.6 ± 0.52	10.3 ± 0.62	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AT-09-003	ND	ND	ND	2.8 ± 0.28	9.2 ± 0.46	11.6 ± 0.74	ND	ND	ND	1.8 ± 0.25	4.8 ± 0.34	8.6 ± 0.82
AT-09-004	ND	ND	ND	4.8 ± 0.62	12.7 ± 0.34	20.1 ± 0.58	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AT-10-003	5.8 ± 0.24	12.6 ± 0.68	19.8 ± 0.74	4.2 ± 0.46	14.6 ± 0.38	20.4 ± 0.86	3.3 ± 0.52	11.8 ± 0.68	18.2 ± 0.64	2.0 ± 0.46	6.3 ± 0.74	9.8 ± 0.44
AT-10-004	ND	ND	ND	2.4 ± 0.20	8.3 ± 0.36	10.8 ± 0.90	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a Kültür şartları: T=28 °C; başlangıç pH=7.5; çalkalama hızı=160 rpm; temel besiyeri bileşimi: Materyal ve Yöntem bölümünde verildiği gibidir. ^b Ortalama değerler ± standart sapma, n = 3. ND; katı ortam çalışmalarında enzim aktivitesi düşük veya hiç olmayan izolatların sıvı ortamda enzim analizleri belirlenmemiştir.

4.3.2.1.1. Sıcaklık ve pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi

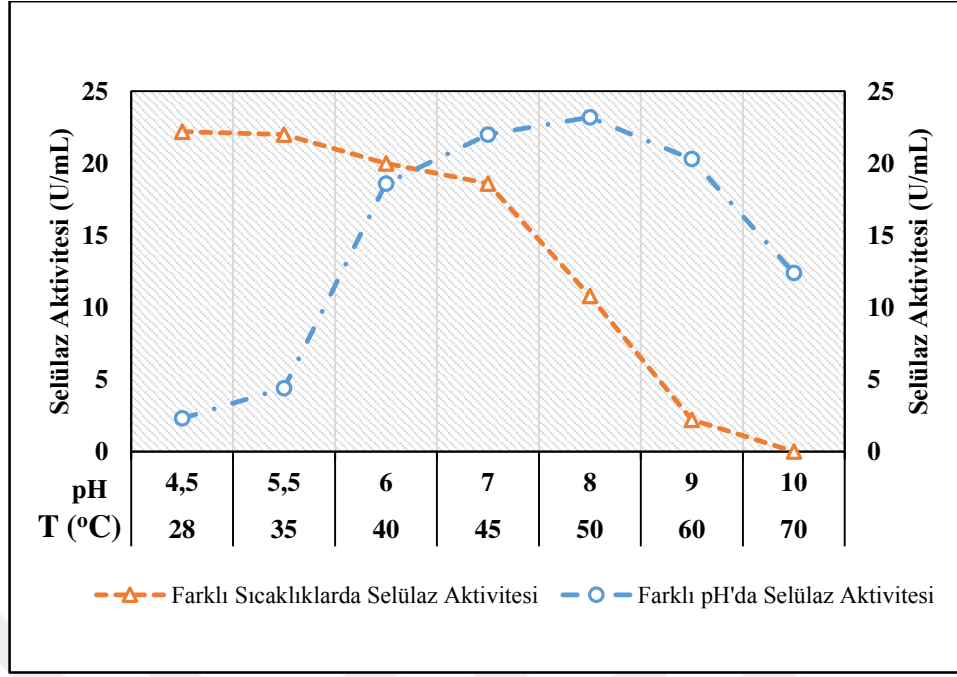
Denemeye alınan halofilik bakterilerin ürettiği enzimlere pH ve sıcaklığın etkisinin belirlenmesi Bölüm 3.2.3.4'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12'de verilmiştir.

AT-01-006 nolu izolatin ürettiği ksilanaz en yüksek aktivitesini 28 °C'de ve pH, 8'de göstermiştir. 45 °C sıcaklıkta yapılan inkübasyonlar sonucu enzim aktivitesi yaklaşık olarak %35 azalmaktadır. Aynı enzim farklı pH'larda daha stabil bir aktivite göstermektedir.



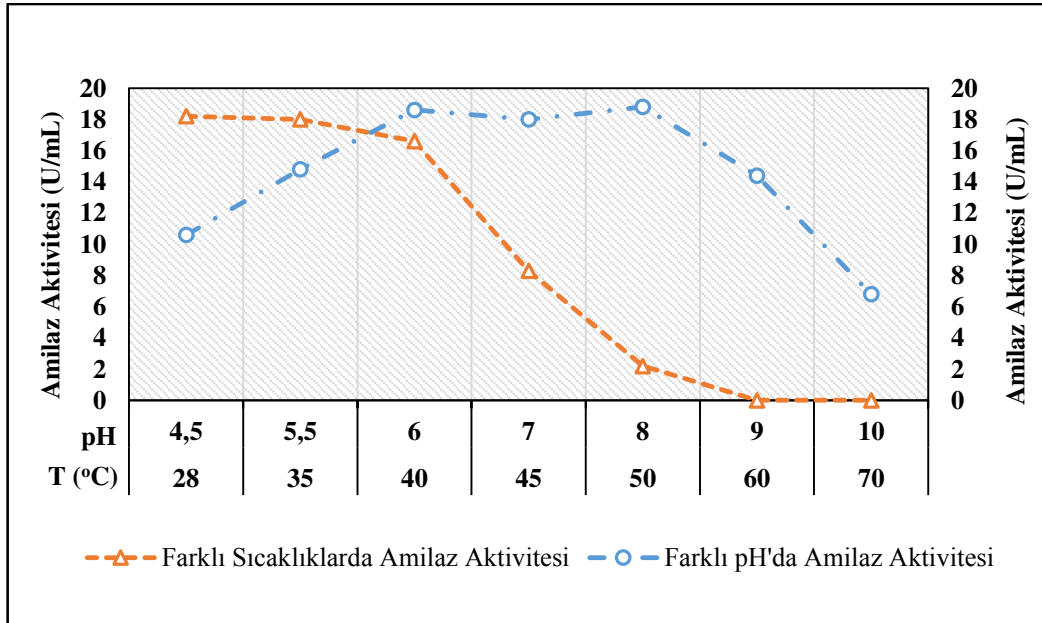
Şekil 4.9. AT-01-006 nolu Bakterinin Ksilanaz Aktivitesine Farklı pH ve Sıcaklıklarının Etkisi.

AT-07-002 nolu bakterinin selülozünün optimum aktivite gösterdiği pH:8 olup, sıcaklık ise 35 °C olarak belirlenmiştir. Alkali pH değerlerinde aktivitesi giderek azalmaktadır. pH:9.0' da ve 30 °C'de aktivitesinin %80' ini korumaktadır.



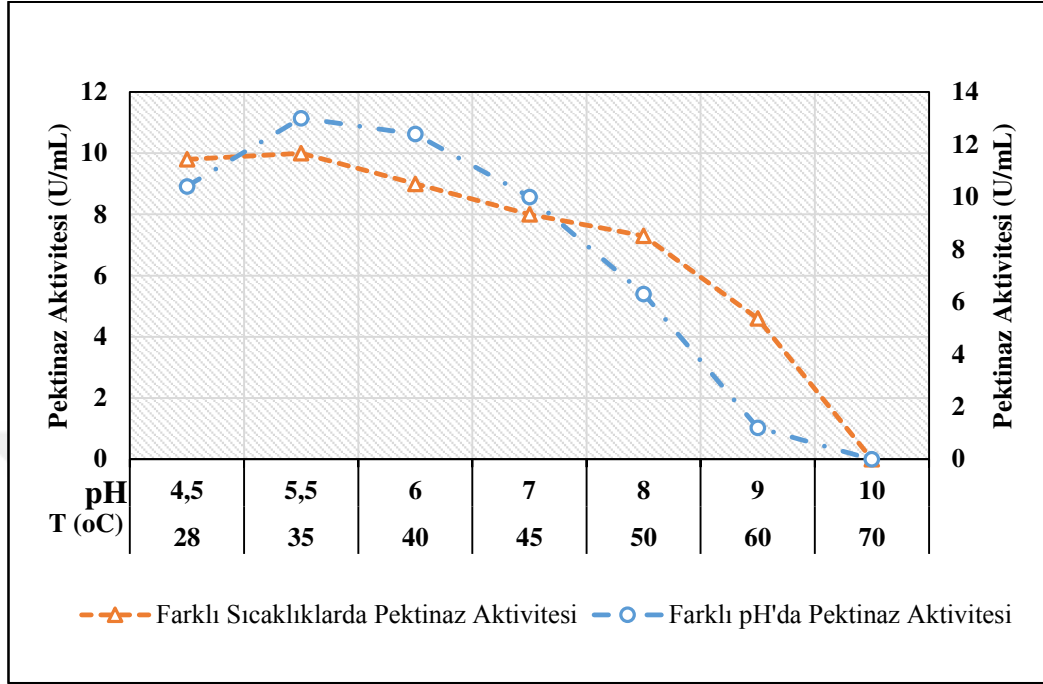
Şekil 4.10. AT-07-002 nolu Bakterinin Selüloz Aktivitesine Farklı pH ve Sıcaklıklarının Etkisi.

AT-10-003 nolu bakterinin amilaz aktivitesi farklı pH'da farklı sürelerde inkübasyon sonucunda değişkenlik göstermekle beraber en iyi stabil olduğu pH 6-8 aralığıdır. Diğer pH değerlerinde aktivite önemli derecede azalmaktadır. Optimum aktivite göstermiş olduğu sıcaklık ise 35 °C'dir.



Şekil 4.11. AT-10-003 nolu Bakterinin Amilaz Aktivitesine Farklı pH ve Sıcaklıklarının Etkisi.

AT-10-003 nolu izolatin pektinaz aktivitesi genellikle hafif asidik pH'larda (4.5-6) yüksek olup, optimum aktivite sıcaklığı ise 35 °C'dir. 45 ve 50 °C'lerde 10 dk. inkübasyon ile aktivitesini sırasıyla %90 ve %80 olarak korumaktadır.

