

**FARKLI KAYNAK TUZLALARINDAKİ
PROKARYOTİK ÇEŞİTLİLİĞİN
BELİRLENMESİ**

Seval ÇINAR

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak-2013

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1109 F 153**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Seval Çınar'ın “**Farklı Kaynak Tuzlalarındaki Prokaryotik Çeşitliliğin Belirlenmesi**” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 14.12.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Doç. Dr. MEHMET BURÇİN MUTLU	
Üye	: Prof. Dr. KIYMET GÜVEN	
Üye	: Doç. Dr. AHMET ÇABUK	
Üye	: Yard. Doç. Dr. İSMAİL POYRAZ	
Üye	: Yard. Doç. Dr. GÖKALP İŞCAN	

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI KAYNAK TUZLALARINDAKİ PROKARYOTİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Seval ÇINAR

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

2013, 110 Sayfa

Bu çalışmada kültür-bağımlı ve moleküler teknikler kullanılarak Türkiye'deki 7 farklı kaynak tuzlasının prokaryotik çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Nisan 2011- Haziran 2012 tarihleri arasında seçilen tuzlaların hem kaynak hem de havuz kısımlarından iki kez örnekleme yapılmıştır. Kültür-bağımlı çalışmalarda farklı besiyerleri kullanılıp gelişen kolonilerden 397 tane izolat seçilerek 16S rRNA geni amplifiye edilmiş, restriksiyon rDNA analizi (ARDRA) metodu ile analiz edilip 44 farklı profil belirlenmiştir. Profilleri belirlenen 44 izolattan 28 tanesi seçilerek bu izolatların 16S rRNA geninin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir ve bunların *Archaea* domaininden *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum* ve *Halobacterium*; *Bacteria* domaininden *Halomonas*, *Salinibacter*, *Rhodovibrio*, *Salinivibrio*, *Salicola*, *Idiomarina*, *Marinobacter*, *Chromohalobacter* genusuna ait oldukları belirlenmiştir.

Floresan in situ hibridizasyonu (FISH) yönteminde evrensel probler ve DAPI boyası kullanılarak kaynak örneklerinde mikroorganizma yoğunluğunun düşük; havuz örneklerinde ise oldukça yoğun ve kare şekilli *Archaea* örneklerinin birçok tuzlada baskın olduğu gözlenmiştir. DGGE yöntemi ile *Archaea* jelinin analiz sonucu *Halorubrum* sp., *Haloquadratum walsbyi* ve *Halonotius pteroides*'in varlığı ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Kaynak Tuzlaları, Halofilik *Archaea/Bacteria*, DGGE, FISH

ABSTRACT**Master of Science Thesis****DETERMINATION OF THE PROKARYOTIC DIVERSITY IN
DIFFERENT SPRING SALTURNS****Seval ÇINAR****Anadolu University****Graduate School of Sciences****Biology Programme****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU****2013, 110 Pages**

In this study, prokaryotic diversity of the 7 different spring salterns in Turkey was investigated by using cultivation-based methods and molecular techniques.

Sampling was carried out both springs and crystallization ponds of the salterns twice between April 2011- June 2012. Microorganisms were cultivated on different media. 397 isolates were chosen and analyzed by using 16S rDNA gene sequences and ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) method and 44 different ARDRA profiles were determined. 28 isolates of them were selected and 16S rDNA genes of these isolates were sequenced for the identification. Isolates were identified as *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum* and *Halobacterium* in Archaea domain; *Halomonas*, *Salinibacter*, *Rhodovibrio*, *Salinivibrio*, *Salicola*, *Idiomarina*, *Marinobacter*, *Chromohalobacter* in Bacteria Domain.

Fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis by using universal probes and DAPI staining revealed that microbial population was very low in saline springs while microbial populations in the ponds dominated by square Archaea were very dense. *Halorubrum* sp., *Haloquadratum walsbyi* and *Halonotius pteroides* species were detected according to DGGE analysis of Archaea.

Keywords: Spring Salterns, Halophilic Archaea/Bacteria, DGGE, FISH

TEŞEKKÜR:

Kendisinden çok şey öğrendiğim, bilgisi ve çalışma disiplini ile örnek aldığım değerli hocam Mehmet Burçin MUTLU'ya bu çalışma esnasında gösterdiği anlayış ve verdiği destek için teşekkür ederim.

Çalışma arkadaşlarım Miyesser AYCAN, Ece ALBAYRAK ve Nilgün KAVAK'a, değerli hocam Rasime DEMİREL'e, ayrıca çalışma ortamını paylaştığım arkadaşlarıma tüm yardımları için teşekkür ederim.

Seval ÇINAR

Ocak 2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Hipersalin habitatlar.....	1
1.1.1. Kaynak Tuzlaları.....	2
1.1.2. Göl Tuzlaları.....	8
1.1.3. Deniz Tuzlaları.....	9
1.1.4. Kaya Tuzlaları.....	9
1.2. Halofilik Mikroorganizmalar.....	10
1.2.1. Halofilik Mikroorganizmaların Taksonomisi.....	11
1.2.2. Halofilik Mikroorganizmaların Fizyolojisi.....	25
1.2.3. Hücre Şekli ve Hücre Duvar Yapısı.....	27
1.2.4. Haloarkelerin Genomları.....	27
1.3. Halofilik Mikroorganizmalar ile İlgili Uygulamalar.....	28
1.3.1. Bakteriyorodopsin proteini ve biyoteknolojik kullanımı	28

1.3.2. Biyopolimer Üretimi.....	29
1.4. Mikrobiyal Kommünite Analizleri.....	30
1.4.1. Amplifiye edilmiş rDNA restriksiyon analizi(ARDRA)	30
1.4.2. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE).....	31
1.4.3. Floresan in situ Hibridizasyon(FISH).....	32
2. MATERYAL VE YÖNTEM	33
2.1. Materyal.....	33
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler.....	33
2.1.1.1. 30% (w/v) Konsantre Tuzlu Su Stok Solusyonu.....	33
2.1.1.2. %25 Deniz Suyu (SW).....	33
2.1.1.3. TAE 50X (Litre).....	34
2.1.1.4. TBE 5X.....	34
2.1.1.5. PBS 10X.....	34
2.1.1.6. Lizozim Solüsyonu (10 mg/ml).....	34
2.1.1.7. %80'lik DGGE Stok Solusyonu.....	35
2.1.1.8. %0'lık DGGE Stok Solusyonu.....	35
2.1.1.9. %10 Amonyum persülfat Solusyonu.....	35
2.1.1.10. %10 SDS Solusyonu.....	35
2.1.1.11. In situ hibridizasyon Tamponu.....	35
2.1.1.12. FISH için Yıkama Tamponu.....	36
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	36
2.1.2.1. %12 MGM (Modifiye Geliştirme Medium).....	36

2.1.2.2. %18 MGM (Modifiye Geliştirme Medium).....	36
2.1.2.3. %23 MGM (Modifiye Geliştirme Medium).....	36
2.1.2.4. Medyum E.....	37
2.1.2.5. %25 Seawater Medyum.....	37
2.1.2.6. Medyum DBCM2 (<i>Haloquadratum walsbyi</i> için besiyeri).....	37
2.1.2.7. Medyum DSMZ (<i>Salinibacter ruber</i> için besiyeri).....	39
2.1.2.8. Medyum D.....	39
2.2. Yöntem.....	40
2.2.1. Çalışma Alanları.....	40
2.2.2. Örneklerin Toplam Tuzluluk, İyonik Kompozisyon ve pH Değerlerinin Belirlenmesi.....	41
2.2.3. Kültür Bağımlı Testler.....	41
2.2.3.1. Su Örneklerinden Archaea ve Bacteria İzolasyonu ve Kültüre Alınmaları.....	41
2.2.3.2. İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu Tuz Miktarının Belirlenmesi.....	41
2.2.3.3. İzolatların Nükleik Asit Analizine Dayalı Testler.....	41
2.2.4. Moleküler Teknikler.....	46
2.2.4.1. Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu.....	46
2.2.4.2. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE).....	47
2.2.4.3. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH).....	49

3. BULGULAR	51
3.1. Çalışma Alanları	51
3.2. Örneklerin Toplam Tuzluluk, İyonik Kompozisyon ve pH	
Değerlerinin Belirlenmesi.....	51
3.3. Kültür Bağımlı Testler.....	53
3.3.1. Su Örneklerinden Archaea ve Bacteria İzolasyonu ve Kültüre	
Alınmaları.....	53
3.3.2. İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu Tuz	
Miktarının Belirlenmesi.....	53
3.3.3. İzolatların Nükleik Asit Analizine Dayalı Testler.....	56
3.4. Moleküler Teknikler.....	73
3.4.1. Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu.....	73
3.4.2. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE).....	73
3.4.2.1. Birinci Örneklem (2011).....	73
3.4.2.2. İkinci Örneklem (2012).....	77
3.4.3. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH).....	81
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	86
KAYNAKLAR.....	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Sivas ili yeraltı kaynakları dağılım haritası.....	4
1.2. Sivas Bingöl Tuzlası (2012).....	5
1.3. Çorum İli yeraltı kaynakları dağılım haritası.....	7
1.4. Türkiye’deki tuzlalarının haritada gösterimi.....	10
1.5. Küçük alt ünite rRNA gen dizisine dayanarak oluşturulan evrensel filogenetik ağaç ve halofilik mikroorganizmaların ağaçtaki dağılımı.....	13
1.6. Halofilik mikroorganizmaların aşırı üremesi sonucu havuzlarda oluşan kırmızı renk, (Sivas Fadlum Tepeönü Tuzlası,2010).....	14
2.1. Örnekleme Bölgeleri.....	40
2.2. Kırıkkale, Delice Tuzlası (solda) ve Sivas Tuzlagözü Tuzlası (sağda)’ından bir görünüm.....	40
3.1. İnkübasyon sonrası farklı örnekler için petri fotoğrafları.....	53
3.2. Farklı Archaea izolatlarının agarlı besiyeri üzerindeki görünüşleri (DA1 kodlu izolat) ve (ZA4 kodlu izolat).....	56
3.3. Farklı Bacteria izolatlarının agarlı besiyeri üzerindeki görünüşleri (KB2 kodlu izolat) ve (DB5 kodlu izolat).....	56
3.4. 16S rRNA geni PCR ürünleri temsili bir jel görüntüsü	57
3.5. <i>Hinf</i> I enzimi ile kesimi yapılmış Bacteria örneklerine ait temsili bir jel Görüntüsü.....	58
3.6. <i>Hinf</i> I enzimi ile kesimi yapılmış Archaea örneklerine ait temsili bir jel görüntüsü.....	58
3.7. <i>Mbo</i> I enzimi ile kesimi yapılmış Bacteria ve Archaea örneklerine ait temsili bir jel görüntüsü (Marker; 1kb Plus DNA Ladder, Fisher BioReagents).....	58
3.8. DNA ekstraksiyonu sonrası temsili bir jel görüntüsü (TrackIt 1 Kb DNA Ladder ,Invitrogen).....	72
3.9. DGGE-PCR ürünlerinin temsili bir agaroz jel görüntüsü(TrackIt 1 Kb DNA Ladder ,Invitrogen).....	73
3.10. DGGE-PCR ürünlerinin miktarını belirleme amaçlı temsili bir agaroz jel görüntüsü (Marker;Low Mass DNA Ladder, Invitrogen)	74
3.11. 2011 örneklerine ait DGGE Archaea jelinin görüntüsü.....	74

3.12. 2011 örneklerine ait DGGE Bacteria jelinin görüntüsü.....	76
3.13. 2011-2012 örneklerine ait DGGE Archaea jelinin görüntüsü	78
3.14. Archaea örneklerinin Re-PCR ürünlerinin jel görüntüsü (marker, TrackIt1Kb DNA Ladder).....	79
3.15. 2012 örneklerine ait DGGE Bacteria jelinin görüntüsü.....	80
3.16. Bacteria örneklerinin Re-PCR ürünlerinin jel görüntüsü (Marker; 1kb Plus DNA Ladder, Fisher BioReagents).....	81
3.17. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Arc915 Probu ile boyanan Archaea hücreleri (Çorum Sungurlu).....	81
3.18. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Eub338 Probu ile boyanan Bacteria hücreleri(Çorum Sungurlu).....	82
3.19. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Eub338 Probu ile boyanan Bacteria hücreleri(Erzincan Kemah Havuz).....	82
3.20. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Arc915 Probu ile boyanan Archaea hücreleri (Sivas Zara Tuzlagözü 1. Örnekleme).....	83
3.21. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Eub338 Probu ile boyanan Bacteria hücreleri (Sivas Zara Tuzlagözü 1. Örnekleme).....	83
3.22. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Arc915 Probu ile boyanan Archaea hücreleri (Sivas Zara Tuzlagözü Havuz 2. Örnekleme).....	84
3.23. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Eub338 Probu ile boyanan Bacteria hücreleri (Sivas Zara Tuzlagözü Havuz 2. Örnekleme).....	84
3.24. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Arc915 Probu ile boyanan Archaea hücreleri (Çorum Akçakoyunlu).....	85
3.25. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Eub338 Probu ile boyanan Bacteria hücreleri (Çorum Akçakoyunlu).....	85
4.1. Tanımlanan <i>Bacteria</i> izolatları ve sayıları.....	93

4.2. Tanımlanan <i>Archaea</i> izolatları ve sayıları.....	94
--	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Sivas ili özel tuzlalarda üretilen tuz miktarı, 2001.....	4
1.2. Türkiye Kaya Tuzu Rezervleri.....	10
1.3. Halobacteriaceae familyasındaki cins ve türler.....	15
2.1. 16S rRNA genlerinin amplifikasyonları için kullanılan PCR koşulları.....	42
2.2. Dizi Analizi için PCR Koşulları	44
2.3. 16S rRNA gen amplifikasyonunda kullanılan primerler.....	45
2.4. Bacteria grubu için DGGE-PCR koşulları.....	47
2.5. Archaea grubu için DGGE-PCR koşulları.....	47
2.6. Çalışmada Kullanılan FISH Probları.....	50
3.1. Örneklerin Ölçülen Toplam Tuzluluk ve pH Değerleri.....	51
3.2. Örneklerin İyonik Kompozisyonları.....	52
3.3. Bacteria'ya Ait Temsilci İzolatların Gelişim Gösterdiği Tuz Konsantrasyonu Aralıkları.....	54
3.4. Archaea'ya Ait Temsilci İzolatların Gelişim Gösterdiği Tuz Konsantrasyonu Aralıklar.....	55
3.5. Bacteria ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip Bacteria İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (<i>Hinf</i> I Enzimi ile Kesim Görüntüsü).....	59
3.6. Archaea ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip Archaea İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (<i>Hinf</i> I Enzimi ile Kesim Görüntüsü).....	68
3.7. Analizi yapılan Archaea izolatlarının gen bankasındaki en yakın temsilcileri, benzerlik oranları ve izolat sayısı.....	71
3.8. Analizi yapılan Bacteria izolatlarının gen bankasındaki en yakın temsilcileri, benzerlik oranları.....	71
3.9. Low Mass DNA Ladder marker bantlarının büyüklükleri ve hacme göre içerdiği DNA miktarları.....	73
3.10. Elde edilen Archaea DGGE bandları ve bunların gen bankasındaki en yakın karşılıkları(Birinci Örnekleme-2011).....	75