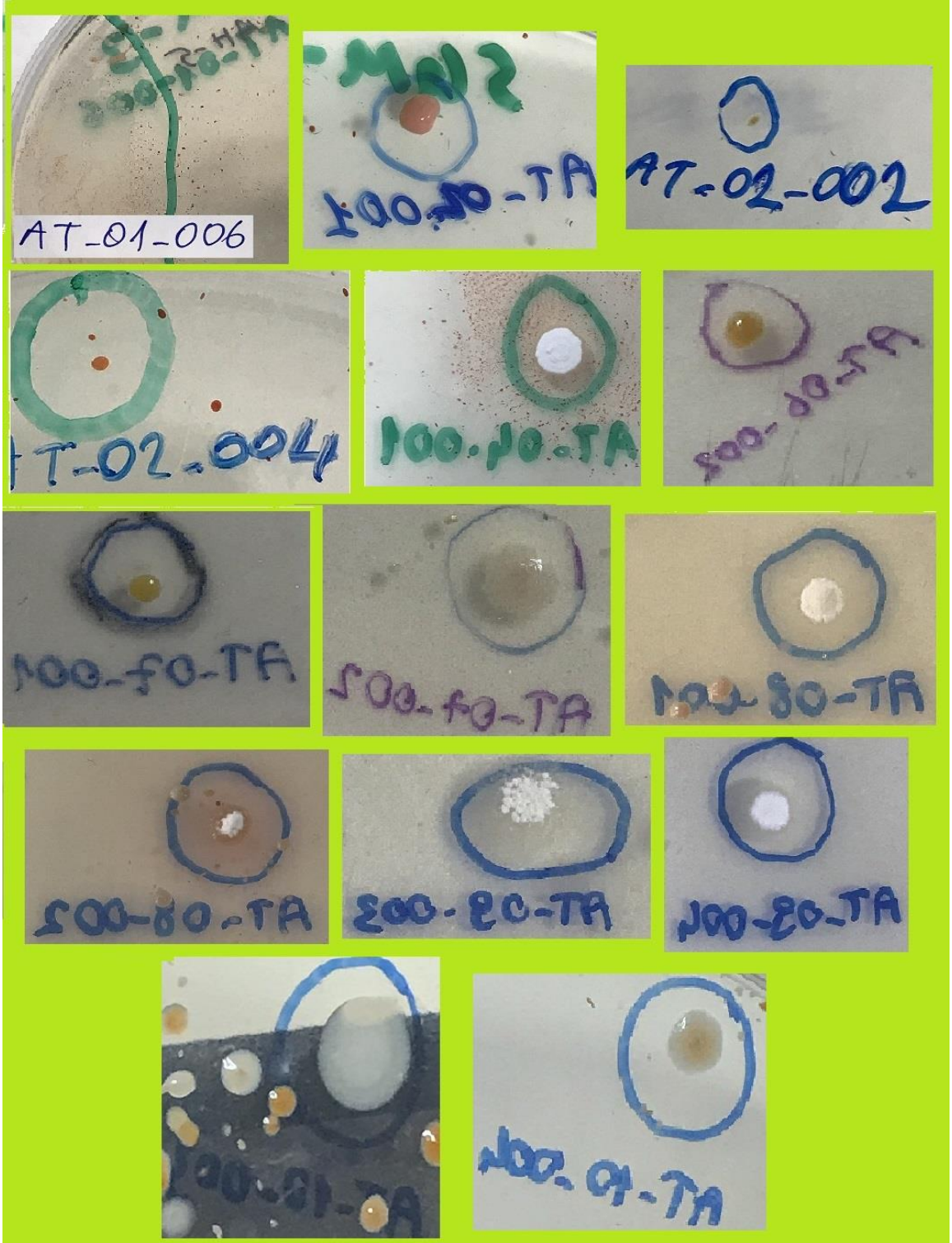


Şekil 4.12. AT-10-003 nolu Bakterinin Pektinaz Aktivitesine Farklı pH ve Sıcaklıklarının Etkisi.

4.4. Seçilen Halofilik Bakterilerin Tanımlanması

4.4.1. Morfolojik ve Kültürel Testler

Seçilen ve tanımlanan halofilik bakterilerin koloni görünüşleri Şekil 4.13.'de verilmiştir.



Şekil 4.13. Seçilen ve Tanımlanan Halofilik Bakterilerin Koloni Görünümleri.

Çalışma sonucunda elde edilen izolatların koloni çapı yaklaşık olarak 0.3-0.6 mm arasında olup, koloniler genellikle turuncu/kırmızı ve yakın renklerdedir. Koloniler çoğunlukla mukoit, nemli veya yapışkanimsı özellik taşımaktadır (Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. İzolatların Bazı Kültürel ve Morfolojik Karakterleri.

İzolat No	Besiyeri	Formu	Yükseltisi	Kenar Tipi	Büyüklüğü (mm)	Yüzey Görünümü	Yoğunluk	Renk	Işık Geçirgenliği
AT_01_001	SGM 2	Punktiform	Düz	Dalgalı	0.4	Buruşuk	Mukoit	Kırmızı	Opak
AT_01_002	SGM 2	Düzensiz	Konveks	Düz	0.7	Parlak	Mukoit	Krem	Opak
AT_01_003	SGM 3	Dairesel	Konveks	Düz	0.3	Parlak	Mukoit	Krem kırmızı	Opak
AT_01_004	SGM 3	Punktiform	Düz	Düz	Çok küçük	Pürüzsüz	Kuru	Kırmızı	Opak
AT_01_005	SGM 3	Punktiform	Düz	Düz	Çok küçük	Pürüzsüz	Kuru	Kırmızı	Opak
AT_01_006	SGM 3	Punktiform	Düz	Düz	Çok küçük	Pürüzsüz	Kuru	Kırmızı	Opak
AT_01_007	SGM 2	Düzensiz	Düz	Dalgalı	7	Buruşuk	Mukoit	Kırmızı	Opak
AT_01_008	SGM 1	Punktiform	Düz	Düz	Çok küçük	Pürüzsüz	Kuru	Kırmızı	Opak
AT_01_009	SGM 3	Punktiform	Düz	Düz	Çok küçük	Pürüzsüz	Kuru	Kırmızı	Opak
AT_01_010	SGM 2	Düzensiz	Konveks	Düz	0.8	Parlak	Mukoit	Krem	Opak
AT_01_011	SGM 3	Punktiform	Düz	Düz	Çok küçük	Pürüzsüz	Kuru	Kırmızı	Opak
AT_01_012	SGM 3	Dairesel	Düz	Düz	0.4	Damarlı	Nemli	Kırmızı	Transparant
AT_01_013	SGM 2a	Düzensiz	Konveks	Düz	Çok küçük	Pürüzsüz	Kuru	Kırmızı	Opak
AT_01_014	SGM 1	Dairesel	Konveks	Düz	0.5	Pürüzsüz	Mukoit	Turuncu	Transparant
AT_02_001	SGM 3	Düzensiz	Pülvinat	Düz	0.4	Sönük	Mukoit	Pembemsi	Opak
AT_02_002	SGM 3	Spindle (Mercek)	Düz	Düz	0.3	Sönük	Kuru	Krem	Opak
AT_02_003	SGM 3	Düzensiz	Yükselmiş	Düz	0.4	Buruşuk	Mukoit	Koyu krem	Opak
AT_02_004	SGM 3	Dairesel	Düz	Düz	0.5	Parlak	Mukoit	Turuncu	Opak
AT_02_005	SGM 3	Düzensiz	Düz	Düz	0.6	Pürüzsüz	Kuru	Beyaz	Transparant
AT_02_006	SGM 3	Düzensiz	Yükselmiş	Düz	0.3	Pürüzsüz	Mukoit	Turuncu	Opak
AT_03_001	SGM 3 PÜRAVATLI	Punktiform	Konveks	Düz	0.2	Parlak	Nemli	Kırmızı	Opak
AT_02_007	SGM 3	Dairesel	Düz	Düz	0.3	Sönük	Kuru	Turuncu	Transparant
AT_02_008	SGM 3	Dairesel	Düz	Düz	0.3	Sönük	Kuru	Beyaz	Transparant
AT_02_009	SGM 3	Düzensiz	Düz	Dalgalı	0.5	Sönük	Kuru	Beyaz	Transparant
AT_03_002	SGM 3 PÜRAVATLI	Düzensiz	Düz	Testere dişli	0.2	Parlak	Kuru	Kırmızı	Opak

AT_03_003	SGM 3	Punktiform	Düz	Düz	Çok küçük	Parlak	Nemli	Kırmızı	Opak
AT_04_001	SGM 3	Düzensiz	Yükselmiş	Dalgalı	0.6	Pürtüklü	Kuru	Beyaz	Opak
AT_04_002	SGM 3	Dairesel	Pülvinat	Düz	0.4	Parlak	Nemli	Kırmızı	Opak
AT_05_001	SGM 3	Dairesel	Pülvinat	Düz	0.5	Parlak	Nemli	Krem	Opak
AT_05_002	SGM 3	Dairesel	Konveks	Düz	0.4	Parlak	Nemli	Krem	Opak
AT_05_003	SGM 3	Dairesel	Yükselmiş	Düz	0.6	Sönük	Nemli	Sarımsı	Opak
AT_05_004	SGM 3	Dairesel	Yükselmiş	Düz	0.4	Sönük	Nemli	Sarımsı kahverengi	Opak
AT_06_001	SGM 3	Dairesel	Konveks	Düz	0.3	Parlak	Nemli	Krem	Opak
AT_06_002	SGM 3	Dairesel	Konveks	Düz	0.4	Parlak	Nemli	Koyu sarı	Opak
AT_06_003	SGM 3	Punktiform	Düz	Dalgalı	0.7	Sönük	Kuru	Beyaz	Opak
AT_06_004	SGM 3	Dairesel	Yükselmiş	Düz	0.4	Parlak	Nemli	Krem	Opak
AT_07_001	SGM 3	Dairesel	Konveks	Düz	0.3	Parlak	Nemli	Krem sarı	Opak
AT_07_002	SGM 3	Düzensiz	Yükselmiş	Dalgalı	0.7	Parlak	Nemli	Beyaz	Opak
AT_07_003	SGM 3	Dairesel	Konveks	Düz	0.3	Parlak	Nemli	Turuncu	Opak
AT_07_004	SGM 3	Dairesel	Yükselmiş	Düz	0.5	Parlak	Nemli	Beyaz	Opak
AT_07_005	SGM 3	Dairesel	Konveks	Düz	0.3	Parlak	Nemli	Turuncu	Opak
AT_07_006	SGM 3	Dairesel	Konveks	Düz	0.4	Parlak	Nemli	Koyu sarı	Opak
AT_07_007	SGM 3	Dairesel	Konveks	Düz	0.4	Parlak	Nemli	Turuncu kırmızı	Opak
AT_07_008	SGM 3	Düzensiz	Konveks	Düz	0.3	Sönük	Nemli	Kahverengi	Opak
AT_08_001	SGM 3	Filamentöz	Düz	Dalgalı	0.5	Pürtüklü	Kuru	Beyaz	Opak
AT_08_002	SGM 3	Dairesel	Pülvinat	Düz	0.4	Parlak	Yapışkanimsi	Kahverengibeyaz	Opak
AT_08_003	SGM 3	Dairesel	Konveks	Düz	0.3	Parlak	Nemli	Sarı	Opak
AT_09_001	SGM 3	Dairesel	Konveks	Düz	0.8	Parlak	Nemli	Beyaz	Opak
AT_09_002	SGM 3	Düzensiz	Düz	Dalgalı	0.4	Damarlı	Kuru	Beyaz	Opak
AT_09_003	SGM 3	Punktiform	Düz	Düz	0.5	Pürtüklü	Kuru	Beyaz	Opak
AT_09_004	SGM 3	Filamentöz	Konveks	Filamentöz	0.5	Damarlı	Kuru	Beyaz	Opak
AT_10_001	SGM 3	Dairesel	Pülvinat	Düz	0.2	Parlak	Nemli	Sarı	Opak
AT_10_002	SGM 3	Dairesel	Pülvinat	Düz	0.4	Parlak	Nemli	Turuncu	Opak
AT_10_003	SGM 3	Dairesel	Düz	Düz	0.8	Parlak	Yapışkanimsi	Beyaz	Opak
AT_10_004	SGM 3	Dairesel	Yükselmiş	Düz	0.6	Parlak	Yapışkanimsi	Krem	Opak

4.4.2. Moleküler Sistemik Çalışmalar

4.4.2.1. DNA İzolasyonu, DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi

Enzimatik aktivitesi yüksek çıkan ve seçilen halofilik bakterilerden DNA izolasyonu bölüm 3.3.1. ve 3.3.2’de verilen yöntemle göre yapılarak, izole edilen DNA örneklerinin miktar tayini ve saflık derecesi, nanodrop (Thermo 2000c) 260 ve 280 nm’lerdeki absorpsiyonları dikkate alınarak belirlenmiştir (Tablo 4.2.). 260 nm’de ölçülen absorpsiyon değerleri (A260) DNA çözeltisindeki DNA miktarını ve 280 nm’de ölçülen absorpsiyon değerleri (A280) ise protein miktarını göstermektedir. A260/A280 oranı 1.90 ve buna yakın çıkan (± 0.2 birim) DNA örnekleri saf olarak kabul edilmiştir ve agaroz jel elektroforezi ile saflık dereceleri doğrulanmıştır. Bununla ilgili sonuçlar Tablo 4.8.’de görülmektedir.

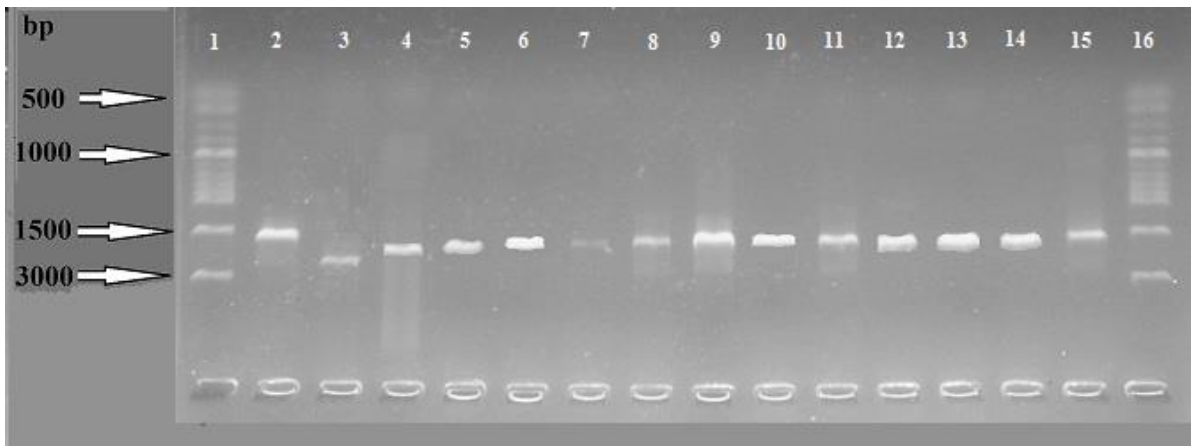
Tablo 4.8. DNA ve Protein Miktarı ile Saflık Oranları.

İzolat No	Nukleik Asit Konsantrasyonu (ng/ μ L)	A260	A280	260/280
AT-01-006	65.58	1.324	0.684	1.94
AT-02-001	232.00	4.620	2.394	1.93
AT-02-002	71.60	1.450	0.763	1.90
AT-02-004	148.00	3.160	1.660	1.90
AT-04-001	76.82	1.691	0.893	1.89
AT-06-002	80.68	1.748	0.980	1.78
AT-07-001	51.60	1.042	0.552	1.89
AT-07-002	166.00	3.320	1.730	1.92
AT-08-001	81.90	1.647	0.863	1.90
AT-08-002	84.70	1.764	0.912	1.93
AT-09-003	62.50	1.261	0.648	1.94
AT-09-004	47.12	1.072	0.559	1.92
AT-10-003	64.86	1.638	0.867	1.89
AT-10-004	92.35	1.770	0.934	1.89

PCR çalışmalarında genellikle DNA miktarı 40-80 ng/ μ L konsantrasyonda olan örnekler agaroz jel çalışmalarından sonra kontrol edilerek direkt olarak, 80 ng/ μ L konsantrasyonundan yüksek olanlar uygun şekilde seyreltilerek PCR reaksiyonlarında kalıp DNA olarak kullanılabilmiştir.

4.4.2.2. 16S rRNA Geninin PCR Amplifikasyonu

Her bir izolattan saflaştırılan genomik DNA kalıp olarak kullanılarak, 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için, evrensel iki primer 27F ve 1525R aracılığı ile Bölüm 3.3.3.'de verilen yöntem, PCR bileşenleri ve koşulları ışığında reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Sonrasında PCR ürünleri UV transillüminatör'de (gLite gel scanner) incelenerek tek saf olarak bank oluşturanlar sekans analizleri için ayrılarak -20 °C'de saklanmıştır. Toplamda 14 Halofilik bakterinin PCR amplifikasyonu ile elde edilen ürünleri sekans analizine gönderilmiş ve sonuçlar alınmıştır. PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntülerinden bazıları Şekil 4.14.'de verilmektedir.



Şekil 4.14. Bazı Halofilik Bakterilerden İzolatlardan Elde PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüleri (1 ve 16, 100 bp DNA markır, 2-15 izolatların PCR ürünü).

4.4.2.3. 16S rRNA Gen Dizi Verilerinin Analizi, Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması ve Filogenetik Dendogramın Oluşması

Bölüm 3.3.4.'de verilen yöntemle yapılmıştır. 16S rRNA sekans verileri alındıktan sonra ham diziler BioEdit Sequence Alignment Editor (V, 7.2.5.) ve MEGA X (V, 10.0.4) programı kullanılarak düzenlenmiş, muhtemel türlerin belirlenmesi amacıyla gen bankasındaki verilerle karşılaştırmak amacıyla blastlanmıştır. Elde edilen ve düzenlenen izolatların 16S rRNA sekans verilerinin gen bankasıyla karşılaştırılması sonucu en yüksek (%97 ve üzerinde) benzerlik gösteren halofilik bakterilerin verileri Tablo 4.9.'da verilmiştir.

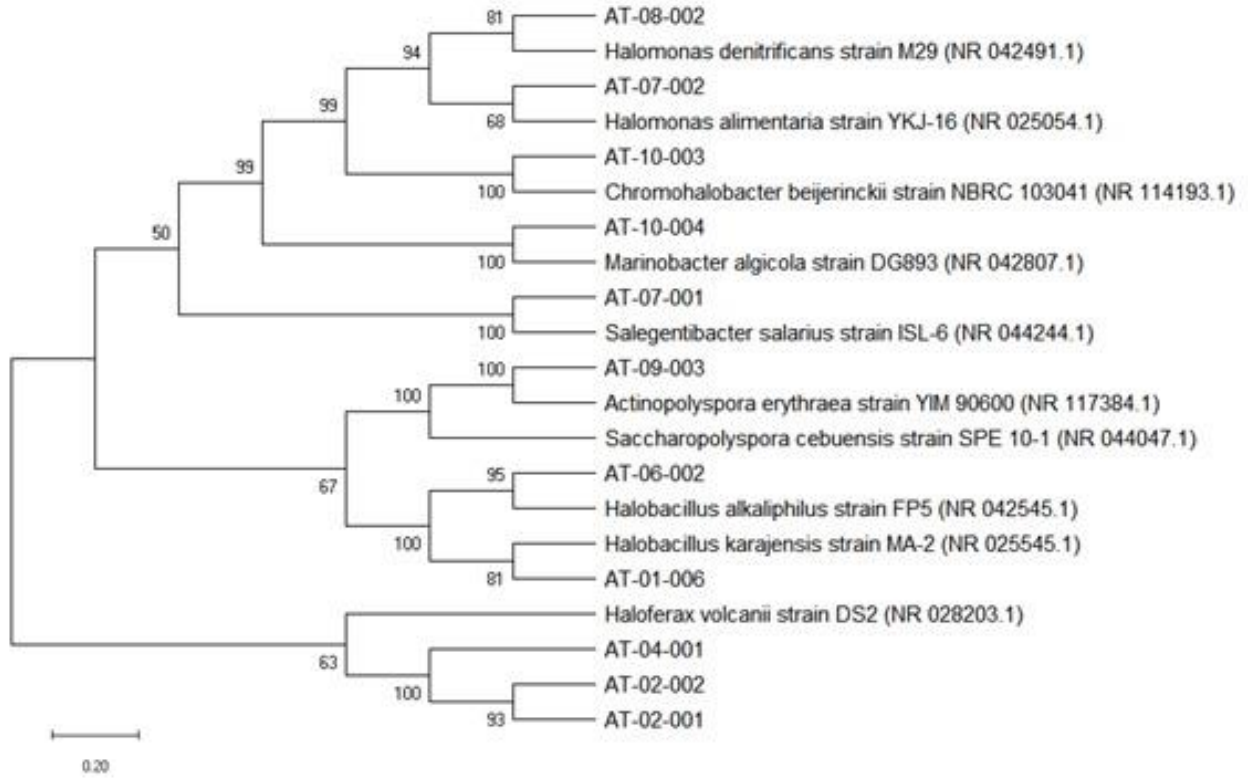
Tablo 4.9. 16S rRNA Dizilerinin Gen Bankası (NCBI: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) Verileri ile Karşılaştırılması.

İzolat No:	Eşleşen (En yüksek benzerlik gösteren) Muhtemel Cins/Tür	Edited sekans/nb sayısı	Benzerlik (%)	Gen Bank Erişim No*	Atanan Cins/Tür**
AT-01-006	<i>Halobacillus karajensis</i> strain Marseille-P796	1510	99	LT558816.1	<i>Halobacillus karajensis</i>
AT-02-001	<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500	1423	90	CP001868.2	<i>Haloferax</i> sp.
AT-02-002	<i>Haloferax volcanii</i> DS2	617	88	CP001956.1	<i>Haloferax</i> sp.
AT-02-004	Kromatogram sonuçlarının kalitesi düşük olduğundan dolayı sekans verileri kullanılamamıştır.				
AT-04-001	<i>Saccharopolyspora cebuensis</i> strain UMBR 0027	443	95	KY243966.1	<i>Saccharopolyspora</i> sp.
AT-06-002	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> strain CQB-14	1509	99	KR347221.1	<i>Halobacillus alkaliphilus</i>
AT-07-001	<i>Salegentibacter salarius</i> strain ISL-6	1471	97	NR_044244.1	<i>Salegentibacter salarius</i>
AT-07-002	<i>Halomonas tabrizica</i> strain TBZ21	1484	97	EU305728.1	<i>Halomonas alimentaria</i>
AT-08-001	Kromatogram sonuçlarının kalitesi düşük olduğundan dolayı sekans verileri kullanılamamıştır.				
AT-08-002	<i>Halomonas denitrificans</i> strain A113	1481	98	EU541350.1	<i>Halomonas denitrificans</i>
AT-09-003	<i>Actinopolyspora indiensis</i>	1484	98	AY015427.1	<i>Actinopolyspora erythraea</i>
AT-09-004	Kromatogram sonuçlarının kalitesi düşük olduğundan dolayı sekans verileri kullanılamamıştır.				
AT-10-003	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i> strain Delft E.III.9.23.1	1499	98	NR_036840.1	<i>Chromohalobacter beijerinckii</i>
AT-10-004	<i>Marinobacter algicola</i> strain DG893	1493	96	NR_042807.1	<i>Marinobacter algicola</i>

*Gen Bankası erişim numaraları en yüksek benzerlik gösteren muhtemel türlere aittir. **Son belirlenen (Atanan) türlerin tespitinde kültürel karakterlerden yararlanılmıştır.

Sonuçlarımıza göre Halofilik bakterilerden %97 ve üzerinde benzerlik gösteren türler tabloda listelenmiştir. %97 ve altında benzerlik gösterenler ise cins bazında (3 adet) belirtilmiştir. Toplamda yüksek benzerlik gösteren ve tür bazında belirlenebilen bakteri sayısı 8'dir. Cins bazında tanımlanan bakterilerin benzerlik oranı düşük olup yeni tür olma ihtimali yüksektir. İdentifikasyonu yapılan bakterilerin (tür bazında olanlar) gen bankasına sunulması ve erişim numaralarının alınması için çalışmalarımız devam etmektedir.

16S rRNA gen analizi filogenetik dendogramları, için databanklardan elde edilen halofilik bakteri tip örneği 16S rRNA gen dizileri ile test bakterilerinin gen dizileri karşılaştırılarak tür veya cins seviyesinde tanımlamaları yapılmıştır. Filogenetik analizler için ise MEGA X (V, 10.0.4) paket programından yararlanılmış, Neighbour-joining ve Maximum Composite Likelihood algoritmaları kullanılarak dendogramları oluşturulmuştur (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. Seçilen ve Tanımlanan Strainlerin Halofilik Bakteri Tip Türleri ile Evrimsel İlişkileri. (Evrimsel analizler Neighbor-Joining method ile 1000 replikattan elde edilen bootstrap konsensüs ağacı kullanılarak çıkarılmıştır. %50'den daha az filogenetik dallanmalar gösterilmemektedir. Evrimsel uzaklık Maksimum Kompozit Likelihood yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır [153]. Boşluklar ve eksik veriler içeren tüm pozisyonlar elenmiştir).