3.11. Elde edilen Archaea DGGE bandları ve bunların gen bankasındaki en yakın karşılıkları.....	79
4.1. Maras Tuzlalarının İyonik Kompozisyonu ve pH'sı (Maturrano ve ark. 2006(a)).....	87
4.2. Farklı <i>Bacteria</i> izolatlarının bölgelere göre dağılımı ve elde edilen izolat sayılarının grafiksel gösterimi.....	92
4.3. Farklı <i>Archaea</i> izolatlarının bölgelere göre dağılımı ve elde edilen izolat sayılarının grafiksel gösterimi.....	93

KISALTMALAR DİZİNİ

DNA: Deoksiribonükleik Asit

RNA: Ribonükleik Asit

mRNA: Haberci RNA

tRNA:Tranfer edici RNA

GC: Guanin Sitozin bazları

µl: Mikrolitre

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

dNTP: Deoksiribonükleotid trifosfat

MGM: Modifiye büyüme besiyeri (Modified growth medium)

rRNA: Ribozomal ribonükleik asit

ARDRA: Amplifiye edilmiş rDNA restriksiyon analizi

dH₂O: Distile su

ml: Mililitre

L: Litre

DGGE: Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi

FISH: Floresan in situ Hibridizasyon

SW: Seawater-Denizsuyu

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

APS: Amonyum persülfat

PBS: Phosphate-Buffered Saline

TBE: Tris Borik asit EDTA

TAE: Tris Asetik asit EDTA

RNase: Ribonükleaz

NaCl: Sodyum Klorid

M: Molar

CTAB: Cetil Trimetil Ammonyum Bromid

DEPC: Dietilpirokarbonat

1.GİRİŞ

1.1.Hipersalin Habitatlar

Aşırı tuzlu habitatlar dünya üzerinde oldukça yaygın bulunmaktadır. Çoğu dünyanın sıcak ve kuru bölgelerinde bulunmakla birlikte hipersalin ortamlar pek çok değişik alanda yayılım göstermektedir; Antarktik hipersalin göller gibi soğuk ortamlar, derin deniz brine ortamları gibi yüksek basınç ve düşük oksijene sahip ortamlar, hidrotermal bacaların bulunduğu aşırı sıcak ortamlar, petrol içeren ortamlar, hipersalin lagünler, topraklar ve kaynak suları bunlara örnek verilebilir (Madigan ve Martinko, 2010; Oren, 2003).

Tuz göllerinin iyonik kompozisyonu oldukça farklılık gösterebilmektedir. Aşırı tuzlu bir göldeki baskın iyonların çeşitliliği, gölün bulunduğu ortamın genel iklimsel koşullarına, topoğrafyasına ve jeolojisine bağlıdır (Madigan ve Martinko, 2010).

Hipersalin ortamlar ikiye ayrılabilir:

Thalassohaline ortamlar: Deniz suyundan orjinlenirler. İyonik kompozisyonları deniz suyununkine benzer; sodyum dominant katyon, klor ve ardından sülfat dominant anyonlardır. pH'sı nötre yakın ya da biraz alkalidir (Falb, 2005).

Athalassohaline ortamlar: İçeriği kendisini çevreleyen topoğrafya, jeoloji, iklimsel şartların içeriğini yansıtan ortamlardır (Ventosa, 2006). Bazı athalassohaline sular divalent katyonları (magnezyum gibi) yüksek oranda içerebilir, bazıları ise karbonat varlığı sonucu magnezyum ve kalsiyumdan yoksun olabilir. Örneğin Magadi Gölü (Kenya/Afrika) gibi soda göllerinin çevredeki kayaların yüksek karbonat içeriğinden dolayı pH'sı oldukça yüksektir ve çözülmüş Mg^{2+} , Ca^{2+} oranı oldukça düşüktür. Soda gölleri yüksek Na_2CO_3 ve düşük Mg^{2+} , Ca^{2+} oranları ile karakterize edilir (Falb, 2005).

Tuzlalar, güneş ışınlarından faydalanarak deniz suyunun buharlaştırılıp, tuz üretmek amacıyla kurulmuş, birbirine bağlı veya bağlı olmayan, değişik boyutlardaki havuzlardan oluşmuş bir sistemdir. % 3,5 - % 300 tuzluluğa kadar olan bu havuzlar, kendilerine özgü canlı topluluklarını içerirler (Pavlova ve ark., 1998; Korovessis ve Lekkas, 2002; Kuru, 2004). Türkiye tuz yatakları bakımından oldukça zengindir. Tuz üretilen kaynaklara tuzla denir. Bu kaynaklar

deniz tuzu, göl tuzu, kaya tuzu ve kaynak tuzu olmak üzere dörde ayrılır (<http://www.turkiyetuz.com /kaynak/kaynak.asp>, 2012).

1.1.1.Kaynak tuzlaları

Karalarda kaya tuzları dışında suyu az veya çok tuz içeren akarsular, kuyular, kaynaklar ve göller de vardır. Genel olarak bunların kaynağı kaya tuzlarıdır. Hareket halindeki yeraltı sularının, kaya tuzu yataklarından geçmesi sırasında bir miktar tuzu eritip, iyon halinde bünyesine alarak farklı formasyonlarda yeryüzüne çıkmasıyla tuzlu su kaynakları oluşmaktadır. Bunlara **kaynak tuzlası** denir. Kaynakların, yer altında geçtikleri formasyonların özelliklerine bağlı olarak bileşimlerindeki tuz miktarı değişmektedir (<http://www.turkiyetuz.com /kaynak/kaynak.asp>, 2012).

Kaynak tuzlaları Anadolu'nun Çankırı vilâyeti ile Kırşehir arasında çekilecek hattın doğusunda kalan bölümünde bulunmaktadır. Bu yaygınlık bir yandan Çorum, Sivas, Erzincan, Erzurum, Van dolayları ile ilgili genişçe bir şerit halinde ve öte yandan da Siirt - Beytüşşebab - Hakkâri arasındaki bölgeye kadar uzanır. Tuzlaların yakın civarı çorak bir çöl manzarası arzeder. Bölgenin tuzlu kil, killi tuz, jipsli kil ve jips ile kaplı olmasından ötürü yeraltı, yer üstü suları tuzludur.

Anadolu'daki tuzlu su memba tuzlaları hemen çoğunlukla 2500 - 3300 metrelik yüksek dağlarla çevrili derin vadilerde ya da yine bu dağ yamaçları dibindeki genişçe vadi - ovalarda bulunmaktadır. Erzurum'un Aşkale, Muslih, Erzincan, Kemah'ın kömür, Sivas'ın tuzlalarının çoğu bu ikinci özelliكتedir. Birinci tipin en karakteristiğı Erzurum'un Karagöl dağları dibindeki Karagöl tuzlası ile Sivas'ın Hamo tuzlasıdır. Tuzlalar çoğunlukla Oligosen, nadiren de, Miosen'e ait yaşlı arazide bulunmaktadır. Özellikle Oligosen çöl iklim şartları, tuzlu lagünlerde, göllerde önemli miktarda ve yer yer tuz topluluklarına yol açmış, sonunda da tuzlaların meydana gelmelerinde elverişli rol oynamıştır. Sadece Sivas'ta Oligosen arazide, dağınık ve yaygın olan tuz, bir yerde kaya tuzu yatağı teşkil edecek kadar toplu yığın veya tabakalar oluşturmamıştır (<http://www.maden.org.tr/resimler/ekler/22.pdf>, 2012).

Ülkemizdeki kaynak tuzlaları Ağa, Hıvır, Göneli, İşhan, Serhal, Çarkı, Cedit, Hamo, Fadlum, Piliç, Hargün, Göleris, Kömür, Tımsı, Yerhan, Aşkale,

Bingöl, Perobey, Alibaba, Boncuk, Kıhtik, Çökender, Kırmızı, Bar, Canik, Yerli, Taytak, Muhlis, Tatos, Aktuzla gibi birçok tuzla işletilmiş, bir kısmı işletilmeye devam edilmekte, bir kısmı ise ekonomik olmadığından dolayı işletilememiş veya işletilmesinden vazgeçilmiştir (<http://www.turkiyetuz.com/kaynak/kaynak.asp>, 2012).

Sivas İli ve Kaynak Tuzlaları

Sivas ili, Anadolu yarımadasının ortasında, İç Anadolu Bölgesi'nin yukarı Kızılırmak bölümünde yer almaktadır. İl topraklarının büyük bölümü yukarı Kızılırmak, bir bölümü de Yeşilirmak ve Fırat havzalarında yer almaktadır. 28.488 km²'lik yüzölçümüyle, Konya'dan sonra Türkiye'de toprak büyüklüğü bakımından ikinci sırada yer alan il Sivas ilidir. Genel olarak dağlık ve yüksek bir plato üzerinde kurulan Sivas ilinin ortalama yüksekliği 1000 metrenin üzerindedir. Dağlar, bu dağlar arasında kalan vadiler ile çukurlardan oluşan ovalar ve dağların aşınması ile oluşan yüksek platolar ilin başlıca yüzey şekillerini oluştururlar. (Mahirogulları, 2003).

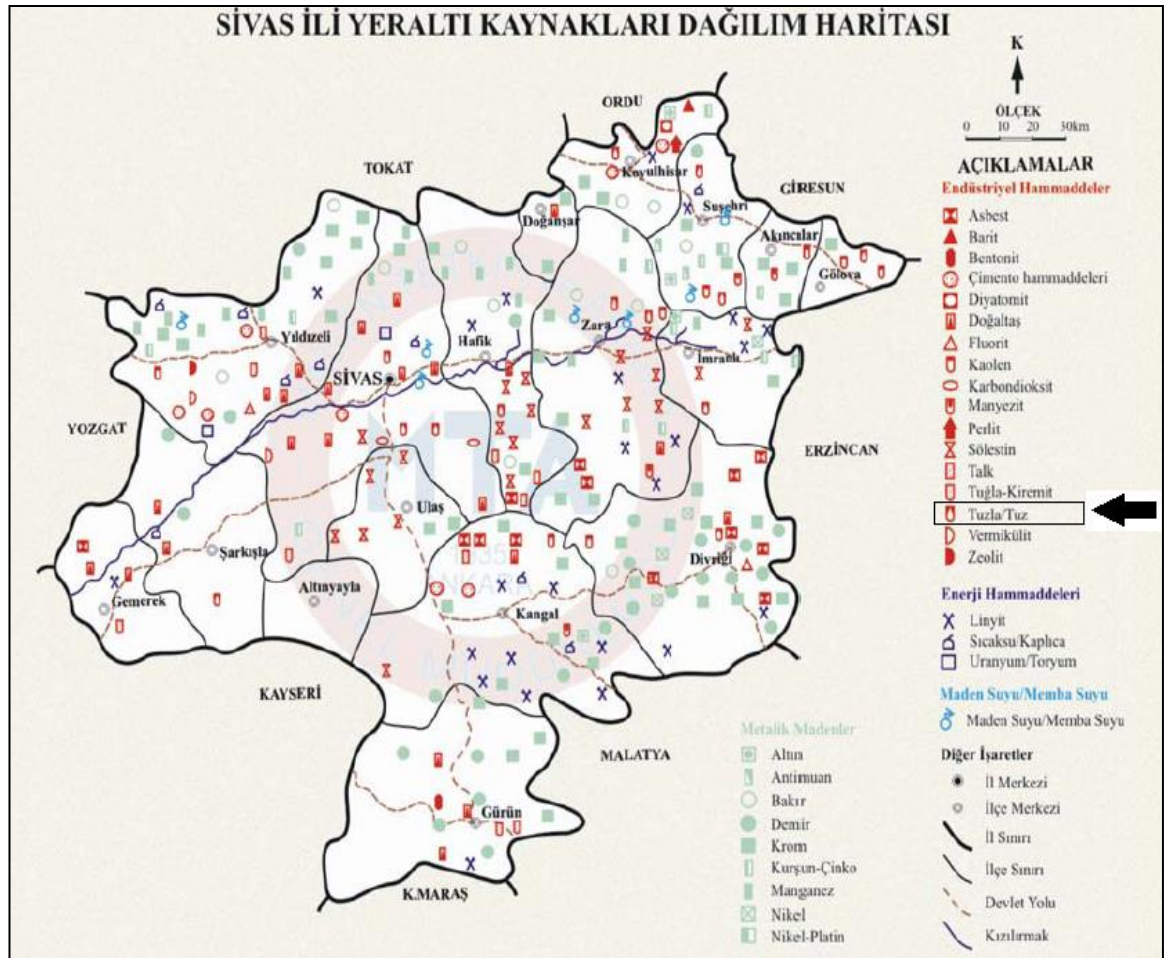
Sivas maden bakımından zengin bir yöredir. MTA (Maden Teknik Arama) tarafından yapılan tespitlere göre, Sivas'ta demir, krom, bakır, kurşun, mermer, tuz, asbest, kaolin, jips, barit, talk madenleri bulunmaktadır. Bu madenlerden bir kısmı işletilmektedir (Mahirogulları, 2003).

Sivas ilinde kaynak tuzlaları oldukça çoktur. Jeoloji bakımından Sivas arazisinde hidrokarbürler, linyitler ve tuzlu kaynaklar arasında sıkı bir ilişki vardır. Hidrokarbürler ve linyitler gibi tuzlu kaynaklar da bilhassa Oligosen arazisine aittirler. Aralarında bazıları Miosen'in kaidesine kadar yükselmekte ise de Oligosen'den önceye ait arazide bunlardan herhangi bir iz yoktur. Bu tuzlu kaynakların kökeni, Oligosen devrine ait lagüner arazidir. Kaynakların tuzluluk derecesi oldukça değişiktir. Bu tuzlalar yaz aylarında çalışmakta, kışın soğğun şiddetinden ve kardan dolayı çalışmamaktadır. Sivas'ın 19 tuzlasından on dördü Oligosen arazisinde bulunmaktadır. Bingöl, Manastırtı, Tuzhisar, Çakrı ve Süleymaniye tuzlaları Oligosen ile Miosen marnları arasındaki (fay) temas sahasındadır (Stchepinsky, 1939).

Sivas'ta asırlardan beri işletilen tuz yatakları bulunmaktadır. Tuzlaların bir kısmı 1994, bir kısmı 2000 yılında özel sektöre devredilmiştir.