Strainlerin %G+C oranı, nukleotit frekansları ve toplam nukleotit sayıları Tablo 4.10.'da belirtilmiştir.

Tablo 4.10. Strainlerin Nukleotit Frekansları ve Toplam Nukleotit Sayıları.

Strain No	Nukleotit Frekansı (%)					Toplam
	T(U)	C	A	G	G + C Oranı	
AT-01-006	19.5	23.6	25.1	31.7	55.3	1510
AT-02-001	19.5	25.4	28.3	26.8	52.2	1423
AT-02-002	27.7	24.6	23.3	24.3	48.9	617
AT-04-001	19.6	33.5	22.6	24.2	57.7	433
AT-06-002	19.4	24.1	25.0	31.5	55.6	1509
AT-07-001	21.8	22.7	26.9	28.6	51.3	1471
AT-07-002	19.1	24.1	24.4	32.5	56.6	1484
AT-08-002	19.4	23.8	24.8	31.9	55.7	1481
AT-09-003	20.4	24.1	20.1	35.4	59.5	1484
AT-10-003	18.9	24.5	24.5	32.0	56.5	1499
AT-10-004	19.6	24.3	24.8	31.2	55.5	1493
Ortalama	20.4	24.6	24.1	30.8	55.4	1309.5

5. TARTIŞMA

Balıkesir/Ayvalık Tuzlasından toplanan örneklerden modifiye besiyerlerine, 10^{-4} e kadar seyreltme yapıp ekimleri yapılmıştır ve gelişmenin az olduğu görülmüştür. Halofil bakterileri yoğun karışık kültür populasyonlarından saflaştırmak için çizgi ekim denemeleri yapılmıştır fakat yoğun tuz konsantrasyonunun agarın katılaşma derecesini düşürmesinden dolayı tek koloniden saf kültür elde etme tekniği uygulanamamıştır. Daha sonra bu besiyerlerinden en iyi %15-20 tuz konsantrasyonu içeren SGM-3 besiyerinde gelişme görülmüştür ve bu besiyerine seyreltme yapılmadan dökme plaka yapılarak tuzlu su örneklerinden yapılan kültürasyonların sayım sonucu olarak (Şekil 4.2.), 10 farklı havuzdan farklı besiyerlerine izolasyon ile halofilik bakteri toplam sayım sonuçları ortalama kob/mL olarak Tablo 4.4. verilmiştir. İzolasyon ortamlarında ortalama olarak toplam halofilik mikroorganizma sayısı 1.2×10^3 olarak tespit edilmiştir. 1988'de Rodriguez ve ark. [154] yaptıkları araştırmada sadece %25 tuz konsantrasyonu ve maya ekstraktı bulunan seçici-zenginleştirici olmayan besiyerinde kolonilerin varlığını ispatlamışlardır. Aynı çalışmada, izolasyona alınan ve büyüme görülen kolonilerin sıvı kültürleri hazırlanmıştır ve her uygulama sonrasında kültürler gram boyama yapılarak kontrol edilmiştir. İzolatların çoğu gram negatif boyanmıştır. Ventosa (2008) yaptığı çalışmada [155], çok geniş habitatlardan yüksek tuz konsantrasyonlarında halofil bakterileri izole etmiş ve tuzlaların hipersalin organizmalar için benzersiz bir ekosistem olduğunu, yüksek tuzluluktaki sulak alanlarda bakterilerin yaşadığını ve *Halobacteria* olarak adlandırılan grubun bu tür ortamlardaki biyotanın büyük bir bölümünü oluşturduğunu belirtmiştir. %10, %15, %20 ve %25 (w/v) olmak üzere farklı tuz konsantrasyonlarında izolasyon denemeleri yapılmıştır. Tablo 4.7.'de görüldüğü gibi toplam 55 izolat seçilmiştir. Bu izolatlar formu, yükseltisi, kenar tipi, büyüklüğü, yüzey görünümü, yoğunluğu, rengi ve ışık geçirgenliği bakımından incelenmiştir. 26 izolatın dairesel ve 14 izolatın halofilik pigmentlerinden dolayı kırmızı renkli olduğu tespit edilmiştir. Danson ve Hough (1997) tarafından yapılan çalışmalarda [156], izolatların kolonileri morfolojik ve kültürel özellikleri bakımından incelendiğinde çoğu koloni tiplerinin yuvarlak olduğunu tespit etmişlerdir. Gibbons (1969), yüksek tuz konsantrasyonlarında büyüeyebilen ve bu koşullara gereksinim duyan aynı zamanda kırmızı pigment üreten bu organizmaları, ekstrem halofilik bakteri olarak adlandırmış ve %15 (w/v) NaCl'den fazla tuz konsantrasyonlarında yaşayabildiklerini bildirmiştir [157]. Johnson 2007'de yaptığı çalışmada halofilik bakterilerin gram negatif, gram pozitif, aerobik, fakültatif anaerobik veya zorunlu anaerobik metabolizma sergilediklerini belirtmiştir [158].

14 farklı izolatımız önemli sayılabilecek miktarlarda farklı enzimleri üretebilme kapasitesine sahiptir. En fazla enzim üretim kapasitesine sahip *Halobacillus karajensis* olarak görülmektedir.

Bajpai ve ark. [159] 2015 yılında yaptıkları çalışmada, nişastalı agar petrilerinde 6 adet haloarkeal suşun amilaz aktivitelerini incelemişlerdir. 16S rRNA sonuçlarına göre cins bazında enzimatik aktiviteleri *Haloferax* sp. HA1 (1.4 U/mL) , *Haloferax* sp. HA3 (3.1 U/mL), *Haloferax* sp. HA4 (5.6 U/mL), *Haloferax* sp. HA8 (2.8 U/mL), *Haloferax* sp. HA9 (2.4 U/mL), *Haloferax* sp. HA10 (4.2 U/mL) olarak belirlemişlerdir. %12 tuz konsantrasyonunda en iyi sonucun *Haloferax* sp. HA10'a ait olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda %15 tuz konsantrasyonlarında 48 saat sonunda 16S rRNA'ya göre tanımlaması yapılan *Halobacillus karajensis* (11.6 U/mL), *Saccharopolyspora* sp. (16.3 U/mL), *Halobacillus alkaliphilus* (14.9 U/mL), *Salegentibacter salarius* (10.6 U/mL), *Halomonas alimentaria* (15.3 U/mL), *Chromohalobacter beijerinckii* (18.2 U/mL) amilaz enzimi ürettikleri tespit edilmiştir. Bu değerlerimizin diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Fitriani ve ark. [160] 2018'de çalışmalarında, %1 yağsız süt ile desteklenmiş MGM (Modified Growth Medium) agar petrilerinde gelişen ve tanımlaması yapılan TANN4 (*Halobacillus trueperi*), TR 1 (*Virgibacillus pantothenticus*), TR 2 (*Halobacillus trueperi*), ve TR 4'ün (*Halobacillus trueperi*) sırasıyla 11.85 U/mg, 5.28 U/mg, 4.59 U/mg, 0.55 U/mg proteaz ürettiklerini bulmuşlardır. Vijay ve ark. [161] halofilik bakterilerden elde edilen proteaz enzimi çalışmalarında, halotolerant bakterilerdeki proteaz varlığının yüksek tuz konsantrasyonunda inhibe olduğunu belirtmişlerdir. *Bacillus subtilis* ve *Aspergillus flavus*'da proteaz üretimi sırasıyla pH 6, 26 °C'de ve pH 8, 37 °C'de optimum büyüme göstermiştir. 2011'de Benazir ve ark. [162] yaptığı çalışmada da proteaz üretimi için optimum pH'ın 8 ve sıcaklığın 40 °C olduğunu bildirmişlerdir. Dodia ve ark. [163] 2006'da yaptığı çalışmada proteaz ortamını optimum pH 10, sıcaklık 37 °C olarak raporlamıştır. Bizim çalışmamızda %0.8 kazein içeren %10 ve %15 tuz konsantrasyonlarındaki katı besiyerlerinde 48 saat sonunda, tanımladığımız *Halobacillus karajensis*, *Saccharopolyspora* sp., *Salegentibacter salarius*, *Actinopolyspora erythraea* ve *Marinobacter algicola*'nın kısmı olarak proteaz ürettikleri belirlenmiştir. Proteaz üretimindeki kısmi üretimin besiyerinden kaynaklı bir problem olduğunu düşünülmektedir.

Selvarajan ve ark. [164] 2017'de yaptıkları çalışmada, SP7 (*Halobacillus alcaliphilus*) isimli izolatın selüloz aktivitesini 0.23 U/mL, SP8 ve SP22 (*Halobacillus alcaliphilus*) lipaz aktivitelerini sırasıyla 1.42 U/mL ve 1.72 U/mL olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda 30 °C, pH 7.5'de %1 Karboksi Metil Selüloz (CMC) içeren sıvı ortamda 72 saat sonraki ölçümlerde, *Haloferax* sp., *Saccharopolyspora* sp., *Halobacillus alcaliphilus*, *Salegentibacter salarius*, *Halomonas alimentaria*, *Halomonas denitrificans*, *Actinopolyspora erythraea*, *Chromohalobacter beijerinckii* ve *Marinobacter algicola* için selüloz üretimi sırasıyla 18.4, 20.3, 18.8, 10.1, 22.2, 10.3, 11.6, 20.4, ve 10.8 U/mL olarak tespit edilmiştir. Bolobova ve ark. 1992'de [165] selüloz kullanan ilk ekstremofilik halofil bakterileri raporlamışlardır ve zorunlu anaerobik organizma olan *Halocella cellulolytica*'nın, selülozu tek karbon kaynağı olarak kullandığını belirtmişlerdir. Dimitry ve ark. [166] ekstremofilik halofilik bakterilerin selüloz üzerinde büyümesinin en iyi 4 M NaCl, pH 7 ve 37 °C'de meydana geldiğini ve diğer enzimlerin üretimlerinde olduğu gibi selüloz enzimi üretiminin de ortamın tuzluluk konsantrasyonlarından etkilendiğini ve en iyi üretimin %5-%15 NaCl konsantrasyonunda elde edildiğini göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmada seçilen Halofilik bakterilerin en iyi enzim üretimleri %10-15 NaCl konsantrasyonunda meydana gelmektedir. %0.8 tribütirin içeren farklı tuz konsantrasyonlarında hazırlanan besiyerinde izolatların çevresinde transparan zonların oluşmadığı gözlenmiş ve izolatların lipaz enzimi üretmediği tespit edilmiştir. Sadece *Halomonas alimentaria*'da kısmi lipaz üretimi gözlenmiştir. Kouker ve Jaeger [167] lipaz aktivitesi için, tribütirin difüzyon agar yönteminin dünyadaki araştırmacılar için tercih edilen bir yöntem olduğunu fakat tribütirinin, tween 80 veya Nil mavisini gibi diğer esterolitik substlarla birlikte kullanılması gerektiğini savunmuşlardır ve çalışmalarında Rodamin B agar kullanıp iyi sonuç almışlardır. Farklı araştırmacılar da düşük konsantrasyonlarda %0.001-0.0002 (w/v) Rodamin B kullanmışlardır. Bunun nedeni, daha düşük Rodamin B konsantrasyonlarının net bir floresan oluşturmamasıdır. Bu protokolün başka bir dezavantajı da yüksek bir enzim titresi elde edildiğinde UV ışığı altında sadece açık bölgenin görülebilmesidir [168].

Çalışmamızda ksilanaz aktivitesi için, %10-%15 tuz konsantrasyonlarında 30 °C, pH 7.5'de %1 ksilan (BWC) içeren sıvı besiyerindeki gelişmeleri incelenmiş ve tanımlanmış *Halobacillus karajensis* (21.9 U/mL), *Haloferax* sp. (9.2 U/mL), *Saccharopolyspora* sp. (18.6 U/mL), *Halobacillus alkaliphilus* (19.4 U/mL), *Salegentibacter salarius* (14.4 U/mL), *Halomonas alimentaria* (17.8 U/mL), *Actinopolyspora erythraea* (11.6 U/mL) ve *Chromohalobacter beijerinckii* (19.8 U/mL)'nin ksilanaz ürettikleri tespit edilmiştir. WainØ

ve Ingvorsen [169] 2003'de yaptığı ksilanaz üretimiyle ilgili çalışmalarında *Halorhabdus utahensis*'ten izole edilen ksilanazın optimum aktivitesini pH 7.0'de gösterdiği saptamışlardır. Ekstrem halofilik *Halorhabdus utahensis* suşundan izole edilen β -ksilanaz enziminin %5-15 NaCl konsantrasyonunda optimum aktivite gösterdiğini ve β -ksilanaz enzimi aktivitesinin %20 NaCl'de 206 U/mL olarak belirlemişlerdir. Sanchez ve ark. [170] 2003 yılındaki çalışmalarında, Güney İspanyada hipersalin çevrelerden izole ettikleri 122 ılımlı halofilik bakteri izole etmişlerdir ve enzim aktivitelerini incelemişlerdir. Tanımlaması yapılan bakteriler, farklı tuz konsantrasyonunda amilaz, proteaz ve lipaz enzimleri üreten ksilanaz ve pullulanaz üretmemişlerdir. Collins ve ark. [171] 2004'de fungal ve bakteriyel kökenli ksilanaz çalışmalarında, ksilanazların 40 °C ve 60 °C sıcaklık değerleri arasında, pH 7'de (bakteri kökenli ksilanaz enzimleri) veya asitlik değeri az olan (fungal kökenli ksilanaz enzimleri) pH değerlerinde optimum aktivite değerlerine ulaştıklarını gözlemlemişlerdir. Wejse (2003) halofilik bakterilerden elde edilen iki ekstrem halotolerant ksilanaz enziminin pH 4-11 aralığında stabil olduklarını belirlemişlerdir [172].

%10-15 tuz konsantrasyonuna sahip, Citrus Pektin içeren sıvı besiyerinde 28 °C ve pH 7.5'de izolatlar incelenmiş ve tanımlanmış olan *Saccharopolyspora* sp. (6.4 U/mL), *Actinopolyspora erythraea* (8.6 U/mL) ve *Chromohalobacter beijerinckii*'nin (9.8 U/mL) pektinaz enzimi ürettikleri tespit edilmiştir. Diğer tanımlanmış türlerin katı ortam çalışmalarında pektinaz aktivitesi düşüktür. Mushtag ve ark. [173], 37 °C'de pH 7'de %1 pektin içeren besiyeri ortamında izolatların pektinolitik aktivitelerinin varlığını göstermişlerdir. Pektinaz üretiminin *Halobacillus* ve *Bacillus* türlerinde %55.8 olduğunu bildirilmişlerdir.

Genomik DNA ekstraksiyonu zor bir prosedürdür, çünkü lipitler, proteinler, RNA gibi diğer hücresel bileşenlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Birçok kez bakteriye özgü primerler kullanılarak fragmentlerin çoğaltılması işlemi yapılmaktadır. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması ve bu bölgelerin DNA dizi analizi sonuçlarına göre cins düzeyinde filogenetik tanımlamaları yapılmıştır. 16S rRNA geninin tamamı filogenetik ağaçlar üretmek için kullanılabilecek bilgiler sağlamaktadır, fakat türleri ayırt etmek için heterojen bölgeler daha da önem taşımaktadır [174]. Şu anki laboratuvar ve çalışma imkanlarımız dahilinde 16S rRNA analizleri sonucu tür bazında; bir adet %99 benzerlikle *Halobacillus karajensis* (Bacteria, Firmicutes, Bacillales, Bacillaceae, izolat no: AT-01-006), iki adet; %90 benzerlikle *Haloferax* sp. (Archaea, Euryarchaeota, Haloferacales, Haloferacaceae,

izolat no: AT-02-001) ve %88 benzerlikle *Haloferax* sp. (Archaea, Euryarchaeota, Haloferacales, Haloferacaceae, izolat no: AT-02-002) cinsi, bir adet %95 benzerlikle *Saccharopolyspora* sp. (Bacteria, Actinobacteria, Pseudonocardiales, Pseudonocardiaceae, izolat no: AT-04-001), bir adet %99 benzerlikle *Halobacillus alcaliphilus* (Bacteria, Firmicutes, Bacillales, Bacillaceae, izolat no: AT-06-002), bir adet %97 benzerlikle *Salegentibacter salarius* (Bacteria, Bacteroidetes, Flavobacteriales, Flavobacteriaceae, izolat no: AT-07-001), bir adet %97 benzerlikle *Halomonas alimentaria* (Bacteria, Gammaproteobacteria, Oceanospirillales, Halomonadaceae, izolat no: AT-07-002), bir adet %98 benzerlikle *Halomonas denitrificans* (Bacteria, Gammaproteobacteria, Oceanospirillales, Halomonadaceae, izolat no: AT-08-002), bir adet %98 benzerlikle *Actinopolyspora erythraea* (Bacteria, Actinobacteria, Actinopolysporales, Actinopolysporaceae, AT-09-003), bir adet %98 benzerlikte *Chromohalobacter beijerinckii* (Bacteria, Gammaproteobacteria, Oceanospirillales, Halomonadaceae izolat no: AT-10-003), bir adet %96 benzerlikle *Marinobacter algicola* (Bacteria, Gammaproteobacteria, Alteromonadales, Alteromonadaceae, izolat no: AT-10-004) olmak üzere toplam 11 adet izolat tanımlanmıştır. Ayrıca bu çalışma kapsamında kısmi aktivite gösteren veya hiç enzimatik aktivite göstermeyen bazı halofilik izolatlar; *Salicola salis* (AT-01-010), *Halomonas* sp. (AT-02-003), *Halomonas* sp. (AT-05-003), *Roseivivax* sp. (AT-05-001), *Marinobacter* sp. (AT-05-002) ve *Idiomarina loihiensis* (AT-05-004) tanımlamış olup, Ayvalık deniz tuzlasının halofilik bakteri çeşitliliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Mata ve ark. [175] 2002'de yaptıkları çalışmada, hipersalin habitatlardan izole ettikleri mikroorganizmaların çoğunun gram negatif ve *Halomonas* cinsi ile ilişkili olduklarını bulmuşlardır. Vahed ve ark. [176] 2011'de yapılan çalışmada, 16S rRNA gen analizlerine dayanan filogenetik analiz sonuçlarına göre izolatlarının çoğunun *Idiomarina*, *Salicola*, *Halomonas*, *Pseudomonas* ve *Marinobacter* gibi Gammaproteobacteria içindeki beş cinsin üyesi olduklarını göstermiştir. Aynı çalışmada 16S rRNA gen dizi analiziyle 3050^T olarak numaralandıran suşun, *Halovibrio denitrificans* ve *Halospina denitrificans* ile %98 dizilim benzerliği gösterdiğini ancak yeni bir tür olabileceği ifade edilmiştir. Amoozegar ve ark. [177] İran'da Karaj alanında yaptıkları çalışmada ılımlı halofil olan MA-2^T suşu olan *Halobacillus karajensis* izole etmişlerdir. 16S rRNA analizleri MA-2^T'nin filogenetik bakımdan *Halobacillus litoralis* ve *Halobacillus trueperi* türleriyle yakın olduklarını bulmuşlardır. Romano ve ark. [178] Güney İspanyada bir tuz gölünden izole ettikleri FP5^T suşunun 16S rRNA analizlerine ve fenotipik karakteristiklerine göre yeni bir

tür olan *Halobacillus alcaliphilus* olarak belirlemişlerdir. Kharroub ve ark. [179] 2006'da Cezayir'in kuzey doğusunda Ezzemoul Sabkha'dan toplanan tuzlu su örneklerinden yeni bakteri olan *Salicola salis* adlı bakteriyi izole etmişlerdir. 16S rRNA gen dizisi analizi, *Salicola salis*'in Gammaproteobacteria'daki *Salicola marasensis* ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir.

Ülkemizde bazı bölgelerde tuz alanlarında yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. Yaşa ve ark. [180] 2008 tarihinde, Çamaltı Tuzlasından izole ettikleri halofilik archaeaların biyokimyasal testleri, moleküler karakterizasyonlarını ve ekstraselüler enzimlerini de incelemişlerdir. İzolatlar, amilaz, selüloz ve lipaz aktivitesi göstermemiş olup; esteraz, proteaz ve DNaz aktiviteleri göstermiştir. Birbir ve ark.[181], Türkiye'nin en büyük tuz gölü olan Şereflikoçhisar gölünden bakterileri %25 tuz konsantrasyonu içeren modifiye besiyerinde izole edip biyokimyasal analizlere ve enzim aktivitelerine bakmışlardır. Erdoğan ve ark.[182] 2013'te Çamaltı Tuzlasında yaptıkları çalışmada, aromatik hidrokarbonları (p-hidroksi benzoik asit, naftalin, fenantren ve piren) parçalayabilen Arkeleri (*Halorubrum* sp. ve *Halorubrum ezzemoulense*) tespit etmişlerdir. Elevi ve ark.[183] Ayvalık Tuzlasından 7 tane halofilik arkea izole etmişler ve bu izolatların biyokimyasal ve polar lipid analizlerini incelemişlerdir. Özcan ve ark. [184] 2006'da Türkiye'nin farklı bölgelerinde (Tuz Gölü, Acı Göl, Salda Gölü, Seyfe Gölü, Tuzla Gölü, Bolluk Gölü) 95 tane halofilik suş izole etmişler ve bu izolatların morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine bakmışlardır. Demirci ve ark. [185] Çamaltı Tuzlasından izole ettikleri halofil bakteriler yardımıyla tekstil endüstrisinde kullanılan bazı azo metal kompleks boyalarının renk giderimini araştırmışlardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüze kadar Balıkesir Ayvalık Tuzlası'nda halofilik bakterilerin araştırılmasına yönelik çalışmalar yok denecek kadar azdır ve genellikle yapılan çalışmalar izolasyon ve fenotipik karakterlere dayalı tanımlamaya dayalıdır. Bu bölgede biyoteknolojik öneme sahip enzimlerin halofilik bakterilerden taranmasına yönelik ise hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışma kapsamında tanımlanan farklı enzimleri üretebilme potansiyeline sahip cins ve türler Ülkemizde ilk kayıtlar olmaları nedeniyle oldukça değerlidir ve kültür koleksiyonumuza kazandırılmıştır.

Ekstremofilik mikroorganizmaların en önemlilerinden birisi halofilik bakterilerdir, özellikle hipersalin ortamlarda ve tuzlada yaygın olarak bulunmaktadır. Balıkesir ilinde yer alan Ayvalık tuzlası halofilik organizmaların sınırlı yaşam alanlarından birisidir. Ayvalık tuzlası ayrıca Türkiye'nin deniz kaynaklı tuz üretim yerlerinden birisidir. Ülkemizin tuz ihtiyacını karşılayan Balıkesir Ayvalık Tuzlası'nın halofilik bakterilerinin ortaya konması ve enzim profillerinin belirlenmesi amacıyla, ekstremofilik halofil bakteriler açısından taranmıştır. Ekstrem ve ılımlı halofil olduğu belirlenen 14 ekstremofilik izolatın amilaz, selüloz ksilanaz, pektinaz enzimlerini ürettikleri belirlenmiştir. Tanımlanan izolatların ileri aşamalarda bazı biyoteknoloji, sağlık ve endüstriyel uygulamalar da da kullanılmaları hedeflenmektedir.

Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerde aranılan özellikler arasında, geniş pH aralıklarında aktivite göstermesi, termostabil olması gibi kriterler olduğundan, bu çalışmada tanımlanan Halofilik bakteri enzimlerinin aktivitesini genellikle pH 8-10 aralığında %60-80 arasında koruduğu ancak 50 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda aktivitenin hızla düştüğü belirlenmiştir. Ancak her bir tanımlanan türden elde edilen enzimlerin pH ve sıcaklık kararlılıklarının belirlenmesi uzun zaman ve uğraş aldığından, bu konuda çalışmalarımız devam etmektedir. Üretilen enzimlerin Endüstriyel anlamda kullanılabilirliğinin ortaya çıkarılması enzim saflaştırılması ve ileri analizlerin tamamlanmasıyla mümkün olabilecektir. Ancak tanımlanan türlerin ön enzim üretimi kapasitelerine bakıldığında endüstriyel suş şeklinde kullanılabilecekleri ve elde edilen enzimlerin ekonomik olarak üretilebileceği kanısına varılmıştır.

Bu çalışmada tanımlanan halofilik bakteri enzimlerinin ekonomik yük oluşturmadan, karışık donanım ve teknikler gerektirmeden elde edilebilmesi için, endüstriyel hammaddeler ya da tarımsal atıklar kullanılarak, ucuz yoldan enzim üretiminin de denenmesi faydalı olacaktır. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar benzer alanlarda yapılacak olan diğer araştırmalara özellikle metot ve verilerin değerlendirilmesi aşamalarında katkıda bulunabileceği ve ön kaynak teşkil edebileceği nedeniyle önemlidir.

7. KAYNAKÇA

1. Kumar, S., Rajagopalan, H., Khare, S. Halophiles as a source of polyextremophilic α -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 2016, 2(1): 1-26.
2. Neuberger, A., Van Deenen, L.L.M. The Archaea: their history and significance, in *The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*. Ed.: Kates, M., Kushner, D., Matheson, A.T. Amsterdam, 1993, 7–29.
3. Yanhe, Ma., Erwin, A., Galinski, W., Grant, D., Aharon, O., and Antonio, V. Halophiles Life in Saline Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(21): 6971–6981.
4. Kanekar, S., Dhakephalkar, P. Halophiles – Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications. *Microorganisms in Environmental Management* Springer. Ed.: Satyanarayana T., Narain., J.B. Netherlands, 2012, 1-34.
5. Kates, M. Archaeobacterial lipids structure, biosynthesis and function. *Biochemistry Society Symposia*, 1992, 58: 51–72.
6. DasSarma, P., Coker, J.A., Huse, V., DasSarma, S. Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology. Ed.: Flickinger, M.C. 2010, 2769-2777.
7. Oren, A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*, 2010, 31(8-9): 825-834.
8. Madern, D., Ebel, C., Zaccari, G. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 2000, 4(2): 91–98.
9. Delgado-Garcia, M., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar-Gonzalez, C., Contreras-Esquivel, J., Rodriguez-Herrera, R. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, 92(13): 2575-2580.
10. Cameotra, S.S., Makkar, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 50: 520–529.
11. Prakash, O. Verma, M. Sharma, P. Kumar, M. Kumari, K. Singh, A. Kumari, H. Jit, S. Gupta, S. K. Khanna, M. & Lal, R. Polyphasic approach of bacterial classification an overview of recent advances. *Indian Journal of Microbiology*, 2007, 47: 98–108.
12. Bass-Becking, LGM. Historical notes on salt and salt-manufacture. *Science Moninor*, 1931, 32: 434–446.

13. Baumgartner, J.G. The salt limits and thermal stability of a new species of anaerobic halophile. *Journal Food Science and Technology*, 1937, 2: 321–329.
14. Wilkansky, B. Life in the Dead Sea. *Nature*, 1936, 138: 467.
15. Volcani, B. E. Studies on the microflora of the Dead Sea. The Hebrew University of Jerusalem, Israel, 1940, 84. (Doktora Tezi).
16. Ventosa, A., Arahall, D.R., Volcani, B.E. Studies on the microbiota of the Dead Sea 50 years later. Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments. Ed.: Oren, A. Boca Raton, 1999, 139–147.
17. Oren, A. Population dynamics of halobacteria in the Dead Sea water column. *Limnology Oceanography*, 1983, 28: 1094–1103.
18. Bassam O.A., Halophilic Bacterium A Review of New Studies. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 2015, 12(3): 2061-2069.
19. Demirjian, D.C., Moris-Varas, F., Cassidy, C.S. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion Chemical Biology*, 2001, 5: 144-151.
20. Madern, D., Ebel, C., Zaccari, G. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 2000, 4(2): 91–98.
21. Klivanov, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 2001, 409 (6817): 241-246.
22. Oren, A. Diversity of halophiles. *Extremophiles handbook*. Ed.: Horikoshi, K. Japan, Tokyo, 2011, 309–325.
23. Ludwig, W., Klenk, H. P., Brenner, D. J., Krieg, N.R., Staley, J. R. Overview a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2. Ed.: Garrity, G. New York, 2005, 49–65.
24. Gao, B., Gupta, R.S. Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 2401–2412.
25. DasSarma, S., Fraser, C. M., Read, T., Nelson, K. E. Genome sequence of an extremely halophilic archaeon. *Humana Press*, 2004, 383–399.
26. DasSarma, S., Fraser, C. M., Read, T., Nelson, K. E. Genome sequence of an extremely halophilic archaeon. *Microbial genomes. Humana Press, Totowa*, 2004, 383–399.

27. Yanhe, M., Erwin, A., Galinski, W., Grant, D., Aharon, O., and Antonio, V. H. Life in Saline Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(21): 6971–6981.
28. Slonczewski, J. L., J. A. Coker, and S. DasSarma. Microbial growth under multiple stressors. *Microbe*, 2010, 5: 110–116.
29. Vreeland, R. H., Litchfield C. D., Martin, E. L., and Elliot, E. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1980, 30: 485–495.
30. Torsvik, T., and I. D. Dundas. Bacteriophage of *Halobacterium salinarium*. *Nature*, 1974, 248: 680–681.
31. Roine, E., Kukkaro P., Paulin L., Laurinavicius, S., Domanska, A., Somerharju, P., and Bamford. D. H. New closely related haloarchaeal viral elements with different nucleic acid types. *Journal of Virology*, 2010, 84: 3682–3689.
32. Pagaling, E., Haigh, R. D., Grant, W. D., Cowan, D. A., Jones, B. E., Ma, Y., Ventosa, A., and Heaphy. S. Sequence analysis of an archaeal virus isolated from a hypersaline lake in Inner Mongolia, China. *BMC Genomics*, 2007, 8: 410.
33. Rodriguez-Brito, B., L. L. Li, L. Wegley, M. Furlan, F. Angly, M. Breitbart, J. Buchanan, C. Desnues, E. Dinsdale, R. Edwards, B. Felts, M. Haynes, H. Liu, D. Lipson, J. Mahaffy, A. B. Martin-Cuadrado, A. Belen Martín- Cuadrado, J. Nulton, L. Pasic, S. Rayhawk, J. Rodriguez-Mueller, F. Rodríguez Valera, P. Salamon, S. Srinagesh, T. F. Thingstad, T. Tran, R. V. Thurber, D. Willner, M. Youle, and F. Rohwer. Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments. *The ISME Journal*, 2010, 4: 739–751.
34. Santos, F., P. Yarza, V. Parro, Briones, C., Anton, J. The metavirome of a hypersaline environment. *Environmental. Microbiology*, 2010, 12(11): 2965-76.
35. Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., Plemenitas, A. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological. Research*, 2009, 113: 1231–1241.
36. Vaupotic, T., N. Gunde-Cimerman, and A. Plemenitas. Novel 3' phosphoadenosine-5'-phosphatases from extremely halotolerant *Hortaea werneckii* reveal insight into molecular determinants of salt tolerance of black yeasts. *Fungal Genetics and Biology Journal*, 2007, 44: 1109–1122.
37. Oren, A. Halophilic Microorganisms and their Environments. Dordrecht, 2002, 357–388.

38. Oren, A. The ecology of extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 13: 415–440.
39. Oren, A. Diversity of halophilic microorganisms environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2002, 28, 56–63.
40. Oren, A. Salts and brines Ecology. Ed.: Whitton B.A., Potts, M. Dordrecht, 2000, 281–306.
41. Oren, A. The order Haloanaerobiales. The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria. Ed.: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E. New York, 2001, 804-817.
42. Oren, A. Diversity of halophilic microorganisms environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2002, 28: 65–80.
43. Mongodin, E.F., Nelson, K.E., Daugherty, S., Deboy, R.T., Wister, J., Khouri, H., Weidman, J., Walsh, D.A., Papke, R.T., Sanchez, Perez, G., Sharma, A.K., Nesbø, C.L., MacLeod, D., Bapteste, E., Doolittle, W.F., Charlebois, R.L., Legault, B., Rodriguez-Valera, F. The genome of *Salinibacter ruber*. *National Academy of Sciences of the US of America*, 2006, 18147-18152.
44. Lanyi, J. K. Halorhodopsin a light-driven electrogenic chloridetransport system. *Physiological Reviews*, 1990, 70(2): 319,30.
45. Galinski, E. A., Trüper, H. G. Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*. *FEMS Microbiology Letters*, 1982, 13: 357–360.
46. Kixmuller, D., Greie, J. C. An ATP-driven potassium pump promotes long-term survival of *Halobacterium salinarum* within salt crystals. *Environmental Microbiology*, 2012, 4(2): 234-41.
47. Oren, A., Heldal, M., Norland, S., Galinski, E.A. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*, 2002, 6: 491–498.
48. Mevarech, M., Frolov, F., Gloss, L.M. Halophilic enzymes proteins with a grain of salt. *Biophysical Chemistry*, 2000, 86: 155–164.

49. Saum. S.H., Muller. V. Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus* chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. *Saline Systems*, 2008, 4: 4.
50. Roberts, M.F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 2005, 1: 1–30.
51. Martin, D.D., Ciulla, R.A., Roberts, M.F. Osmoadaptation in archaea. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, 65: 1815–1825.
52. Oren, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline System*, 2008, 4: 1–13.
53. Canovas, D., Vargas, C., Csonka, L.N., Ventosa, A., Nieto, J.J. Osmoprotectants in *Halomonas elongata* high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178: 7221–7226.
54. Saum. S.H., Muller. V. Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus* chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. *Saline Systems*, 2008, 4: 4.
55. Vreeland, R.H. Mechanisms of halotolerance in microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 1987, 14: 311–356.
56. Morishita, H. Control by episome on salt-resistance in bacteria. *Origin of life*, 1978, 431–439.
57. Oren, A. The prokaryotes. Ed.: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E. Berlin, 2006 , 263–282.
58. Zhang, G, Yi, L. Stability of halophilic proteins: from dipeptide attributes to discrimination classifier. *International Journal Biology of Macromolecules*, 2013, 53: 1–6.
59. Bayley, S.T., Morton, R.A., Lanyi, J.K. Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. *Critical Review Microbiology*, 1978, 6: 151–206.
60. DasSarma, S., Capes, M., DasSarma, P. Haloarchaeal megaplasms. Microbial megaplasms. Ed.: Schwartz, E. Berlin. 2009, 3–30.
61. Zhang, G, Ge, H. Protein hypersaline adaptation: insight from amino acids with machine learning algorithms. *Protein Journal*, 2013, 32: 239–245.
62. Mounier, J., Rea, M.C., O'Connor, P.M., Fitzgerald, G.F., Cogan, T.M. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(23): 7732–7739.