Tablo 1.1. Sivas ili özel tuzlalarda üretilen tuz miktarı, 2001 (Mahirogulları, 2003)

Divriği Hamo Tuzlası	400 Ton	Zara Çakırı Tuzlası	1800 Ton
Hafik Tuzhisar Tuzlası	600 Ton	Zara Cedit Tuzlası	1200 Ton
İmranlı Görelis Tuzlası	250 Ton	Zara Hargün Tuzlası	1200 Ton
Sarkisla Piliç Tuzlası	300 Ton	Merkez Fadlum Tuzlası	1400 Ton

**Şekil 1.1.** Sivas ili yeraltı kaynakları dağılım haritası (MTA Genel Müdürlüğü, 2007).



Şekil 1.2. Bingöl Tuzlası, Sivas (2012)

Çorum İli ve Kaynak Tuzlaları

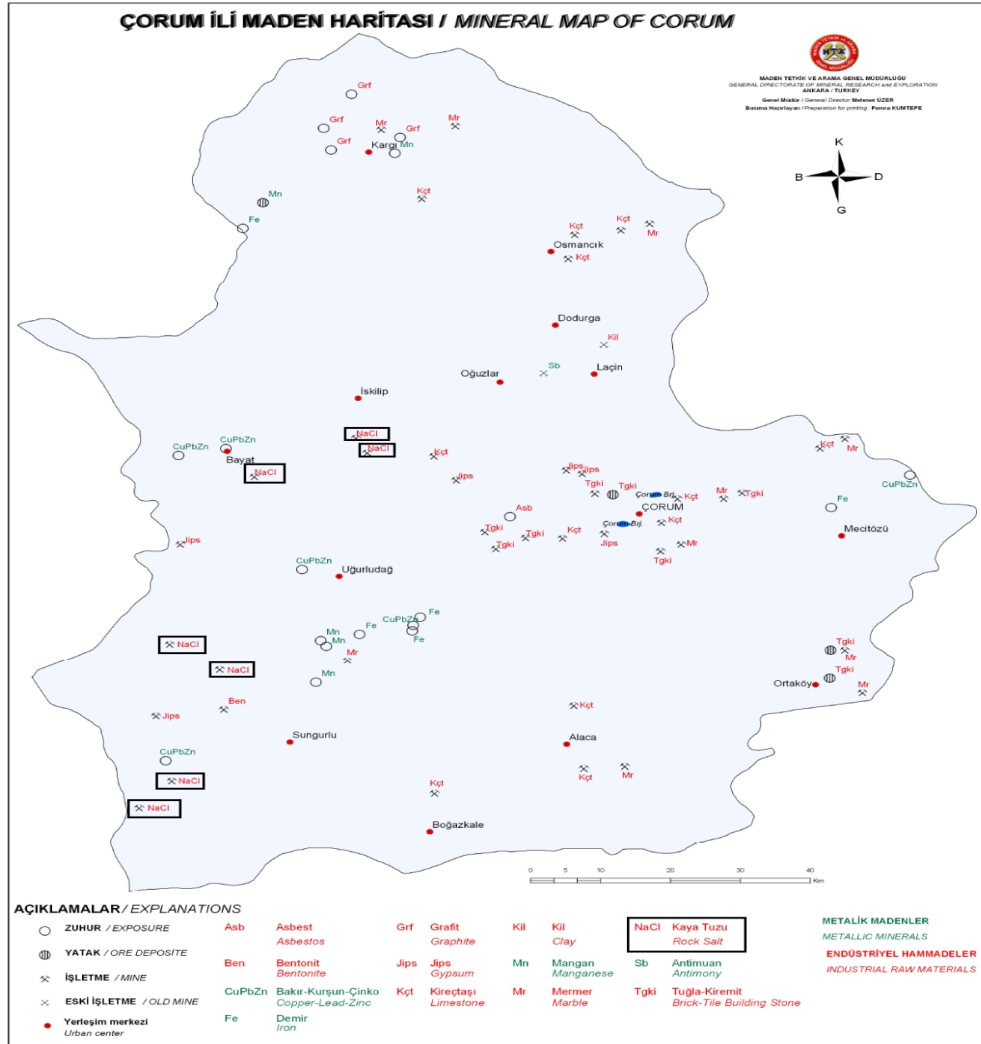
Sungurlu bölgesi Çankırı-Çorum Havzası'nın bir bölümünü oluşturur. Sungurlu (Çorum) denizel bir ortam içinde çökelmiş olan Cevherli ve Kepir Tepe Formasyonları içerir. Her ne kadar bu bölgede görülen en yaşlı formasyon Alt Eosen yaşında ise de havzadaki çökelpmenin en azından Üst Kretase'den beri sürekli olduğu önceki çalışmalarla saptanmıştır (Norman ve ark., 1980). Orta Eosen sırasında bölgedeki hareketli kuşak koşulları (mobile belt conditions) hemen hemen tümüyle durmuş ve sığ su fasiyesinde tortullar çökelmiştir. Orta Eosen sonunda deniz tamamen kurumuş ve bölgede karasal fasiyesde çökeller birikmeye başlamıştır. Denizel birimler ile üstüne gelen karasal birimler uyumlu olup çökelpme Üst Miosen sonuna kadar hiçbir kesiklik göstermeden sürmüştür. Düşey tektonik hareketler bölgede kapalı havzaların gelişimine yol açmıştır. Büyükpolatlı Formasyonunu çökeltten menderesli nehirler taşıdıkları çökelleri denize kadar ulaştırma olanağı bulamadıkları için bölgede kaim istifler oluşmuştur. Miosen zamanında bölgedeki kuraklık iyice artmış buna karşılık yağış azalmıştır. Bu koşullar altında kapalı havzaların orta kısımlarındaki playa göllerinde ince taneli kırıntılı kayalar ile ara tabakalı anhidritler çökelmiştir. Anhidritler zamanla su alarak jipse dönüşmüşlerdir. Gerçek bir dağ oluşumu ile sonuçlanan kuvvetli tektonik olaylar, Miosen sonunda etkin olmuşlardır. Ponsiyen (Alt Pliyosen) yaşlı karasal çökeller, alüvyon yelpazeleri olarak kendisinden önceki birimler üzerinde gelişen uyumsuzluk yüzeyi üzerinde yatay veya düşük

eğimli olarak çökelmişlerdir. Yaklaşık Üst Eosen'den beri egemen olan çökeltme koşulları bu havzadaki etkisini günümüzde de sürdürmektedir (Şenalp, 1981).

Sungurlu bölgesindeki denizel havzanın Orta Eosen sonunda tümüyle doldurulmuş olması nedeniyle bu zamandan itibaren karasal çökeller birikmeye başlamıştır. Büyükpolatlı Formasyonu (Üst Eosen - Miosen) kırmızı renkli çakıl taşı, kumtaşı ve çamurtaşı ile temsil edilmiş olup kuzeydoğudan güneybatıya doğru akan menderesli nehirlerin etkili olduğu bir alüvyon ortamında çökelmiştir. Terzili Formasyonu jips, çamurtaşı ve az miktarda ince taneli kumtaşından yapılmıştır. Jips ikincil kökenli olup anhidritin su alması sonucu oluşmuştur. Bu formasyon playa ortamında çökelmiştir. Büyükşeyhefendi Tepe Formasyonu (Ponsiyen) kötü tabakalanmalı ve kötü boylanmalı çakıltaşı, kumtaşı ve çamurtaşından yapılmış olup kendisinden yaşlı formasyonlar üzerinde açısız bir uyumsuzlukla oturur. Bu çökellerin, dağ sıralanımının eteklerinde alüvyon yelpazeleri olarak çökeldikleri düşünülür (Şenalp, 1981).

Büyükpolatlı Formasyonu Sungurlu bölgesinin stratigrafik istifini oluşturan karasal formasyonların en geniş yayımlı olanıdır. Başlıca değişik oranlardaki çakıltaşı, kumtaşı ve çamurtaşı ile az miktardaki evaporitlerden yapılmıştır. Evaporitler, ince taneli çökellerin egemen olduğu çalışma alanının doğu kesimlerinde, mercek şeklinde ve çamurtaşı ile ara tabakalı olarak görülürler. Bunlar çamurtaşı ile aynı zamanda çökelmişlerdir. Çamurtaşını kesen jipsler ise ikincil kökenlidirler. Tuz yüzeyde görülmez fakat çamurtaşı içinde vardır. **Sarıkaya** ve **Akçakoyunlu** tuzlarında bu formasyondan çıkan tuzlu yeraltı sularını havuzlarda toplayıp buharlaştırma yöntemiyle tuz üretimi yapılmaktadır. Bu formasyonun en tipik olarak görüldüğü yer Büyükpolatlı köyü dolayındır Burada formasyon çok iyi korunmuş olduğu gibi tabakaların doğrultusu boyunca olan yanal fasiyes değişimleri de kolayca görülebilir. Tip kesit Sarıkaya köyü ile Büyükpolatlı köyü arasında ölçülmüştür. Kesitin başlangıç yeri Sarıkaya köyünün yanındaki Kepir Tepe Formasyonu'na ait kireçtaşından başlar ve Büyükpolatlı köyünün yakınından geçen senklinal ekseninde son bulur. Birimin kalınlığı bu kesitte 1870 m olarak ölçülmüştür. Büyükpolatlı Formasyonu tüm Çankırı-Çorum havzasına yayılmış olup Ankara-Samsun karayolu **Delice** ve **Sungurlu** kazılarının arasında bu formasyon içinden geçer (Şenalp, 1981).

Terzili Formasyonu jips, çamurtaşı ve ince taneli kumtaşının belirgin araldanmasından oluşmuştur. Jipsler çoğunlukla ikincil kökenli olup anhidritin su alması sonucu ortaya çıkmıştır. Tuz yüzeyde görülmez fakat bu formasyondan çıkan tuzlu su kaynakları ve küçük tuz göllerinin bulunması tuzun istif içindeki varlığını kanıtlar. Terzili Formasyonu çalışılan saha içerisinde geniş alanlar kaplarsa da en iyi istifler harita alanının dışındaki Terzili köyü yakınında bulunmuştur. Tip kesit köyün 1 km kuzeyinde ve Budaközü deresiyle Aktepe arasında ölçülmüştür. Formasyonun buradaki kalınlığı 326 m'dir. Formasyonun coğrafi dağılımı düzensizdir. Kuzucak köyü ile **Akçakoyun köyü** arasında ve **Sarıkaya tuzlası** dolaylarında tüm özellikleri ile korunabilmiştir (Şenalp, 1981).



Şekil.1.3. Çorum ili yeraltı kaynakları dağılım haritası (MTA Genel Müdürlüğü)

1.1.2.Göl tuzları

Tuz göllerinin bir kısmı eski deniz yatakları olabileceği gibi bazıları da geniş yer çöküntülerinde, civar bölgelerdeki kaya tuzlarından geçerek, bu çukurlarda toplanan tuzlu sulardan meydana gelirler. Yaz aylarında yüksek bir yoğunluk kazanan sular buharlaşarak, sanki deniz sularının toplama havuzları gibi bir tuz tavası haline gelirler. Tuzlu su göllerine, tuzlu su kaynakları ve kuyularına hemen her ülkede rastlanmaktadır ([http://www.turkiyetuz.com /kaynak/kaynak.asp](http://www.turkiyetuz.com/kaynak/kaynak.asp), 2012).

Dünyanın en büyük tuz gölü Büyük Tuz Gölü (Great Salt Lake-U.S.A)'dır. Büyük Tuz Gölü ve Ölüdeniz (Dead Sea) (Orta Doğu) iyi çalışılmış hipersalin göllerdir. Büyük Tuz Gölü büyük ve sığdır, deniz suyuna yakın konsantrasyonda tuz içerir. Ölüdeniz daha küçük ve derindir, yüksek konsantrasyonda magnezyum tuzlarını içermektedir. Büyük Tuz Gölü ve Ölüdeniz nötral pH'ya sahiptir (DasSarma, 2001). İç Anadolu'da bulunan Tuz Gölü dünyadaki en önemli tuz göllerinden biridir. Alkalın hipersalin göllere, Wadi Natrun Gölü (Mısır), Magadi Gölü (Kenya), Great Basin gölleri (Mono Lake, Owens lake, Searles Lake, Big Soda Lake; U.S.A) örnek verilebilir. Soda brine'i, alkalın pH'daki çözünürlükleri düşük olduğundan, magnezyum ve kalsiyum divalent katyonlarından yoksundur (DasSarma, 2001).

Göl tuzları, Tuz gölü çevresinde bulunan Yavşan, Kaldırım ve Kayacık tuzlarıdır. Kesin rezervi ortaya koyacak veriler olmamasına rağmen, Tuz gölünün çok büyük bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Tuz gölünün yıllık yüzey rezervi şu şekilde bir yaklaşımla hesaplanabilir. Gölün tüm alanı 1665 km² dir. Gölün sürekli su altında kalan doğu kesimi ile önemsiz derecede tuz çökelen yerler çıkarılırsa yaklaşık 1200 km² lik bir alan tuz bölgesidir. Gölde oluşan tuz tabakasının kalınlığı 3-20 cm arasında değişmekte olup ortalama 8 cm'dir. Bu durumda;

Göldeki yüzey rezervi = 0.08 m (Kalınlık) x 1200.106 m² (Alan) x 2.2 t/m³ (Yoğunluk) = 211.200.000 ton/yıl NaCl olarak bulunabilir (Yalçın ve Ertem, 1997).

1.1.3.Deniz tuzlaları

Denizlerdeki tuzluluk derecesi; denizlerin tatlı su alıp almadıklarına, coğrafik durumlarına ve iklim koşullarına göre değişiklik gösterir (<http://www.turkiyetuz.com/kaynak/kaynak.asp>, 2012). Deniz tuzlaları da ekstrem halofilik prokaryotların habitatlarıdır. Deniz tuzlaları, deniz suyu ile doldurulmuş ve buharlaştırma sonrası solar deniz tuzunun elde edildiği, küçük çevresi kapatılmış havuzlardır. Tuzlalar, ekstrem halofiller için minimum tuzluluk sınırlarına ulaştıkları zaman, halofilik *Archaea*'nın yoğun üremesinden dolayı suyun rengi kırmızımsı mor renge dönmektedir. Genellikle kare şekilli türler dahil olmak üzere, morfolojik yönden farklı, çeşitli *Archaea* üyeleri tuzlalarda bulunmaktadır (Madigan ve Martinko, 2010).

Deniz tuzu rezervi sonsuz olmasına rağmen, üretim havuzlama tesislerinin kapasitesine ve iklim koşullarına bağlıdır. Ülkemizde deniz tuzlası olarak Ayvalık ve Çamaltı tuzlaları işletilmekte olup, bölge ikliminin son derece uygun olması nedeniyle gerekli yatırımların yapılması durumunda Çamaltı tuzlasının kapasitesi 1.000.000 ton/yıl'a ulaşma olanağına sahiptir. Ancak, şu andaki fiili üretim miktarları ortalama 500.000 ton/yıl dolaylarında gerçekleşmektedir. Yurdumuzun üç tarafının denizlerle çevrili olması, deniz tuzlası işletmeciliği açısından son derece şanslı olduğumuzu göstermektedir. Buradan da, deniz tuzlalarının sonsuza giden rezervi ile bu konuda nedenli rakipsiz olduğu açıkça anlaşılmaktadır (Yalçın ve Ertem, 1997)

1.1.4.Kaya tuzları

Yeraltında az veya çok derinlerden katı halde elde edilen tuzlar kaya tuzu olarak tanımlanır (<http://www.turkiyetuz.com/kaynak/kaynak.asp>, 2012).

Ülkemiz, jeolojik yapısı nedeniyle büyük tuz yataklarına sahiptir. Özellikle 2. zamanın Eosen, Oligosen ve Miosen devirlerinde geniş çökelmeler meydana gelmiştir. İç Anadolu'da Çankırı'dan başlayarak Çorum, Yozgat, Sivas, Erzincan, Erzurum ve Kars üzerinden İran'a bağlanan tuz yataklarında 30'u aşkın kaya ve kaynak tuzlaları yer almaktadır. Ayrıca Adana havzası ve Siirt yöresinde de yeraltı tuzu oluşumları mevcuttur. Ayrıca Kars, Çayırli, Adana, Sivas gibi bölgelerde de petrol sondajları sırasında büyük kaya tuzu birikimlerinin olduğu ortaya çıkmıştır. Sondaj yapılarak üç boyutlu belirlenen görünür rezerv toplamı

1.000.000.000 tonu geçmektedir. Muhtemel ve mümkün rezervler ile birlikte Türkiye'nin çok büyük bir potansiyele sahip olduğu söylenebilir. Türkiye kaya tuzu rezervleri Tablo1.2'de görülmektedir (Faliyet Raporu, 1996) (Yalçın ve Ertem, 1997).

Tablo1.2. Türkiye Kaya Tuzu Rezervleri (T.T. S.M. 1995 yılı faaliyet raporu)

Tuzlanın Adı	Yeri	Görünür (Ton)	Muhtemel (Ton)	Mümkün (Ton)
Sekili	Yozgat	107.000.000	359.000.000	300.000.000
Çankırı		821.000.000	358.000.000	-
Tepesidelik	Kırşehir	-	-	20.000.000
Tuzluca	Iğdır	-	-	100.000.000
Kağızman	Kars	-	-	60.000.000



Şekil 1.4. Türkiye'deki tuzlarının haritada gösterimi (<http://www.turkiyetuz.com/kaynak/kaynak.asp>, 2012)

Tuz, çeşitli sanayi kollarında kullanılmaktadır. Bunlara gıda, süt ürünleri, yağ, yem, et ve balıkçılık, bağırsakçılık, deri, seramik ve cam, tekstil, metalurji ve emaye, soğutmacılık, kağıt, lastik ve kauçuk, deterjan ve sabun sanayi örnek verilebilir (Ergin, 1988).

1. 2.Halofilik Mikroorganizmalar

Optimum geliştikleri tuz konsantrasyonuna göre mikroorganizmalar şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

- Ekstrem halofiller; % 15–30 (2.5–5.2 M) NaCl konsantrasyonunda optimum gelişenler

- Ilımlı halofiller; % 3–15 (0.5-2.5 M) NaCl konsantrasyonunda optimum gelişenler
- Az halofiller; % 1-3 (0.2-0.5 M) NaCl konsantrasyonunda optimum gelişenler
- Halofilik olmayan mikroorganizmalar; % 1 (0.2 M) NaCl konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonunda optimum gelişenler (Kuhnsner ve Kamekura, 1988).

Bununla birlikte bazı non-halofilik mikroorganizmalar yüksek konsantrasyonda NaCl'yi tolere edebilir; bu mikroorganizmalar halotolerant olarak tanımlanır (Kuhnsner ve Kamekura, 1988).

Ekstrem halofiller gelişimleri için tuza ihtiyaç duyarlar, düşük tuz konsantrasyonunda gelişemezler; düşük tuz konsantrasyonunda hücreler parçalanır. Hücre duvarları, ribozomları, enzimleri Na^+ iyonları tarafından stabilize edilir (<http://textbookofbacteriology.net/procaryotes.html>, 2012).

Halofilik türler tuzlu göllerde ve topraklarda, sahil kenarlarındaki tuzlu ortamlarda, tuzlu çöl ortamlarında, tuzlu soğuk ortamlarda, tuzlu bataklıklarda, tuzlu kaynak suları ve içdenizlerde, doğal ve yapay tuzlalarda, tuzlu alkalın habitatlarda, tuzlanmış balık ve et ürünlerinde yaşarlar (Tsiamis ve ark., 2008; Ventosa, 2006).

1.2.1. Halofilik mikroorganizmaların taksonomisi

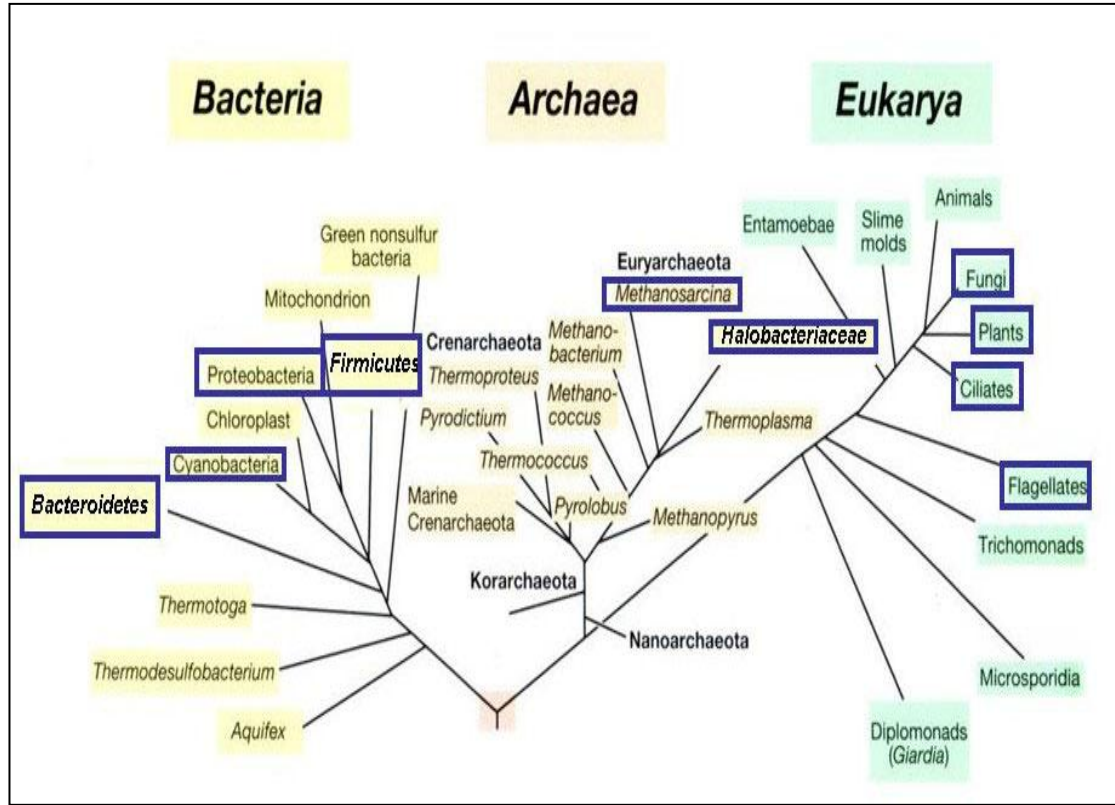
Halofiller, tuzun denatüre edici etkilerine dayanıklı ve çevredeki ozmotik basıncı dengeleme kapasitesine sahip ökaryotik ve özellikle prokaryotik mikroorganizmaları içerirler (DasSarma, 2001). Hipersalin ekosistemler iyonik kompozisyonu, pH'sı ve toplam tuz konsantrasyonu bakımından büyük bir çeşitlilik gösterir (Ollivier ve ark., 1994). Halofiller sadece yüksek tuz konsantrasyonu ile değil aynı zamanda düşük oksijen, yüksek ve düşük pH ve sıcaklık, ağır metallerin varlığı gibi pek çok çevresel faktörle de karşı karşıya kalabilir. Halofillerin metabolik çeşitlilikleri de oldukça fazladır: aerobik, anaerobik, heterotrofik, fototrofik, kemoototrofik tipleri vardır (Horikoshi, 2011).

Halofillere ait örneklere 3 domainde de rastlanır. *Bacteria* domainindeki Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes ve

Bacteroidetes gruplarında halofiller vardır. *Archaea* domaininde Halobacteria grubu halofillerden oluşur. Methanococci grubunda da halofilik türlere rastlanır. Filogenetik olarak yakın birkaç grup sadece halofillerden oluşur; Halobacteriales ordosu, Halobacteriaceae (Euryarchaeota) familyası ve anaerobik fermentatif bakteri ordosu Halanaerobiales (Firmicutes). Halomonadaceae (Gammaproteobacteria) familyası da yoğunlukla halofillerden oluşur (Oren, 2008).

Tuz göllerindeki hücre topluluğunun çoğunluğunu arkeal bir familya olan Halobacteriaceae'ye aittir (Bath ve ark., 2006). % 10-15'den yüksek tuz konsantrasyonuna sahip tuz göllerinde makroskopik olarak gözlemlenebilecek organizmalar sadece *Artemia salina* ve *Ephydra* larvalarıdır (Ventosa, 2006). Ökaryotik bir alg olan *Dunaliella* tuz göllerinin çoğunda bulunan önemli bir oksijenik fototroftur. *Dunaliella*'nın bulunmadığı yüksek pH'lı alkali soda göllerinde anoksijenik fototrofik mor bakteri cinsleri *Ectotrhodospira* ve *Halorhodospira* baskın olarak bulunmaktadır. Oksijenik ve anoksijenik fototrofların primer üretiminden kaynaklanan organik maddeler kemoorganotrofik özellikteki ekstrem halofilik *Archaea*'nın gelişmesini sağlamaktadırlar. Ayrıca *Haloanaerobium* ve *Halobacteroides* gibi birkaç ekstrem halofilik kemoorganotrofik *Bacteria* 'da böyle ortamlarda iyi gelişmektedirler (Madigan ve Martinko, 2010).

Hipersalin göllerin ve lagünlerin dip sedimentlerinin, oksijenin hipersalin tuzlu suda çözünürlüğü düşük olduğu ve organik maddenin genellikle bol olduğu için, anaerobik halofilik bakterilerce zengin olması beklenir (Dworkin ve ark., 2006). Bu ortamlarda organik maddenin ana kaynağı prokaryotlar, algler, omurgasızlardır ve anaerobik organizmalar için bolca kullanıma uygun substrat sağlamaktadırlar (Tsai ve ark., 1995). *Halanaerobiales*, zorunlu anaerobik halofilleri içeren takımdır; *Haloanaerobiaceae* ve *Halobacteroidaceae* familyalarını içerir. 16S rRNA gen analizine göre halofilik anaerobik bakteriler, *Bacteria* domaininde, Gram-pozitif bakteri filumu içinde sınıflandırılabilir. Tüm *Haloanaerobiales* üyeleri ılımlı halofil olarak da sınıflandırılabilir (Dworkin ve ark., 2006).



Şekil 1.5. Küçük alt ünite rRNA gen dizisine dayanarak oluşturulan evrensel filogenetik ağaç ve halofilik mikroorganizmaların ağaçtaki dağılımı. Mavi kutucuklar içindeki gruplar en az bir halofilik temsilciye sahiptir; *Halobacteriales* ise tamamıyla halofillerden oluşur. Ağaç, şek. 11.16 Madigan ve Martinko, 2006 temel alınarak oluşturulmuştur (Oren, 2008).

Halofilik Archaea Taksonomisi

Haloarchaea üyeleri gelişim için yüksek tuz konsantrasyonuna zorunlu olarak ihtiyaç duyar ve tuz içermeyen besiyortamlarında hücreler lize olmaktadır. % 20–25 NaCl tuz konsantrasyonu ve aerobik koşullar altında kolayca gelişebilirler. Bakteriyoruberinleri oluşturan C50-karotenoidlerin varlığından ötürü kırmızı-pembe renklerde koloniler oluştururlar (*Natrialba* cinsine ait bazı türler hariç); dolayısıyla kısmen tuz gölleri ve solar tuzlaların tipik kırmızı pigmentasyonuna sebep olurlar (Şekil 1.6). Bazı türler alkalın pH’da gelişebilir ve haloalkalifilik olarak tanımlanırlar (Horikoshi, 2011).



Şekil 1.6. Halofilik mikroorganizmaların aşırı üremesi sonucu havuzlarda oluşan kırmızı renk (Fadlum Tepeönü Tuzlası, Sivas, 2012)

Çoğu flagella ile hareket eder. Halofilik *Archaea* 'nın üyelerinin çoğunun membranlarında bakteriyorodopsin ve halorodopsin retinal iyon pompaları vardır (Oren, 2003). Halobacteria üyeleri çoğu sucul bakteri gibi gaz vezikülleri üretir. Halofilik Archaea üyelerinin primer metabolizmaları aerobiktir, fakat özellikle yüksek sıcaklıkta oksijen çözünürlüğünün düşük olduğu konsantre tuz ortamında yaşarlar. Gaz vezikülleri hücrelerin, oksijeni daha bol yüzey tabakasında kalmasını sağlar. Bu, ayrıca, mor-membran-aracılı fosforilasyon için ışığın uygunluğunu sağlar. Halobakterilerin proteinleri ya yüksek tuz konsantrasyonuna dirençlidir ya da aktivite için tuza ihtiyaç duyarlar (DasSarma, 2001).

Archaea domaininde halofilik mikroorganizmalar üç familya içerisinde bulunmaktadır; *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* ve *Methanosarcinaceae*. *Methanospirillaceae* ve *Methanosarcinaceae* familyaları non-halofilik mikroorganizmalar da içermektedir; *Halobacteriaceae*, *Halobacteriales* ordosundaki tek familyadır ve sadece halofillerden oluşur (Oren, 2003).

Halobacteriales Ordosu

Halobacteriales ordosundaki halofilik *Archaea* üyeleri tuz konsantrasyonunun 150–200 g/L'yi geçtiği hipersalin çevrelerde bulunurlar *Halobacteriales* ordosunda çubuk (*Halobacterium*), kok (*Halococcus*, *Natronococcus*), pleomorfik (*Haloferax*), kare (*Haloquadratum walsbyi*), üçgen

(*Haloarcula japonica*) gibi pek çok değişik morfolojiye sahip mikroorganizmalar bulunmaktadır (Dworkin ve ark., 2006(a); Oren, 2003).