63. Paleg, L.G., Aspinall, D. The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Ed.: Borowitzka, L.J. Sydney, 1981, 97–130.
64. Roh, S.W., Bae, J.W. *Halorubrum cibi* sp. Nov., an extremely halophilic archaeon from salt-fermented seafood. *Journal Microbiology*, 2009, 47(2): 162–166.
65. Namwong, S., Hiraga, K., Takada, K., Tsunemi, M., Tanasupawat, S., Oda, K. Halophilic Serine Proteinase from *Halobacillus* sp. SR 5–3 Isolated from Fish Sauce: Purification and Characterization. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2006, 70(6), 1395–1401.
66. Schiraldi, C., Giuliano, M.T., de Rosa, M. Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea*, 2002, 1: 75–86.
67. Sivaprakasam, S., Mahadevan, S., Sekar S., Rajakumar, S. Biological treatment of tannery wastewater by using salt-tolerant bacterial strains. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7: 15–21.
68. Kebbouche-Gana, S., Gana, M. L., Khemili, S., Fazouane-Naimi, F., Bouanane, N. A., Penninckx, M., Hacene, H. Halophiles, Industrial applications. *Journal Indian Microbiology Biotechnology*, 2009, 36(5): 727–738, 1367–5435.
69. Berlendis, S., Cayol, J.L., Verh'ee, F., Laveau, S., Tholozan, J.L., Ollivier, B., Auria, R. First evidence of aerobic biodegradation of BTEX compounds by pure cultures of *Marinobacter*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 2010, 160: 1992–1999.
70. Nicholson, C.A., Fathepure, B.Z. Microorganisms in Environmental Management Microbes and Environmental. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 245: 257–262.
71. Emerson, D., Chauhan, S., Oriel, P., Breznak, J.A. *Haloferax* sp. A halophilic archaeon capable of growth on aromatic-compounds. *Archives of Microbiology*, 1994; 161(6): 445–452.
72. Liebgott, P.P., Labat, M. Casalot, L., Amouric, A., Lorquin, J. Bioconversion of tyrosol into hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid under hypersaline conditions by the new *Halomonas* sp. strain HTB24. *Journal FEMS Microbiology Letters*, 2007, 276(1): 26–33.
73. DasSarma, S., Arora, P. Genetic analysis of the gas vesicle gene cluster in haloarchaea. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 153: 1–10.
74. Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2000, 53(5): 495–508.

75. Ghojavand, H., Vahabzadeh, F., Mehranian, M., Radmehr, M., Shahraki, K., Zolfagharian, F., Emadi, M.A., Roayaei, E. Isolation of thermotolerant, halotolerant, facultative biosurfactant-producing bacteria. *Applied Microbiolgy Biotechnonology*, 2008, 80(6): 1073–1085.
76. Sivaprakasam, S., Mahadevan, S., Seka,r S., Rajakumar, S. Biological treatment of tannery wastewater by using salt tolerant bacterial strains. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7: 15.
77. Birbir, M., Eryilmaz, S., Ogan, A. Prevention of halophilic bacterial damage on brine cured hide with halocins. *Journal of Society of Leather Technologies Chemists*, 2004, 88(3): 99–104.
78. Guo, J., Zhou, J., Wang, D., Tian, C., Wang, P., Uddin M.S. A novel moderately halophilic bacterium for decolorizing azo dye under high salt condition. *Biodegradation*, 2008, 19: 15–9.
79. <http://www.sciencedaily.com/releases/2008/01/08011513-2840.htm>, 2008 (Erişim tarihi: Ekim 2017)
80. Lafferty, R. A., Korsatko, B., Korsatko, W., Rehm. H. J., Reed, G. Microbial production of poly hydroxybutyric acid. *Biotechnology Special microbial Processes*, 1988, 136-176.
81. Han, J., Lu, Q., Zhou, L., Zhou, J., Xiang, H. Molecular Characterization of the phaEC genes required for Biosynthesis of poly in the Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcua marismortui*. *Applied Enviromental Microbiolgy*, 2007, 73: 6058–6065.
82. Rodriguez-Valera, F., Lillo, J.G. Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 103: 181–186.
83. Tokunaga, H., Arakawa, T., Tokunaga, M. Engineering of halophilic enzymes two acidic amino acid residues at the carboxy-terminal region confer halophilic characteristics to *Halomonas* and *Pseudomonas* nucleoside diphosphate kinases. *Protein Science*, 2008, 17: 1603–1610.
84. Kumar, S., Rajagopalan, H., Khare, S. Halophiles as a source of polyextremophilic α -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 2016, 2(1): 1-26.
85. Souza, P. M. D. Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, 2010, 41(4), 850–861.

86. Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., Singh, S. P., & Khare, S. K. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(4): 1595–1603.
87. Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., & Ventosa, A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94(2): 295–300.
88. Dang, H., Zhu, H., Wang, J., Li, T. Extracellular hydrolytic enzyme screening of culturable heterotrophic bacteria from deep-sea sediments of the Southern Okinawa Trough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(1): 71–79.
89. Jayachandra, S. Y., Kumar, A., Merley, D. P., Sulochana, M. B. Isolation and characterization of extreme halophilic bacterium *Salinicoccus* sp. JAS4 producing extracellular hydrolytic enzymes. *Recent Research in Science and Technology*, 2012, 4(4): 46-49.
90. Ilham, M., Nakanomori, S., Kihara, T., Hokamura, A., Matsusaki, H., Tsuge, T., Mizuno, K. Characterization of polyhydroxyalkanoate synthases from *Halomonas* sp. O-1 and *Halomonas elongata* DSM2581 Site-directed mutagenesis and recombinant expression. *Polymer Degradation and Stability*, in press, 2014, 109: 416-423.
91. Enache, M., Kamekura, M. Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Romanian Journal of Biochemistry*, 2010, 47: 47–59.
92. Wejse, P. L., Ingvorsen, K., & Mortensen, K. K. Purification and characterisation of two extremely halotolerant xylanases from a novel halophilic bacterium. *Extremophiles*, 2003, 7(5): 423–431.
93. Govender, L., Naidoo, L., Setati, M. E. Isolation of hydrolase producing bacteria from Sua pan solar salterns and the production of endo-1, 4-bxylanase from a newly isolated haloalkaliphilic *Nesterenkonia* sp. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(20): 5458-5466.
94. Giridhar, P. V., Chandra, T. S. Production of novel halo-alkali-thermo-stable xylanase by a newly isolated moderately halophilic and alkali-tolerant *Gracilibacillus* sp. TSCPVG. *Process Biochemistry*, 2010, 45(10): 1730–1737.
95. Menon, G., Mody, K., Keshri, J., Jha, B. Isolation, purification and characterization of haloalkaline xylanase from a marine *Bacillus pumilus* strain. *Biotechnology Bioengineering*, 2010, 15: 998-1005.

96. Prakash, B., Vidyasagar, M., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. Purification and some properties of low-molecular-weight extreme halophilic xylanase from *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2012, 74(3): 192–198.
97. Khandeparker, R., Verma, P., & Deobagkar, D. A novel halotolerant xylanase from marine isolate *Bacillus subtilis* cho40: gene cloning and sequencing. *New biotechnology*, 2011, 28(6): 814–821.
98. Hung, K. S., Liu, S. M., Tzou, W. S., Lin, F. P., Pan, C. L., Fang, T. Y., Tang, S. J. Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. *Process Biochemistry*, 2011, 46(6): 1257–1263.
99. Wang, C. Y., Hsieh, Y. R., Ng, C. C., Chan, H., Lin, H. T., Tzeng, W. S., & Shyu, Y. T. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 44(6): 373–379.
100. Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K., & Jha, B. An alkalihalotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83(2): 891–897.
101. Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K., & Jha, B. Solvent tolerant marine bacterium *Bacillus aquimaris* secreting organic solvent stable alkaline cellulase. *Chemosphere*, 2011, 83(5): 706–712.
102. Zing, H.W., Park, K.H., & Choi, T.J. Purification and characterization of a carboxymethyl cellulase from *Artemia salina*. *Biochemistry Biophysics Research Communications*, 2014, 443(1): 194–9.
103. Bonete, M. J., Perez-Pomares, F., Díaz, S., Ferrer, J., & Oren, A.. Occurrence of two different glutamate dehydrogenase activities in the halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS microbiology letters*, 2003, 226(1): 181–186.
104. Gadda, G., McAllister-Wilkins, E. E. Cloning, expression, and purification of choline dehydrogenase from the moderate halophile *Halomonas elongata*. *Applied and environmental microbiology*, 2003, 69(4): 2126–2132.
105. Ishibashi, M., Oda, K., Arakawa, T., & Tokunaga, M. Cloning, expression, purification and activation by Na ion of halophilic alkaline phosphatase from moderate halophile *Halomonas* sp. 593. *Protein expression and purification*, 2011, 76(1): 97–102.

106. Tokunaga, H., Ishibashi, M., Arakawa, T., & Tokunaga, M. Highly efficient renaturation of β -lactamase isolated from moderately halophilic bacteria. *FEBS letters*, 2004, 558(1): 7–12.
107. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 2003, 38(11), 1599–1616.
108. Couto, S. R., Sonroman, M, A. Application of solid-state fermentation to food industry — a review. *Journal of Food Engineering*, 2006, 76(3), 291–302.
109. Saravanan, D., Arul Prakash, A., Jagadeeshwaran, D., Nalankilli, G., Ramachandran, T., & Prabakaran, C. Optimization of thermophile *Bacillus licheniformis* α -amylase desizing of cotton fabrics. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 2011, 36(3), 253.
110. Karan, R., Kumar, S., Sinha, R., & Khare, S. K. Halophilic Microorganisms as Sources of Novel Enzymes. In *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Ed.: Satyanarayana, T., Johri, B., Prakash, A. Netherlands, 2012, 555– 579.
111. Good, W. A., Hartman, P. A. Properties of the amylase from *Halobacterium halobium*. *Journal Bacteriology*, 1970, 104, 601–603.
112. Deutch, C. E. Characterization of a salt-tolerant extracellular α -amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Letters in applied microbiology*, 2002. 35(1), 78–84.
113. Mijts, B. N., & Patel, B. K. Cloning, sequencing and expression of an α -amylase gene, amyA, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology*, 2002, 148(8), 2343–2349.
114. Wei, Y., Wang, X., Liang, J., Li, X., Du, L., & Huang, R. Identification of a halophilic α - amylase gene from *Escherichia coli* JM109 and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology letters*, 2013, 35(7), 1061–1065.
115. Tan, T. C., Mijts, B. N., Swaminathan, K., Patel, B. K., & Divne, C. Crystal Structure of the Polyextremophilic α -Amylase AmyB from *Halothermothrix orenii* Details of a Productive Enzyme–Substrate Complex and an NDomain with a Role in Binding Raw Starch. *Journal of molecular biology*, 2008, 378(4): 852–870.
116. Karan, R., Khare, S. K. Purification and characterization of a solvent-stable protease from *Geomicrobium* sp. EMB2. *Environmental technology*, 2010, 31(10): 1061–1072.