Tablo 1.3. *Halobacteriaceae* familyasındaki cins ve türler (Horikoshi, 2011)

Cins	Tür
<i>Halobacterium</i>	<i>Hbt. salinarum</i> , <i>Hbt. jilantaiense</i> , <i>Hbt. noricense</i> , <i>Hbt. piscisalsi</i>
<i>Haladaptatus</i>	<i>Hap. paucihalophilus</i>
<i>Halalkalicoccus</i>	<i>Hac. tibetensis</i> , <i>Hac. jeotgali</i>
<i>Haloarcula</i>	<i>Har. vallismortis</i> , <i>Har. amylolytica</i> , <i>Har. argentinensis</i> , <i>Har. hispanica</i> , <i>Har. japonica</i> , <i>Har. marismortui</i> , <i>Har. quadrata</i>
<i>Halobaculum</i>	<i>Hbl. gomorense</i>
<i>Halobiforma</i>	<i>Hbf. haloterrestis</i> , <i>Hbf. lacisalsi</i> , <i>Hbf. nitratreducens</i>
<i>Halococcus</i>	<i>Hcc. morrhuae</i> , <i>Hcc. dombrowskii</i> , <i>Hcc. hamelinensis</i> , <i>Hcc. qingdaonensis</i> , <i>Hcc. saccharolyticus</i> , <i>Hcc. salifodinae</i> , <i>Hcc. thailandensis</i>
<i>Haloferax</i>	<i>Hfx. volcanii</i> , <i>Hfx. alexandrinus</i> , <i>Hfx. denitrificans</i> , <i>Hfx. elongans</i> , <i>Hfx. gibbonsii</i> , <i>Hfx. larsenii</i> , <i>Hfx. lucentense</i> , <i>Hfx. mediterranei</i> , <i>Hfx. mucosum</i> , <i>Hfx. prahovense</i> , <i>Hfx. sulfurifontis</i>
<i>Halogeometricum</i>	<i>Hgm. borinquense</i>
<i>Halomicrobium</i>	<i>Hmc. mukohataei</i>
<i>Halopiger</i>	<i>Hpg. xanaduensis</i>
<i>Haloplanus</i>	<i>Hpn. natans</i>
<i>Haloquadratum</i>	<i>Hqr. walsbyi</i>
<i>Halorhabdus</i>	<i>Hrd. utahensis</i>
<i>Halosarcina</i>	<i>Hsn. pallida</i>
<i>Halosimplex</i>	<i>Hsx. carlsbadense</i>
<i>Halostagnicola</i>	<i>Hst. larsenii</i>
<i>Halorubrum</i>	<i>Hrr. saccharovororum</i> , <i>Hrr. ailingense</i> , <i>Hrr. alkaliphilum</i> , <i>Hrr. arcis</i> , <i>Hrr. californiense</i> , <i>Hrr. chaoviator</i> , <i>Hrr. cibi</i> , <i>Hrr. coriense</i> , <i>Hrr. distributum</i> , <i>Hrr. ejinorensense</i> , <i>Hrr. ezzemoulense</i> , <i>Hrr. kocurii</i> , <i>Hrr. lacusprofundi</i> , <i>Hrr. lipolyticum</i> , <i>Hrr. litoreum</i> , <i>Hrr. luteum</i> , <i>Hrr. orientale</i> , <i>Hrr. sodomense</i> , <i>Hrr. tebenquichense</i> , <i>Hrr. terrestre</i> , <i>Hrr. tibetense</i> , <i>Hrr. trapanicum</i> , <i>Hrr. vacuolatum</i> , <i>Hrr. xinjiangense</i>
<i>Haloterrigena</i>	<i>Htg. turkmenica</i> , <i>Htg. hispanica</i> , <i>Htg. jeotgali</i> , <i>Htg. limicola</i> , <i>Htg. longa</i> , <i>Htg. saccharevitans</i> , <i>Htg. salina</i> , <i>Htg. thermotolerans</i>
<i>Halovivax</i>	<i>Hvx. asiaticus</i> , <i>Hvx. ruber</i>
<i>Halovivax</i>	<i>Hvx. asiaticus</i> , <i>Hvx. ruber</i>

Tablo 1.3 (Devam). *Halobacteriaceae* familyasındaki cins ve türler (Horikoshi, 2011)

<i>Natrialba</i>	<i>Nab. asiatica</i> , <i>Nab. aegyptia</i> , <i>Nab. chahannaoensis</i> , <i>Nab. hulunbeirensis</i> , <i>Nab. magadii</i> , <i>Nab. taiwanensis</i>
<i>Natrinema</i>	<i>Nnm. pellirubrum</i> , <i>Nnm. altunense</i> , <i>Nnm. ejinorensis</i> , <i>Nnm. gari</i> , <i>Nnm. pallidum</i> , <i>Nnm. versiforme</i>
<i>Natronobacterium</i>	<i>Nbt. gregoryi</i>
<i>Natronococcus</i>	<i>Ncc. occultus</i> , <i>Ncc. Amylolyticus</i> , <i>Ncc. jeotgali</i>
<i>Natronolimnobi</i>	<i>Nln. baerhuensis</i> , <i>Nln. innermongolicus</i>
<i>Natronomonas</i>	<i>Nmn. pharaonis</i>
<i>Natronorubrum</i>	<i>Nrr. bangense</i> , <i>Nrr. aibiense</i> , <i>Nrr. sulfidifaciens</i> , <i>Nrr. tibetense</i>

Haloquadratum walsbyi

Yassı, kare şeklinde olan hücreler genellikle gaz vezikülleri ve PHA depo granülleri içerir. Aerobik heterotrof, oksidaz ve katalaz negatiftir. Hücreler Gram negatif boyanır. DNA, 46.9 mol% G+C içermektedir. Tuz gölleri ve tuzlaların kristalize havuzlarında yayılış göstermektedir. Hücrelerin kare şeklindeki kısımları 2.2 µm ve yassı kısımları 0.2 µm'dir. Koloniler agar üzerinde pembe renktedir. Zorunlu aerobiktir; sadece oksijen son elektron alıcı olarak kullanılır. pH 6.0-8.5, 25-45°C ve % 14-36 (w/v) NaCl konsantrasyonu arasında gelişebilir. Hücreler distile suda hemen lize olur; gelişim için minimum ~%14 (w/v) tuza ihtiyaç vardır. Optimum gelişim nötral-alkali koşullarda ve % 18 tuzluluk üzerinde gerçekleşir. Pirüvatın tek karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyerinde en iyi gelişir (Burns ve ark., 2007).

Halonotius pteroides

Yassı, çubuk şeklinde hücreler 0.7-1.5 µm genişliğinde ve 2-6 µm uzunluğundadır. Faz kontrast mikroskop ile uzun, yassı hücreler kanat-şeklinde bir görünüm sergiler. Polar flagella ile hareketi zayıftır. Agar üzerinde koloniler kırmızı renklidir. Zorunlu aerobiktir, sadece oksijen son elektron alıcı olarak görev yapar. Hücreler Gram-negatif boyanır. pH 5.5-8.5, 25-45°C ve % 16-36 (w/v) NaCl konsantrasyonu arasında gelişebilirler. Optimum gelişim 18% (w/v) tuzlulukta ve nötral koşullarda gerçekleşir. Mg²⁺ gerekli değildir. Hücreler distile suda hemen parçalanır. DNA, G+C içeriği 58 mol%'dir. *Halonotius* strainleri solar tuzlulardan izole edilmiştir (Burns ve ark., 2010).

Haloarcula californiae

Guerrero Negro Tuzlası'ndan izole edilmiştir (Baja, California). Hücreler, yassı ve köşeli bir şekildedir. 3-4 M NaCl konsantrasyonunda optimum gelişir. 5M NaCl konsantrasyonunda da gelişebilir; ancak 2M'da gelişemez. Hücreler gelişim için magnezyuma ihtiyaç duyar (http://gcat.davidson.edu/mediawiki-1.15.0/index.php/Haloarcula_californiae, 2012).

Halobacterium Cinsi

Gelişim için pek çok faktöre ihtiyaç duyarlar. Optimum gelişim için yavaşça artan sıcaklığa (38-45°C) ihtiyaç duyarlar. Fakültatif anaeroblardır. Çoğu gaz veziküllerine, mor membrana ve turuncu-kırmızı karotenoidlere sahiptir. Çoğu nitrat redüksiyonu ve denitrifikasyon ile farklı şekerleri fermente ederek, arjinini parçalayarak ya da retinal pigmentler aracılığıyla ışık enerjisini kullanarak oksijen yokluğunda gelişebilme yeteneğine sahiptir (DasSarma, 2001).

***Halobacterium salinarum* NRC-1**

Gelişim için 3.5-5M NaCl'ye (optimum 4.3M) ihtiyaç duyan ekstrem bir halofildir. Hücreler, hücre içinde potasyum iyonlarını biriktirerek tuz konsantrasyonunu dış ortama eşit olacak şekilde ayarlayarak ozmotik dengeyi sağlarlar (DasSarma ve DasSarma, 2006; Oren ve ark. 2002). Ayrıca, brom iyonları ile klor iyonlarını da hücre içinde biriktirir (Sonnenfeld, 1984). Halorodopsin ışıkla-aktive olan, tuzları pompalamadan sorumlu ve *H. salinarum* NRC-1'de bulunan bir membran proteindir; brom ve klor iyonlarının eşit miktarda taşınmasını sağlamaktadır (Kolbe ve ark., 2000; Steiner ve ark., 1984). Hücreler desikasyona, UV ve IR'ye oldukça oldukça dirençlidir (Baliga ve ark., 2004).

Haloarcula japonica

Üçgen şekilli halofilik Archaea ilk kez 1986 yılında Horikoshi ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir. İzolat, *Haloarcula japonica* olarak tanımlanmıştır (Horikoshi ve ark., 1993; Otozai ve ark., 1991; Takashina ve ark., 1990). Hücre bölünmesi sırasında hücre plate'leri asimetric olarak oluşturulur; sonradan ayrılacak olan üçgen şekilli yavru hücreler oluşturulur (Hamamoto ve ark., 1988). DNA, G+C içeriği 63.3 mol%'dir (Oren, 2003).

Haloferax mediterranei

Optimum gelişim 170g/L NaCl konsantrasyonunda gerçekleşir. İlk kez İspanya'daki bir tuzladan izole edilmiştir. DNA, G+C içeriği 60 mol%'dir (Rodriguez-Valera ve ark., 1983; Torreblanca ve ark., 1986). *Haloferax mediterranei* büyük miktarda (hücrenin kuru ağırlığının % 60'ı) hücre içinde poli- β -hidroksi bütirikasit (PHB) biriktirmektedir (Margesin ve Schinner, 2001).

Halorubrum sodomense

İlk kez 1980 yılında Ölüdeniz'den izole edilmiştir. Çubuk şekillidir ve gelişim için yüksek derecede magnezyuma (optimum 0.8 M) ihtiyaç duyarlar. 30-250g/L NaCl tuz konsantrasyonunda gelişebilirler. G+C içeriği 68 mol%'dir Belirli koşullar altında bakteriyorodopsin ile mor membran oluştururlar (Oren, 2003).

Halofilik Bacteria Taksonomisi

Bacteria Domain'i 28 filuma ayrılmaktadır. Ilımlı ya da ekstrem halofillere ait örnekler Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes, Bacteroidetes, Thermotogae, Cyanobacteria ve Tenericutes filumlarında bulunmaktadır (Horikoshi, 2011).

Filum Proteobacteria

Bu filum Gram negatif bakterilerin beş farklı sınıfını içermektedir; Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria ve Epsilonproteobacteria. Betaproteobacteria sınıfı hariç, diğer tüm sınıflar halofilik bakteri örnekleri içermektedir (Horikoshi, 2011).

Sınıf Alphaproteobacteria

Rhodovibrio sodomensis

Hücreler virgül-spiral şeklinde ve 0.6–0.7x1.6–2.5 μ m büyüklüğündedir. Muhtemelen polar flagelladan ötürü zayıf harekete sahiptir. İç fotosentetik membranları veziküler tiptedir. Fotosentetik kültürleri pembe renkte oluşur. Fotosentetik pigmentleri, bakteriyoklorofil a ve spirilloksantin serisinin karotenoidleridir. Gelişim, maya özütü varlığında, ışıklı ve anoksik koşullar altında fotoheterotrofik olarak meydana gelir. Kemotrofik gelişim asetat ve süksinat ile % 0.3–0.5 maya özütü varlığında oksik koşullar altında ve karanlıkta da mümkündür. Poli- β -hidroksibütirat depo polimer olarak üretilir. % 0.01 maya

özütü içeren kompleks besi ortamı gereksinir. Zorunlu ve ılımlı halofilik bakteridir. 35-40°C, pH 7.0 ve % 12 NaCl konsantrasyonunda optimum gelişir. Bromide ekstrem toleranslıdır; %50-75 NaCl, NaBr (1.5 M'a kadar) ile değiştirilirse iyi gelişim gösterir. Ölüdeniz (Dead Sea)'de ışığa maruz kalan sedimetlerin ve suyun oksijensiz kısımlarından izole edilmiştir. DNA, 66.2–66.6 mol% G+C içermektedir (Brenner ve ark., 2001(b)). Rhodovibrio cinsine ait türler, dış ortamdaki tuzluluğa karşılık glisin betain ve ektoin biriktirir (Horikoshi, 2011).

Parvularcula bermudensis

Hücreler 0.4-1.3x0.6-1.8 µm büyüklüğündedir. Gelişim 10-37°C sıcaklık, pH 6.0-9.0 ve % 0.75-25 NaCl tuz konsantrasyonunda gerçekleşebilir. 30°C'de optimum gelişir. DNA 60.8 mol% G+C içermektedir. Sargasso Denizi'nin batısındaki Bermuda bölgesinden (Atlantik Okyanusu) izole edilmiştir (Cho ve Giovannoni, 2003).

Sınıf Gammaproteobacteria

- **Alteromonadaceae Familyası**

Marinobacter algicola

Çubuk şekilli, ılımlı halofilik, hareketli, aerobik bakterilerdir. Katalaz ve oksidaz pozitif, Gram negatiftir. Spor oluşturmaz. Koloniler krem renkli ve daireseldir. 1.6-2.5x0.45-0.55 µm boyundadır. Optimum gelişim, % 3-6 (w/v) NaCl tuz konsantrasyonu, 25-30 °C sıcaklık 5-45 °C arasında gelişebilir. DNA 55 mol% G+C içermektedir (Green ve ark., 2006).

***Salinivibrio* Cinsi**

Gram negatif, hücreler virgül şeklinde 0.5 µm genişliği ve 1.5-3.2 µm uzunluğundadır. Polar flagella ile hareket eder. Spor oluşturmazlar. Koloniler dairesel, konveks, opak ve krem renklidir. ılımlı halofillerdir; % 0.5-20 (w/v)tuz, 5-45°C ve pH 5-10 arasında gelişebilirler. Optimum % 10 (wt/vol) tuz konsantrasyonunda, pH 7.5 ve 37°C'de gelişirler. Fakültatif anaerobiktirler. Katalaz ve oksidaz üretilir. Kemoheterotrofiktirler. DNA 49.4-50 mol% G+C içermektedir. Hipersalin ortamlardan ve tuzlu gıdalardan izole edilmişlerdir (Mellado ve ark, 1996).

Salicola marasensis

Düz çubuk şekilli hücreler, tek polar flagella ile hareket eder. Gram negatif, zorunlu aerobiktir. Yüksek tuzluluk içeren tuz gölleri, tuzluların havuzlarında yaşarlar. % 10 NaCl konsantrasyonu altında gelişim göstermezler. Optimum gelişim % 15 tuz konsantrasyonunda, pH 7.0 ve 35 °C’de gerçekleşir. DNA 61.3-61.9 mol% G+C içermektedir (Maturrano ve ark., 2006(b)).

Idiomarina Cinsi

Kemoorganotrofik, Gram negatif, zorunlu aerobiktirler. Çubuk şeklinde olan hücreler polar flagella ile hareket etmektedir. Gelişim için sodyum iyonlarına ihtiyaç vardır. Vitamin ya da aminoasitlere ihtiyaç yoktur. Optimum gelişim 20-22°C ve pH 7.5-8.0 arasındadır. Oksidaz, katalaz, jelatinaz, lipaz ve DNaz pozitifdir. Agar üzerinde nişastayı parçalayamaz. DNA 48.9-50.4 mol% G+C içermektedir (Ivanova ve ark., 2000).

- **Halomonadaceae Familyası**

Gammaproteobacteria sınıfı ve Oceanospirillales ordosu içerisindeki *Halomonadaceae* familyası çoğunlukla deniz mikroorganizmalarını ve ılımlı halofilik mikroorganizmaları içermektedir. *Halomonas*, *Carnimonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Deleya* ve *Zymobacter* cinslerini içerir (Arahal ve Ventosa, 2006).

Halomonadaceae üyeleri, okyanus, deniz, tuz gölleri, tuzlu gıdalar, solar havuzlar, soda gölleri, alkalın topraklar gibi birçok alanda yayılım göstermektedir (Arahal ve Ventosa, 2006).

Halomonas Cinsi

Düz ya da eğri çubuk şeklinde 0.6–0.8x1.6–1.9 µm boyundadırlar. Sadece *Halomonas halodenitrificans* kok şeklindedir. Türler belirli koşullar altında uzun esnek filamentler oluşturabilir. Endospor oluşturmazlar. Gram negatifirler. Çubuk şekilli türler lateral, polar ya da peritrik flagella ile hareket eder. Koloniler beyaz ya da sarı renklidir, uzun süre inkübasyon sonrası açık kahverengiye döner. Oksijenin son elektron alıcı olarak görev yaptığı temel solunum metabolizmasına sahiptirler. Tüm türler katalaz pozitifdir. Bilinen 21 türden 17’si oksidaz pozitifdir. İntraselüler granüller üretilmez. % 0.1-32.5 (w/v) NaCl konsantrasyonu arasında gelişebilirler (Brenner ve ark., 2001).

Halomonas taeanensis

Hücreler aerobik ve Gram negatiftir. Spor oluşturmeyen çubuk şeklinde 0.6-1.0 µm genişliğinde ve 2.0-3.2 µm uzunluğundadır. Koloniler düz ve dairesel ya da az düzensizdir. Hücreler hareketli ve birçok flagellaya sahiptirler. % 1-25 (w/v) NaCl konsantrasyonu arasında gelişebilirler; optimum gelişim % 10-12 (w/v) arasındadır. 10-45°C arasında gelişebilir; optimum gelişim 35°C'de gerçekleşir. Oksidaz ve katalaz pozitifdir. DNA 65 mol% G+C içermektedir (Lee ve ark., 2005).

Halomonas salina

Düşük tuzlulukta geliştirilirse, kok şeklinde hücreler oluşturur, ancak optimum tuz konsantrasyonu (% 7.5) ve üzerindeki konsantrasyonlarda (% 30'un altında) geliştirilirse tipik uzun filamentler oluşturur. Hücreler hareketsizdir, kapsül oluştururlar ve PHB biriktirirler. Koloniler 32°C'de, 48 saatte gelişebilir. Bu tür ayrıca seleniti indirgeyen ve sodyum iyonlarının yanında gelişim için magnezyum iyonlarına da ihtiyaç duyan bilinen tek *Halomonas* türüdür. Diğer *Halomonas* türlerinden farklı olarak bu tür, katyonları, sadece Cl⁻ ve SO₄²⁻ ile desteklenirse kullanabilir. pH 6.0-9.0 arasında gelişim gösterir. pH 5'te de gelişebilir. Katalaz pozitifdir. DNA 60.7-64 mol% G+C içermektedir Toprak, tuz gölleri, deniz ve tuzla havuzları gibi hipersalin ortamlardan izole edilmiştir (Valderrama ve ark., 1991).

Halomonas elongata

% 0.5-30 NaCl konsantrasyonlarında gelişebilir. % 8 NaCl içeren kompleks bir besiyerinde 30-37°C ve pH 5.0-9.0'da geliştirilebilir. DNA 60.5 mol% G+C içermektedir. Solar tuzlalardan ve tuz içeren diğer çevresel örneklerden izole edilmiştir (Arahal ve ark. 2001(b)).

Halomonas caseinilytica

Hücreler Gram negatif, hareketli, kısa çubuk ve oval şeklinde 0.8-2.0x 0.4-0.6 µm tek tek ya da çiftler halinde bulunabilir. Koloniler 2 günün sonunda 2mm çapında, dairese, düz ve açık sarı renklidir. Ilımlı halofildirler. Tuzun yokluğunda gelişim görülmez. Gelişim için %0.5–15 (w/v), optimum %3–5 NaCl'ye gereksinirler. pH 5.0–9.0 ve 4-48 °C (optimum gelişim pH 7.0-8.0 ve 30 °C'de) gelişebilirler. Oksidaz negatif, Katalaz pozitifdirler. Ekzopolisakkarit ve PHB

üretirler. DNA 63.0 mol% G+C içermektedir. İlk kez Qinghai'de bir tuz gölünün toprak örneğinden izole edilmiştir (Tibet Plateau, China) (Wu ve ark., 2008)

Chromohalobacter salexigens

Hücreler Gram negatif, hareketli ve spor oluşturmazlar. Çubuk şeklinde ve 0.7-1.0 X 2.0-3.0 µm büyüklüğündedir. Hücreler tek ya da çiftler halindedir. 10% (w/v) tuz konsantrasyonunda koloniler krem, opak ve dairesel, 2 mm çapından daha küçüktür. % 0.9-25 (w /v) tuz konsantrasyonunda, pH 5-10 ve sıcaklık 15-45°C arasında gelişebilirler. 37°C sıcaklık ve % 7.5-10 (w/v) tuz konsantrasyonunda optimum gelişirler. Katalaz pozitif ve oksidaz negatiftirler. DNA 64.2-66.0 mol% oranında G+C içerir (Arahal ve ark., 2001).

Filum Firmicutes

Sınıf Clostridia

Ordo Halanaerobiales

Hipersalin göllerin ve lagünlerin dip sedimentlerinin, oksijenin hipersalin tuzlu suda çözünürlüğü düşük olduğu ve organik maddenin genellikle bol olduğu için, anaerobik halofilik bakterilerce zengin olması beklenir (Dworkin ve ark., 2006(b)). Bu ortamlarda organik maddenin ana kaynağı prokaryotlar, algler, omurgasızlardır ve anaerobik organizmalar için bolca kullanıma uygun substrat sağlamaktadırlar (Tsai ve ark, 1995).

Halanaerobiales, zorunlu anaerobik halofilleri içeren takımdır (Dworkin ve ark., 2006(b)). Halofilik arkeal üyeler tipik olarak ya aerobik ya da metanojeniktir ve fermentatif halofilik arkealar çok nadirdir. Çoğu halofilik fermentatif bakteri filogenetik olarak Halanaerobiales ordosuna aittir. Halanaerobiales ordosu Firmicutes filumu ve Clostridia sınıfına aittir; *Haloanaerobiaceae* ve *Halobacteroidaceae* olmak üzere iki familya içerir. Halanaerobiales ordosu 25 fermentatif tür içermektedir. *Halanaerobiaceae* familyası *Halanaerobium*, *Halothermothrix*, *Halocella*, ve *Halarsenatibacter* (yayınlanmamış isim) cinslerini; *Halobacteroidaceae* familyası *Acetohalobium*, *Haloanaerobacter*, *Halanaerobaculum*, *Halobacteroides*, *Halonatronum*, *Natroniella*, *Orenia*, *Selenihalobacter* ve *Sporohalobacter* cinslerini içerir. Halanaerobiales ordosuna ek olarak Clostridiales ve Natranaerobiales ordoları birer zorunlu halofilik fermentatif bakteri türü içerir (Kivistö ve Karp, 2010).

Haloanaerobiales ordosuna ait *Haloanaerobacter chitinovorans* California'daki bir deniz tuzlasından izole edilmiştir. *Haloanaerobacter chitinovorans*, kitinolitik aktiviteye sahip bir halofilik anaerobik bakteridir (Liaw ve Mahw, 1992).

Halofilik fermentatif bakterilerin yaşam için gereksinimleri çok karmaşık değildir; yüksek tuz konsantrasyonu (%5-25), anaerobik koşullar ve karbon kaynağı olarak basit organik bileşikler yeterlidir. Halofilik fermentatif bakterilerin çoğu 50-150g/L arasında optimum tuz konsantrasyonunda gelişen ılımlı halofillerdir. Bununla birlikte birkaç ekstrem halofilik temsilcilerde vardır; *Halanaerobium lacurosei*, *Hb. tunisiense*, ve *A. arabaticum* sırasıyla 200, 200–220 ve 150–180 g/L tuz konsantrasyonlarında optimum gelişirler. Hidrojen, karbondioksit, asetikasit, etanol, 1,3-propanediol halofilik fermentatif bakterilerin fermentasyon ürünleridir (Kivistö ve Karp, 2010).

39.6 mol %'sine sahip termofilik *Halothermothrix orenii* dışında, Haloanaerobiales ordosunun tüm izolatlarının DNA'ları 27 ve 36.9 mol % arasında düşük G+C mol yüzdesine sahiptir (Dworkin ve ark., 2006(b)).

Halofilik fermentatif bakteri hücreleri tipik olarak çubuk şeklindedir. *Hb. tunisiense* hariç tüm türler Gram negatiftir (Kivistö ve Karp, 2010). Haloanaerobiales ordosunun birkaç türü ısıya dirençli endospor oluşturur; bunlar *Sporohalobacter lortetii*, *Orenia marismortui*, ve *Natroniella acetigena* içerir. Oksidaz ve katalaz negatiftir; sitokrom içermezler (Dworkin ve ark., 2006(b)). Çoğu 35-45 °C sıcaklık ve 6-8 pH aralığında optimum gelişir (Kivistö ve Karp, 2010).

Anaerobik bakteriler eczacılık, tarım ve jeo-elemental döngüde önemli role sahiptirler. Anaerobların metabolik çeşitliliğinden biyoremediasyon, biyokimyasal sentez ve fermente gıda üretimini içeren pek çok endüstriyel işlemlerde faydalanılmaktadır. Anaerobların biyokatalistler olarak görev yaptığı teknolojileri geliştirmeye ilgi artmaktadır (Strobel ve Mielenz, 2009).

Fosil yakıtların kullanımının çevreye ve insan sağlığına zararlı etkileri vardır. Ayrıca, fosil yakıtlar yenilenebilir enerji kaynakları değildir. Bu sebeplerden ötürü alternatif enerji kaynaklarına acil ve sürekli ihtiyaç bulunmaktadır. Biyoetanol, biyobütanol, biyohidrojen yenilenebilir alternatif

enerji kaynaklarıdır. Bütanol üreten halofilik bakteri henüz rapor edilmemiştir ancak birçok halofilik fermentatif bakteri tarafından etanol üretilmektedir (Kivistö ve Karp, 2010).

Haloanaerobiales ordosunun üyelerinin, petrol rezervlerinin porlarını tıkayarak petrol oluşumunu hızlandırmada faydalı olabileceği ileri sürülmüştür. Anaerobik halofilik bakterilerin kompleks organik maddelerin endüstriyel fermentasyonunda kullanımı da önerilmiştir ve ilkin testler yapılmıştır. Fakat bu organizmaların bu işlemlerde kullanımı hala deney aşamasındadır (Dworkin ve ark., 2006(b)).

Filum Bacteroidetes

Cytophaga–Flavobacterium-Bacteroides gruplarını içeren Bacteroidetes filumu örnekleri oldukça geniş ve farklı ekolojik nişte yayılım göstermektedir (Garrity ve Holt, 2001). Denizlerde dominant olmakla beraber toprak, kaynak suları, bitkiler ve havada yayılım göstermektedir (Bowman ve ark., 1997; Buczolits ve ark., 2002). Bu grubun üyeleri, çeşitli biyopolimerleri parçalama kabiliyetine sahip olmaları ile karakterize edilirler; dolayısıyla çeşitli ortamlarda dahil oldukları metabolik aktiviteler ile bakteriyal komünitelerin önemli üyeleri olduğu düşünülmektedir.

Sınıf Sphingobacteria

- **Rhodothermaceae familyası**

Salinibacter ruber

İspanya'daki bir solar tuzlanın kristalize havuzlarından izole edilmiştir. Çubuk şeklinde, Gram negatif, aerobik, heterotrofik, oksidaz ve katalaz pozitif, ekstrem halofilik gelişim için en az %15, optimum gelişim için %15–30 tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duymaktadır. DNA, 66.5 mol% oranında G+C içermektedir (Anto'n ve ark., 2002).

Salisaeta longa

Hücreler, Gram-negatif, aerobik, heterotrofik, oksidaz ve katalaz pozitifdir. Düz ya da hafif eğri uzun çubuklar şeklinde, 15-30 µm uzunluğundadır. Agar üzerinde koloniler kırmızı renkli, dairesel ve konvektir. %10 NaCl ve % 5 MgCl₂.6H₂O konsantrasyonunda optimum gelişim gösterir. pH 6.5–8.5 aralığında optimum gelişir; pH 6.0 altında ya da pH 9.0 üstünde gelişim göstermez.

Optimum sıcaklık 37-46°C; 25°C altında ya da 50°C üzerinde gelişim göstermez. DNA, 62.9 mol% oranında G+C içermektedir (Vaisman ve Oren, 2009).

Halofilik ve Halotolerant Eukarya

Orta derece tuzluluktaki ortamlarda, yeşil alg populasyonlarına rastlanmaktadır. Bazı türleri yüksek tuzlulukta bol miktarda turuncu renkli β -karoten üretirler. Çoğu ılımlı halofildir ancak birkaçı ekstrem halofiliktir; *Dunaliella salina* ve *Asteromonas gracilis* doymuş tuz konsantrasyonunda bile gelişebilirler. Algler çözünür madde (compatible solute) olarak polyol kullanırlar. *Dunaliella salina*’da osmotik strese karşı gliserol sentezlenir (DasSarma, 2001).

Mayalar ve fungusların bazıları hipersalin ortamlara adapte olmuşlardır. *Debaromyces hansenii* halotolerant bir mayadır; deniz suyundan izole edilmiştir 4.5 mol/L NaCl konsantrasyonunda aerobik olarak gelişebilir. Logaritmik faz boyunca gliserol, durağan fazda arabitol üretilen çözünür maddeler (compatible solute)’dir (DasSarma, 2001).

1.2.2. Halofilik mikroorganizmaların fizyolojisi

Yüksek tuzlulukta yaşamak için halofillerin geliştirdiği stratejiler

Halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların yüksek tuz konsantrasyonunda yaşayabilmek için geliştirdiği temel iki strateji vardır; her iki strateji de hücre içinde yüksek konsantrasyonda madde biriktirip hücre içi osmolariteyi arttırma prensibine dayanır;

Düşük-tuz; organik çözünür madde biriktirme stratejisi; enzim aktivitelerine katılmayan organik çözünür maddelerin biyosentezi ve / ya da biriktirilmesine dayanır. Ancak böyle organizmalar bile, tuzlu ortama maruz kalan membran üzerinde tuza-adapte olmuş proteinlere ihtiyaç duyar (Ma ve ark., 2010). Metabolik işlemleri sekteye uğratmayan ve fizyolojik pH’da net yüke sahip olmayan aminoasitler ve glisin betain, ektoin, sükroz, trehaloz ve gliserol gibi polyoller halofiller tarafından biriktirilen çözünür maddeler (compatible solute) ya da osmolitlerdir (DasSarma, 2001).

Yüksek-tuz biriktirme stratejisi; Halobacteriaceae, Salinibacter ve anaerobik Halanaerobiales üyeleri tarafından kullanılır. Tüm hücresel proteinlerin stabilitesi ve aktivitesi için KCl ya da diğer tuzların molar konsantrasyonlarının

varlığına gereksinir (Ma ve ark., 2010). Hücre içine K^+ iyonlarının biriktirilmesine dayanan bu stratejide, sitoplazma içine büyük oranda K^+ pompalanır dolayısıyla hücre içi K^+ konsantrasyonu hücre dışı Na^+ konsantrasyonundan oldukça yüksektir. Hücre içindeki inorganik K^+ hücrenin su dengesini sağlayan organik bileşikler gibi iş görür, yüksek osmotik basınç ve iyonik güçte hücrenin dehidrasyonunu engeller. Yüksek iyonik güç altında proteinler kümeleşme eğilimindedir ve genellikle aktivitelerini kaybederler, dolayısıyla haloarkelerin tüm hücresel mekanizmaları bu ortama adapte olmalıdırlar. Halobakterilerin ribozomları stabilize olmak için yüksek tuz oranına ihtiyaç duyar ve halofilik enzimler solüsyonda kalabilmek için oldukça polar yüzeylere sahiptir. Bu yüzden, sitoplazmik halofilik proteinler yüksek oranda asidik amino asitler içerirler (Falb, 2005).