117. Van, Q. D., Simidu, U., Taga, N. Purification and some properties of halophilic protease produced by a moderately halophilic marine *Pseudomonas* sp. *Canadian Journal of Microbiology*, 1981, 27(5): 505–510.
118. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 1998, 62(3): 597–635.
119. Kwon, Y. T., Kim, J. O., Moon, S. Y., Yoo, Y. D., & Rho, H. M. Cloning and characterization of the gene encoding an extracellular alkaline serine protease from *Vibrio metschnikovii* strain RH530. *Gene*, 1995, 152(1): 59–63.
120. Salameh, M., & Wiegel, J. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. *Advances in Applied Microbiology*, 2007, 61: 253–283.
121. Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately. *Food Science and Technology*, 2011, 31(3): 603–613.
122. Verma, N., Thakur, S., & Bhatt, A. K. Microbial Lipases Industrial Applications and Properties. *International Research Journal Biology Science*, 2012, 1(8): 88–92.
123. Fan, X., Niehus, X., Sandoval, G. Lipases as biocatalyst for biodiesel production. *Methods Molecules Biology*, 2012, 861: 471–483.
124. Schreck, S. D., & Grunden, A. M. Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. *Applied microbiology and biotechnology*, 2014, 98: 1001–1021.
125. Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., & Ventosa, A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94(2): 295–300.
126. Vargas, C., & Nieto, J. J. Genetic tools for the manipulation of moderately halophilic bacteria of the family *Halomonadaceae*. *Recombinant Gene Expression*, 2004, 267: 183–208.
127. Amoozegar, M. A., Salehghamari, E., Khajeh, K., Kabiri, N., Naddaf, S. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. *Journal of basic microbiology*, 2008. 48(3): 160–167.
128. Su, J. H., Chang, M. C., Lee, Y. S., Tseng, I. C., & Chuang, Y. C. Cloning and characterization of the lipase and lipase activator protein from *Vibrio vulnificus* CKM-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Gene Structure and Expression*, 2004, 1678(1): 7–13.

129. Perez, D., Martin, S., Fernandez-Lorente, G., Filice, M., Guisan, J. M., Ventosa, A., Mellado, E. A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). *PloS one*, 2011, 6-8.
130. Sana, B., Ghosh, D., Saha, M., & Mukherjee, J. Purification and characterization of an extremely dimethylsulfoxide tolerant esterase from a salt-tolerant *Bacillus* species isolated from the marine environment of the Sundarbans. *Process Biochemistry*, 2007, 42(12): 1571–1578.
131. Roberts, M.F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 2005, 1: 1–30.
132. Racker, E., Stoeckenius, W. *Biology Chemistry*, 1974, 249: 662–663.
133. Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Y., Kiselev, A.V., Lobanov, N.A. *FEBS Letters*, 1979, 100: 219–224.
134. Konig, H., Rehm, H. J., Reed, G. *Biotechnology*. Ed.: Dellweg, D. Basel, 1988, 699–728.
135. Nicolini, C. Erokhin, V., Paddeu, S., Sartore, M. Towards light-addressable transducer bacteriorhodopsin based. *Nanotechnology*, 1998, 9: 223–227.
136. Hampp, N., Popp, A., Miller, A., Brauchle, C., Oesterhelt, D. *U.S. Patent Research*, 1992, 5: 374-492.
137. Peale, R.E., Ruffin, A.B., Donahue, J.E. Halophiles, Industrial Applications. *Applied Optics*, 1997, 36: 4446–4450.
138. Hong, F. T. The bacteriorhodopsin model membrane system as a prototype molecular computing element. *Biosystems*, 1986, 19: 223–236.
139. Costa, M.S., Santos, H., Galinski, E.A. *Advance in Biochemical Engineering Biotechnology*, 1998, 61: 117–153.
140. Montitsche, L., Driller, H., Galinski, E. Ectoine and ectoine derivatives as moisturizers in cosmetics. *U.S. Patent Resarch*, 2000, 5: 9.
141. Guzm'an, H., Van-Thuoc, D., Mart'in, J., Hatti-Kaul, R., Quillagum'an. A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Journal Applied Microbiolgy Biotechnolgy*, 2009, 84: 1069-1077.
142. Ben-Amotz, A., Kay, Z.A., Avron, M. Accumulation of carotene in halotolerant algae, purification and characterization of carotene rich globules from *Dunaliella bardawil*. *Journal of Phycology*, 1982, 18: 529–537.

143. O'Connor, E.M., Shand, R.F. Halocins and sulfolobocins, The emergins story of arheal protein and peptide antibiotics. *Journal Indian Microbiolgy Biotechnology*, 2002, 28: 23–3.
144. Haseltine, C., Hill, T., Montalvo-Rodriguez, R., Kemper, S., Shand, R., Blum, P. Secreted Euryarchaeal Microhalocins Kill Hyperthermophilic Crenarchaea. *Journal Bacteriology*, 2001, 183: 287–291.
145. Lequerica, J. L., O'Connor, J. E., Such, L., Alberola, A., Meseguer, I., Dolz, M., Torreblanca, M., Moya, A., Colom, F., Soria, B., A halocin acting on Na/H exchanger of haloarchaea as a new type of inhibitor in NHE of mammals. *Journal Physiology Biochemistry*, 2006, 62(4): 253–262.
146. Tamer, A. Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., & Oğultekin, R. Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu.1989, 55.
147. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, 1959, 31: 426–8.
148. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35: 1547-1549.
149. Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing in nucleic acid techniques in bacterial systematics. Ed.: Stackebrandt, E., Goodfellow, M., Wiley, J., Chichester, S. 1991, 115-148.
150. Yanmis, D. and Adiguzel, A. Molecular typing of thermophilic bacilli isolated from different hot springs of Turkey. *Research Journal of Biotechnology*, 2014, 9: 83–88.
151. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35: 1547-1549.
152. Soykan, A. Ayvalık ile Ören (Burhaniye) Arasının Kıyı Morfolojisi. *Türk Coğrafya Dergisi*, İstanbul, 1997, 32: 99-120.
153. Saitou, N. Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 406-425.
154. Imhoff, F.J. Volume I Halophilic bacteria. Ed.: Rodriguez-Valera, F. Boca Raton, 1988, 85-108.
155. Ventosa, A., Mellado, E., Sanchez-Porro, C., Marquez, M. Halophilic and Halotolerant Microorganism from Soils. *Microbiology of Extreme Soils*, 2008, 87-115.

156. Danson, M.J., Hough, D.W. The structural basis of protein halophilicity. *Comparative Biochemistry Physiology*, 1997, 117: 307-312 s.
157. Gibbons, E. Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria. New York, 1969, 169-183.
158. Johnson, A.M., Thurlow, L.R., Zwenger, R. S., Gillock, E.T. Partial Characterization of Two Moderately Halophilic Bacteria from Kansas Salt Marsh. *The Prairie Naturalist*, 2007, 29-39.
159. Bajpai, B., Chaudhary, M., Saxena, J. Production and Characterization of α -amylase from an Extremely Halophilic Archaeon, *Haloferax* sp. HA10. *Food Technology and Biotechnology*, 2015, 53(1):11-17.
160. Fitriani, S., Güven, K. Isolation, Screening partial purification and characterization of protease from halophilic bacteria isolated from Indonesian fermented food. *Anadolu University Journal of Science and Technology*, 2018, 7(2): 130-142.
161. Vijay, A., Hemapriya, S., Joseph, S., and Shegal, K. Production and optimization of Haloalkaliphilic protease by an extremophile- *Halobacterium* Sp. Js1 Isolated from Thalassohaline Environment. *Global Journal of Biotechnology Biochemistry*, 2010, 1 : 44-46.
162. Benazir, J. F., Suganthi, R., Hari, A., Kumar, R., Aswathi, V., Niraimathi, G., Mala, M. K., Sukanya, S., and Santhi, R. Bio utilization of agroindustrial waste in solid state fermentation by *Aspergillus niger* for the production of protease. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, 2011, 4 : 422-435.
163. Dodia, M. S., Joshi, R.H., Patel, R.K., and Singh, S.P. Characterization and stability of extracellular alkaline protease from halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from saline habitat of costal Gujarat, India. *Brazilian Journal Microbiolgy*, 2006, 37: 276-282.
164. Selvarajan, R., Sibanda, T., Tekere, M., Nyoni, H., Taylor, M.S. Diversity Analysis and Bioresource Chracterization of Halophilic Bacteria Isolated from a South African Saltpan. *Molecules*, 2017, 22(4): 657.
165. Bolobova, A.V., Simankova, M.C., Markovic, N.A. Cellulase complex of a new halophilic bacterium *Halocella cellulolytica*. *Microbiolgy*, 61: 557-562.
166. Dimitry, Y.S., Stepan, V. T., Tatyana, V.K., Ilya, V.K. Halo (natrano) archaea isolated from hypersaline lakes utilize cellulose and chitin as growth substrates. *Frontiers in Microbiolgy*, 2015, 6: 942.

167. Kouker, G., Jaeger, K. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied Environmental Microbiology*, 1987, 53: 211–213.
168. Prim, N., Blanco, A., Martinez, J., Pastor, F. I. J. and Diaz, P. estA a gene coding for a cell bound esterase from *Paenibacillus* sp. BP-23 is a new member of the bacterial subclass of type B carboxylesterases. *Research Microbiology*, 2000, 151: 303-312.
169. Waino, M., and Ingvorsen, K. Production of b-xylanase and b-xylosidase bt the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles*, 2003, 7: 87-93.
170. Porro, C.S., Martin, S., Mellado, E., Ventosa, A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94: 295-300.
171. Collins, T., Gerday, C., Feller, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 1-21.
172. Wejse, P. L., Ingvorsen, K., & Mortensen, K. K. Purification and characterisation of two extremely halotolerant xylanases from a novel halophilic bacterium. *Extremophiles*, 2003, 7(5): 423–431.
173. Mushtaq, T., Maryam, H. Screening and Characterization of Halophilic Bacteria with Industrial Enzymes from Salt Lake Razazah, Karbala, Iraq. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 2017, 14(2): 531-539.
174. <http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/swxxx/Bioinformatics%20Sequence%20and%20Genome%20Analysis.pdf> (Erişim tarihi: Aralık 2018).
175. Mata, J.A., Martinez, J., Quesada, E., Bejar, V. A Detailed Phenotypic Characterisation of the Type Strains of *Halomonas* Species. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25: 360-375.
176. Zununi, V., Salar, H., Klenk, H., Hejazi, M. Isolation and Characterization of Halophilic Bateria from Urmia Lake in Iran. *Article in Mikrobiologiia*, 2011, 80: 834-841.
177. Amoozegar, M.A., Malekzadeh, F., Malik, K.A., Schumann, P., Spröer, C. *Halobacillus karajensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53: 1059-1063.
178. Romano, I., Finore, I., Nicolaus, G., Huertas, J., Lama, L., Nicolaus, B., Poli, A. *Halobacillus alkaliphilus* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a salt lake in Fuente de Piedra, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58: 886-890.

179. Kharroub, K., Aguilera, M., Quesada, T., Morillo, A., Cormenzana R., Boulharouf, A., Sanchez, M. *Salicola salis* sp. nov., extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 2647-2652.
180. Yaşı, İ., Kahraman, Ö., Tekin, E., Koçyiğit, A. Çamaltı Tuzlasından Ekstrem Halofilik Archaea İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 2008, 25(2): 117-121.
181. Birbir, M., Sesal, C. Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey. *Turkish Journal of Biology*. 2003, 27: 7-22.
182. Erdoğan, F.S., Mutlu, B., Korcan, E.S., Güven, K., Konuk, M. Aromatic Hydrocarbon Degradation by Halophilic Archaea Isolated from Çamaltı Saltern Turkey. *Water Air Soil Pollution*, 2013, 224: 1449.
183. Elevi, R., Assa, P., Birbir, M., Ogan, A., Oren, A. Characterization of extremely halophilic Archaea isolated from the Ayvalık Saltern Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20: 719-725.
184. Özcan, B., Cokmus, C., Coleri, A., Caliskan, M. Characterization of Extremely Halophilic Archaea Isolated from Saline Environment in Different Parts of Turkey. *Russian in Mikrobiologiya*, 2006, 75(6): 739-746.
185. Demirci, A., Mutlu, B. M., Güven, A., Korcan, E., Güven, K. Decolorization of Textile Azo-Metal Complex Dyes by a Halophilic Bacterium Isolated from Çamaltı Saltern in Turkey. *Clean-Soil, Air, Water*, 2011, 39(2): 177-184.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mevlüt Mert YILMAZ
Doğum Yeri ve Yılı : Van, 1992
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : mmertyilmaz@gmail.com
Eğitim Durumu : Şemikler Anadolu Lisesi
Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2015