Bazı türler bakteriyorodopsin (BR) ya da rodopsin benzeri kromoproteinlerden kökenlenen mor membrana sahiptir. BR bir proton gradienti yaratır ve Na^+ iyonlarının hücre dışına pompalanmasını sağlar. Bir proton hücre membranından dışa itilirken bir proton hücre içine alınır. Bu proton gradienti ATP üretimini sağlar. Na^+ gradienti hücre içine K^+ alımına yol açar ve osmotik basıncı dengeler. Bu dengeleme sonucu iç potasyum konsantrasyonu yaklaşık 5M ve dış sodyum konsantrasyonu yaklaşık 4M olur. Halorodopsin (HR) klor iyonlarını hücre içine pompalar ve içerdeki K^+ iyonları dengelenir (http://serc.carleton.edu/microbelife/extreme/hyper_saline, 2012).

Bu adaptasyonun hem *Archaea* hem de *Bacteria* örneklerindeki varlığından dolayı, bu özelliğin konvergent evrim ile oluşmuş olabilebileceği ileri sürülmektedir. Örneğin *Salinibacter ruber* fenotipi Haloarchaea üyelerine benzemektedir. Genom dizisine bakarak bu benzerliğin fizyolojik seviyede (farklı genler benzer fenotipler yaratmaktadır) ve moleküler seviyede (bağımsız mutasyonlar benzer diziler ve yapılar üretmektedir) konvergent evrim yoluyla oluştuğu düşünülmektedir. Birçok genler ve gen kümeleri lateral gen transferi ile de bu gruplar arasında birbirlerine iletebilmektedir (Mongodin ve ark., 2005).

UV radyasyonundan korunmak için geliştirilen stratejiler

Hipersalin ortamlarda yaşayan mikroorganizmalar yoğun UV'ye maruz kalmaktadır. Bu tip bir ortamda yaşamak için halofiller etkin DNA tamir

mekanizmalarına sahiptir, ancak DNA hasarlarını önlemek için de mekanizmalara sahiptirler. Örneğin, Haloarchaea genomlarında düşük oranda UV hedefine, yani timine, sahiptirler. Renkli karotenoidler de korunma stratejisi olabilir çünkü renksiz mutant halofiller UV'ye duyarlıdır. UV ışığına maruz kalmak hücre membranında yer alan mor bir kromoprotein olan, bir proton pompası gibi davranan ve ATP sentezini sağlayan BR' nin aktivasyonu için gereklidir.

Desikasyonun meydana getirdiği zorluklardan korunmak için geliştirilen stratejiler

Yüzeyden oluşan buharlaşma sonucu tuz molekülleri bir araya gelmektedir. Bu moleküller küçük tuz kristalleri oluşturmaktadır. Göl suyu ile çevrelenmiş bu küçük kristaller bir araya gelip büyüüp ağırlaşmakta, yüzeyden dibe çökmeye başlamaktadır. Kristal göl tabanına ulaşip büyümeye devam etmektedir. Kristal büyümesi devam ederken sıvı inklüzyonların oranı da artmaktadır. Kristal oluşurken bazen halofiller bu sıvı inklüzyonlar içinde kalabilmektedir. Bu halofiller burada yıllarca hayatta kalabilmektedir (<http://serc.carleton.edu/microbelife/extreme/hypersaline>, 2012).

1.2.3.Hücre Şekli ve Hücre Duvar Yapısı

Haloarchaea üyeleri prokaryotik mikroorganizmalardır. *Halococcus* hariç haloarkelerin hücre duvarı sadece S-tabaka denen ince bir glikoprotein tabakadan oluşur. Protein altüniteler divalent katyonlarla bir arada tutulur. Hücre duvarının kırılma yapısından dolayı, iz miktardaki deterjanlarla bile hücreler parçalanır; bu yüzden besiyeri hazırlamadan önce tüm cam malzemelerin distile su ile iyice yıkanması gerekir. Bu S-tabaka hücreye sert bir hücre şekli sağlamaz, saf bir kültürde bile şekilleri değişebilir. Çoğu çubuk şeklindedir; disk, kok şeklinde olanlar da yaygındır (<http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/index.html>, 2012).

1.2.4.Haloarkelerin Genomları

Halobakterinin tüm üyelerinin yüksek G+C baz oranına (% 62-68) sahip olduğu düşünülmekteydi, ancak *Haloquadratum walsbyi* genomu sadece % 48 G+C içermektedir. Plazmidlerin G+C içeriği genellikle kromozomunkinden daha azdır. *Halobacterium* ve *Haloarcula* türleri toplam hücresel DNA 'nın % 25 - 30'unu içeren büyük plazmidlere sahiptir. Bu megaplazmidler kromozomal

karakter gösterirler çünkü hayati fonksiyonlar üzerinde etkili aminoasit tRNA ligazlar ya da RNA gibi molekülleri kodlarlar (Falb, 2005).

1.3. Halofilik Mikroorganizmalar ile İlgili Uygulamalar

Halofilik Archaea'nın farklı türleri bakteriyorodopsin, ekzopolisakkarit ve poli- β -hidroksialkanat gibi faydalı ürünler sentezlerler.

Halofilik Archaea'nın biyoteknolojik süreçlerde kullanımı, kültivasyonunun göreceli olarak kolay olması ve kontaminasyon riskinin düşük olması gibi birtakım avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, konsantre tuz içeren ortamda gazların çözünürlüğünün düşük olması sebebiyle, yeterli oksijen miktarının sağlanamaması bazı problemlere yol açabilmektedir. Ek olarak, eğer büyük fermentörlerle üretim planlanılıyorsa, fermentörlerin besiyeri ile temas eden metal kısımları yapılandırılırken tuzun agresif doğası göz önünde bulundurulmalıdır (Dworkin ve ark., 2006(a)).

1.3.1. Bakteriyorodopsin proteini ve biyoteknolojik kullanımı

Halofilik arkeelerde 4 adet retinal pigment içeren protein tanımlanmıştır: bakteriyorodopsin (ışıkla çalışan dış proton pompası), halorodopsin (ışıkla çalışan iç Cl⁻-pompası) ve 2 adet alıcı rodopsin (ışığa duyarlı fototaksis) (Sharma ve ark., 2007).

Bu protein bir göz pigmenti olan rodopsine yapısal benzerliğinden dolayı bakteriyorodopsin (BR) olarak adlandırılmıştır. Hem rodopsin hem de bakteriyorodopsin, kromofor olarak adlandırılan ışık soğurma yeteneğine sahip bileşenlerden oluşan kompleks proteinler olarak bilinmektedir (Çabuk, 2004). BR bir proton pompası olarak fonksiyon göstermektedir. BR, proton gradienti oluşturmak amacıyla ışığı kullanır. Protonları, hücre içinden hücre dışına doğru pompalar. Protonlar hücre içine ATP sentaz proteini ile geri döner. ATPaz bu enerjiyi ATP formunda depolar (<http://www.bioinformaticscourses.com/ISB/sp2002/1C8R/index.html>; Goodreid, 2012). Aerobik koşullar altında halofilik arkea hücre membranı; membrana karakteristik rengini veren solunumla ilgili karotenoidleri içerir. Karotenoidler yüksek yoğunluktaki ışığı absorblayarak hücreyi fotokimyasal degradasyondan korumaktadır (Farooq, 1997).

Buharlaştırma göllerinde tuzlu su buharlaştırılır ve tuz elde edilir ki; bu durumda su azalır, bunu takiben suda çözünen oksijen suyla aynı oranda azalır,

oksijen azalınca oksijenli solunum şansı ortadan kalkar ve bakteriyorodopsin sentezlenerek zara yerleştirilir. Bununla birlikte halobakteriler tamamıyla anaerobik koşullarda gelişemezler. Bunun nedeni prekürsor β -karotenden kromofor retinal molekülünün biyosentezinin sınırlı olmasıdır. Mor membran oluşumu, sadece, oksijenin, bakteriyorodopsin sentezlenmesini indükleyecek kadar düşük ancak retinal biyosentezine izin verecek kadar yüksek olduğunda meydana gelir (Farooq, 1997).

Bakteriyorodopsin proteini, oldukça stabil bir moleküldür, 0-45°C sıcaklık ve pH 1-11 arasında iyi fonksiyon gösterir ve katı substratlar üzerine sabitlemek kolaydır (Dworkin ve ark., 2006(a)). Halobakterilerin plazma zarlarında bulunan bakteriyorodopsin ışığa duyarlı bir protein molekülü olup biyoelektronik ve geleceğin moleküler bilgisayarlarında kullanılmaya aday moleküllerden biridir. Bakteriyorodopsinin, biyosensör yapımı ve ultra hızda ışık saptanması, bilgilerin holografik olarak depolanması, elektronik sanayi, güneş ışığından elektrik üretimi, deniz suyundan tuz giderimi, optik hesaplama ve optik hafıza, yapay retina oluşturma gibi alanlarda potansiyel olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Margesin ve Schinner, 2001; Zhoua, 2009).

1.3.2.Biyopolimer Üretimi

Biyosüpfaktanlar ve ekzopolisakkaritler (EPS) mikrobiyal hızlandırılmış petrol gelişiminde kullanımı hedeflenen; lipozomlar ise ilaç ve kozmetik sanayinde ve biyoplastik üretiminde dikkat çeken halofilik biyopolimerlerdir (Kivistö ve Karp, 2010).

Biyosüpfaktanlar, hidrofobik hidrokarbonların hareketini arttırarak yüzey gerilimini düşüren biyopolimerlerdir (Kivistö ve Karp, 2010). Halofilik/halotolerant mikroorganizmaların tuz varlığında hidrokarbonları okside etme kabiliyeti petrol ürünleri ile kontamine olmuş tuzlu ekosistemlerin biyoremediasyonu için faydalıdır. Biyoremediasyon, ekosisteme fiziksel olarak hasar vermeden ortamdaki yağın uzaklaştırılması için etkili bir metod olabilir (Margesin ve Schinner, 2001). Halofilik biyosüpfaktanların in situ mikrobiyolojik olarak hızlandırılmış petrol gelişiminde kullanımı üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Kivistö ve Karp, 2010).

Halofilik ekzopolisakkarit (EPS) üreten mikroorganizmalar da mikrobiyal hızlandırılmış petrol gelişimi için kullanılabilir. Tüm EPS'ler oldukça yüksek sülfat içeriğine sahiptir. Sülfatlı EPS'lerin, virüslerin konakçısına penetrasyonuna eşlik ettiği bilinmektedir (Margesin ve Schinner, 2001).

Haloferax mediterranei büyük miktarda (hücrenin kuru ağırlığının % 60'ı) hücre içinde poli- β -hidroksi bütirikasit (PHB) biriktirmektedir (Margesin ve Schinner, 2001). Ayrıca bu hücreler biyo-parçalanabilir plastik üretimi için kullanılan poli- β -hidroksi alkanat (PHA) içerirler. Halofilik Archaea üyeleri ticari olarak PHA üretiminde henüz kullanılmamakla birlikte bu amaç için kullanılmakta olan *Ralstonia eutropha*'ya göre avantajları vardır. *Haloferax mediterranei* nişasta gibi ucuz substratlar üzerinde geliştirilebilir. Saflaştırma işlemleri göreceli olarak daha basittir, hücreler suda kolayca lize olur. Organizmanın genomik stabilitesinin yüksek oluşu ve kontaminasyon riskinin düşük olması da diğer avantajlardır. Şeker (glukoz ve nişasta) ve düşük fosfat konsantrasyonu içeren ortamlarda gelişim sonucu PHA üretimi maksimumdur (Dworkin ve ark., 2006(a)).

Lipozomlar, bileşimin, vücudun spesifik hedef bölgesine transportu için ilaç ve kozmetiklerde kullanılmaktadır. Halofilik Archaea'nın eter-bağlı lipidleri yüksek kimyasal stabiliteye ve esterazlara karşı dirence sahiptir ve fatty acid temelli lipozomlara nazaran daha yüksek hayatta kalım oranına sahiptir (Margesin ve Schinner, 2001).

1.4.Mikrobiyal Kommünite Analizleri

1.4.1. Amplifiye edilmiş rDNA restriksiyon analizi (ARDRA)

ARDRA tekniği ilk olarak insan patojenlerini tanımlama amacıyla geliştirilmiştir (Vaneechoutte ve ark., 1995).

Bu metod, mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında DNA polimorfizmine dayanan RFLP (restriction fragment-length polymorphism) analizinin bir uzantısıdır. ARDRA uygulamasında, evrensel ya da cins-spesifik primerler kullanılarak 16S rRNA geni PCR ile çoğaltılır. Amplikonlar restriksiyon endonükleazlar ile parçalanır ve yüksek konsantrasyonda agaroz ya da poliakrilamid jelde fragmentlerin ayrımı sağlanmaktadır. Oluşan fragment

profiller, bir komünitedeki grupları ya da ırk tiplendirilmesi için kullanılmaktadır (Sklarz ve ark., 2011).

ARDRA klonlar ya da izole edilen ırklar için kullanılabilir. Bununla birlikte, klonların ARDRA analizinde en az dört tetramerik restriksiyon endonükleaza ihtiyaç duyulmaktadır; aksi takdirde % 96 üzerindeki dizi benzerlikleri ayıramaz; bu durumda da tür bazında tanımlama gerçekleştirilememektedir (Sklarz ve ark., 2011).

1.4.2. Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmış gen fragmentlerinin denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE), mikrobiyal ekolojide kullanılan genetik parmak izi tekniklerinden biridir (Muyzer ve ark., 1993). Hedef gene yönelik tasarlanmış oligonükleotid primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılan aynı büyüklükte fakat farklı baz kompozisyonu ve dizisine sahip DNA fragmentlerinin denatürant varlığında elektroforetik ayırımına dayanır (Sanda ve ark., 2009).

Mikrobiyal komüniteden ekstrakte edilen DNA'dan 16S rRNA genine yönelik PCR kurulur. Elde edilen ampikonlar karışık PCR ürünleridir, fakat hepsi aynı büyüklüğe sahiptir dolayısıyla agaroz jel ile ayıramazlar. Bununla birlikte, bakteri rRNA'ları arasındaki dizi varyasyonları, bu DNA moleküllerine farklı melting özellikleri sağlar ve ayırım formamid, üre karışımı gibi DNA denatürantları içeren poliakrilamid jel ile gerçekleştirilebilir. PCR ürünleri jele çift zincirli moleküller olarak girer. Jelde ilerledikçe, artan denatürant konsantrasyonu ile birlikte farklı dizilere sahip PCR ürünlerinin melting özellikleri de farklı olacağından farklı pozisyonlarda göç ederler. Çift iplikli DNA'nın tamamıyla ayrılmasını önlemek amacıyla PCR esnasında GC-takılı primerler kullanılmaktadır (Schafer ve Muyzer, 2001).

DGGE gerçekleştirildiğinde, bantlar tek tek kesilip alınabilir ve dizileri belirlenebilmektedir. 16S rRNA genlerinin kullanımı, örneğin DGGE analizleri, bir habitatta var olan (farklı 16S rRNA genleri) filotip sayılarının detaylı bir tanımlanmasını sağlamaktadır. Bu bantların dizi analizleriyle, topluluk içinde var olan gerçek türler, uygun veri tabanlarında, bilinen türlerle uygun dizilerin karşılaştırılmasıyla tanımlanabilmektedir. Bir DGGE jel üzerinde elde edilen

bantların sayısı, verilen bir gen hakkında habitatın biyokompleksliliği hakkında bir ipucu vermektedir (Madigan ve Martinko, 2010).

1.4.3. Floresan in situ hibridizasyon (FISH)

Floresan in situ hibridizasyon (FISH), bir komünitedeki mikroorganizmaları kültür etmeden, rRNA-hedefli problarla muamele edip epifloresan mikroskop, konfokal mikroskop ya da flow sitometri aracılığıyla tanımlamaya yönelik bir yöntemdir (Pernthaler ve ark., 2001).

Nükleik asit spesifik floresan boyalar (DAPI, SYBR Gren I, Yo-Pro I gibi) kullanılarak sucul ekosistemlerdeki virüslerin ve bakterilerin saptanması ve sayımında kullanılır (Brussaard ve ark., 2009). Floresan boyalar, yaygın şekilde ışık geçirmez ortamlardaki mikroorganizmaları boyamak için kullanılmaktadır. DAPI (4',6-diamido-2-fenilindol) bu amaç için yaygın kullanılan bir boyadır. DAPI ile boyanmış hücreler parlak mavi floresan verir ve sayma da kolaydır. Örneğe bağlı olarak, nonspesifik olarak arka zemini boyama genellikle floresan boyalarla yapılan boyamada bir problem olabilir, ancak nükleik asitleri boyayan DAPI inert maddelerle büyük oranda reaksiyon vermez. Bu nedenle; su, toprak gibi birçok örnek için, DAPI boyama, var olan hücre sayısı hakkında uygun bir tahmin verebilir. Seyreltik su numuneleri için, sıvının belli bir hacminin filtrelenmesinden sonra filtrenin yüzeyinde hücreler boyanabilirler. Alternatif olarak, hücreler, santrifüj edilerek konsantre edilebilir. Öte yandan, DAPI benzeri boyama teknikleri, spesifik olmama avantajına sahiptir: Bir örnek içindeki bütün mikroorganizmalar DAPI ile boyanırlar. Ancak, diğer yandan, DAPI, canlı ve ölü hücreler arasındaki veya farklı hücreler arasındaki farklılığı ortaya çıkaramaz ve böylelikle bir çevre de bulunan spesifik organizmaları işaretleyemezler (Madigan ve Martinko, 2010).

Filogenetik boyalar, 16S (prokaryot) veya 18S (ökaryot) ribozomal RNA'nın sinyal dizilerine komplementer baz dizisine sahip floresan ışık veren oligonukleotidlerdir. Filogenetik boyalar, hücre içine nüfuz ederek ve ribozomlardaki ribozomal RNA ile direk olarak hibridize olarak çalışmaktadırlar. Filogenetik problar organizmaların tüm domainleri için olduğu kadar, bireysel mikrobiyal türler için de tasarlanabileceği için bir filogenetik boyanın özgülük derecesi probun dizisi ile kontrol edilmelidir (Madigan ve Martinko, 2010).

2.MATERYAL ve YÖNTEM

2.1.Materyal

2.1.1.Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

2.1.1.1.30 % (w/v) Konsantre Tuzlu Su Stok Solusyonu

<u>TUZ</u>	<u>g/L</u>
NaCl	240
MgCl ₂ .6H ₂ O	30
MgSO ₄ .7H ₂ O	35
KCl	7
NaBr	0.8
HNaCO ₃	0.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.5

Çözününceye kadar karıştırılır, sonra pH'Sı 1M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanır. Distile su ile 1000ml'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanır (Dyall-Smith, 2009).

2.1.1.2. %25 Deniz Suyu (SW)

<u>TUZ</u>	<u>g/L</u>
NaBr	0.65
HNaCO ₃	0.167
KCl	5.0
CaCl ₂	0.723
MgSO ₄ .7H ₂ O	49.492
MgCl ₂ .6H ₂ O	34.567
NaCl	195

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

2.1.1.3. TAE 50X (Litre)

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

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

2.1.1.4. TBE 5X

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

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

2.1.1.5. PBS 10X

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

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

2.1.1.6. Lizozim Solüsyonu (10 mg/ml)

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

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

2.1.1.7. %80'lik DGGE Stok Solusyonu

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

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

2.1.1.8. %0'lık DGGE Stok Solusyonu

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

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

2.1.1.9. %10 Amonyum persülfat Solusyonu

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

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

2.1.1.10. %10 SDS Solusyonu

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

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

2.1.1.11. In situ hibridizasyon Tamponu

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

Hazırlanıp buz üzerinde korunur (Anton, 1999).

2.1.1.12. FISH için Yıkama Tamponu

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

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

2.1.2.Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.2.1. %12 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

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

Çözününceye kadar karıştırılır, sonra pH'ı 1M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanır. Distile su ile 1000ml'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanır (Dyall-Smith, 2009).

2.1.2.2. %18 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

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

Çözününceye kadar karıştırılır, sonra pH'ı 1M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanır. Distile su ile 1000ml'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanır (Dyall-Smith, 2009).

2.1.2.3. %23 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

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

Çözününceye kadar karıştırılır, sonra pH'ı 1M Tris-Base ile 7.5'e ayarlanır. Distile su ile 1000ml'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanır (Dyall-Smith, 2009).

2.1.2.4. Medyum E

NaCl.....	125 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	160 g
K ₂ SO ₄	5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.1 g
Maya Ekstraktı.....	1 g
Casamino acid.....	1 g
Nişasta.....	2 g
Distile Su.....	1 L

pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Oren, 1999 b).

2.1.2.5. %25 Seawater Medyum

NaBr.....	0.65g
HNaCO ₃	0.167g
KCl.....	5.0g
CaCl ₂	0.723g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	49.492g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	34.567g
NaCl.....	195g
Distile Su.....	1 L

pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Anton ve ark., 2002).

2.1.2.6. Medyum DBCM2 (*Haloquadratum walsbyi* için besiyeri)

Otoklavlanmış 1L % 25 deniz suyuna (SW) aşağıdaki filtre ile sterilize edilmiş solusyonlar belirtilen hacimlerde eklenir.

1 M Tris.Cl, pH 7.4.....	10 ml
1 M NH ₄ Cl, (53.4g/L).....	5 ml
K ₂ HPO ₄ buffer, pH 7.4.....	2 ml
SL10 Trace Elementleri.....	1 ml
Vit10 vitamin solusyonu.....	3 ml

Karbon kaynağı olarak ~10 mM pirüvat kullanılır. pH 7'ye ayarlanır.

Trace element solüsyonu SL10

Trace element solüsyonu SL10 bileşenleri sırasıyla çözündürülür (Widdel ve ark., 1983).

%25 HCl.....	10 ml
FeCl ₂ ·4H ₂ O.....	1.5 g
H ₂ O.....	1.0 L
CoCl ₂ ·6H ₂ O.....	190 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O.....	100 mg
ZnCl ₂	70 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O.....	36 mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O.....	24 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O.....	2 mg

Vitamin 10 stok solusyonu

H ₂ O.....	1000 ml
4-aminobenzoate.....	13 mg
d-(+)-biotin.....	3 mg
nicotinic acid.....	33 mg
hemicalcium D-(+)-pantothenate.....	17 mg
pyridoxamine hydrochloride.....	50 mg
thiamine chloride hydrochloride.....	33 mg
cyanocobalamin.....	17 mg
D,L-6,8-thioctic acid.....	10 mg
Riboflavin.....	10 mg
folic acid.....	4 mg

Vitamin 10 solüsyonu 0.2 µm por-çaplı selüloz asetat filtre ile steril edilir.

Alüminyum folyoya sarılarak 4°C’de saklanır (Dyall-Smith, 2009).

K₂HPO₄ buffer

30 ml 0.5 M KH₂PO₄ solüsyonu ile 100 ml 0.5 M K₂HPO₄ karıştırılır; daha sonra ikinci solüsyondan, 2ml hacimde, yavaşça pH yaklaşık 7.5 olana kadar eklenir. 101kPa'da 15 dakika otoklavlanır. Oda sıcaklığında saklanır (Dyall-Smith, 2009).

2.1.2.7. Medyum DSMZ (*Salinibacter ruber* için besiyeri)

NaCl.....	195 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	16.3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	25 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	1.25 g
KCl.....	5 g
NaHCO ₃	0.25 g
NaBr.....	0.62 g
Maya Ekstraktı.....	1 g
Distile Su.....	1 L

pH 6.8-7.2 dolaylarında NaOH ile ayarlanıp otoklavlanır (Dyall-Smith, 2009).

2.1.2.8. Medyum D

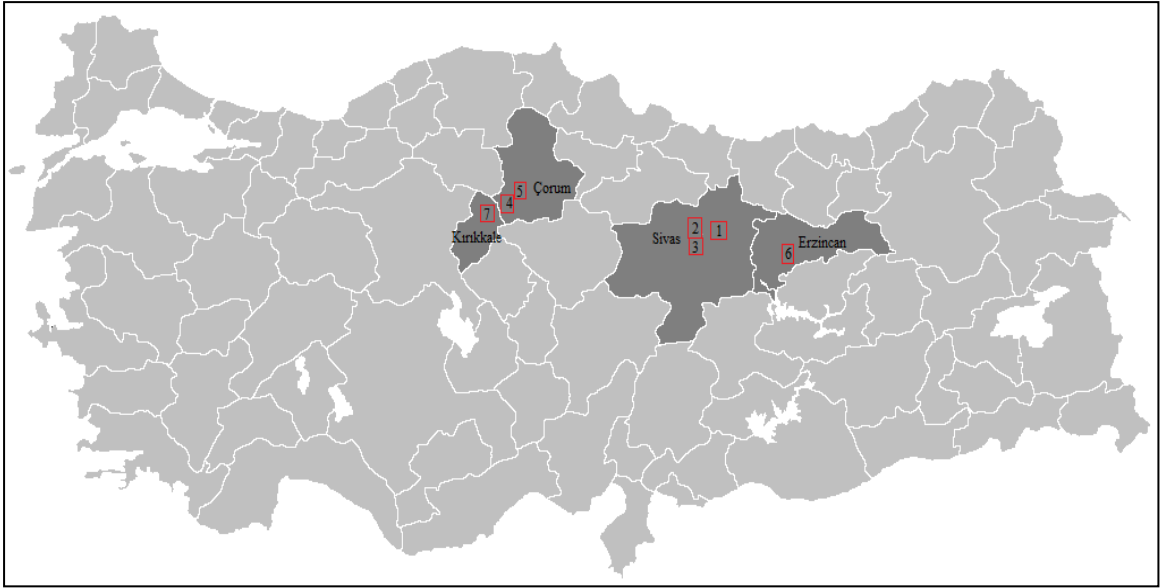
NaCl.....	.206 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.5 g
Maya Ekstraktı.....	5 g
KCl.....	0.37g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	36 g
MnCl ₂	0.013 g
Distile Su	1 L

pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Oren, 1999 b).

2.2.Yöntem

2.2.1. Çalışma Alanları

Çalışma alanları olarak, Çorum Akçakoyunlu ve Sungurlu, Kırıkkale Delice, Erzincan Kemah, Sivas Zara, Fadlum ve Bingöl (Şekil 2.2) kaynak tuzlaları seçilmiştir. Bu bölgelerin birçoğundan hem kaynak hem de havuz kısımlarından örnekleme yapılmıştır (Şekil 2.1). Yapılan her örneklemede en az 1 litre su örneği alınmış ve örnekler en kısa sürede laboratuvara getirilerek analizlerine başlanmıştır.



Şekil 2.1.Örnekleme Bölgeleri [1)Sivas Zara Tuzlagözü Tuzlası; 2)Sivas Bingöl Tuzlası; 3)Sivas Tepeönü Fadlum Tuzlası; 4)Çorum Akçakoyunlu Tuzlası; 5)Çorum Sungurlu Tuzlası; 6)Erzincan Kemah Tuzlası; 7)Kırıkkale Delice Tuzlası]



Şekil 2.2. Tuzlagözü Tuzlası'ndan bir görünüm (Sivas)

2.2.2. Örneklerin Toplam Tuzluluk, İyonik Kompozisyon ve pH Değerlerinin Belirlenmesi

Örneklerin toplam tuzluluk değerlerinin belirlenmesi amacıyla el refraktometresi (Eclipse), iyonik kompozisyonunu (Na^+ , Mg^{+2} , K^+ , Mn^{+2} , Ca^{+2}) belirleme amaçlı ICP (Perkin Elmer Optical Emission Spectrometer Optima 4300 DV) cihazı ve pH değerlerinin belirlenmesi pH ölçüm cihazı (Thermo Orion 420 AT) kullanılmıştır.

2.2.3. Kültür Bağımlı Testler

2.2.3.1. Su Örneklerinden Archaea ve Bacteria İzolasyonu ve Kültüre Alınmaları

Su örneklerinden 1'er ml alınıp %12 MGM, %18 MGM, %23 MGM, Medyum E, %25 Seawater Medyum, DBCM2 Medyum ve DSMZ Medyum sıvı besiyerlerine; yine su örneklerinden 1'er ml alınıp %12 MGM, %18 MGM, %23 MGM, Medyum E, %25 Seawater Medyum katı besiyerlerine ekim yapılmıştır. Besiyerleri 37°C'de inkübe edilmiştir. Bir aylık inkübasyon sonrasında oluşan kolonilerden tekrar ekim yapılarak saf kültür haline getirilmiştir (Dyall-Smith, 2009; Anton ve ark., 2000). Çalışma sırasında saf halde edilen kültürler %15'lik gliserol stokları içerisinde -85 °C'de muhafaza edilmektedirler. Tüm örnekler için ekimler üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.2. İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu Tuz Miktarının Belirlenmesi

İzolatlar, %2, %6, %12, %18, %23 ve %25'lik tuz içeren besiyerlerine ekilmiş ve 37°C'de inkübasyon sonrası gelişme durumları incelenmiştir (Anton ve ark., 2002).

2.2.3.3. İzolatların Nükleik Asit Analizine Dayalı Testler

16S rRNA Geni Amplifikasyonu için İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu

Tek koloni olarak düşürülen mikroorganizmalardan örnek alınıp 200 µl steril distile su çözündürülüp 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüjün ardından süpernatant kısmı yeni bir steril tübe aktararak, PCR için buradan 3-5 µl kalıp olarak kullanılmak üzere, -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir (Anton ve ark., 1999; Dyall- Smith, 2004).

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

Koloni morfolojisi olarak farklılık gösteren izolatlar seçilmiş, *Archaea* ve *Bacteria* spesifik primerler kullanılarak, bunların 16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, 50 µl hacimde son konsantrasyonları 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 200 µM deoksinükleotidtrifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.2 µM primerler, 1 unite Taq DNA polimeraz enzimi ve 3-5 µl template DNA olacak şekilde reaksiyonlar kurulmuştur. 16S rRNA geni amplifikasyonlarında *Bacteria* için 27F, *Archaea* için 21F ve her ikisi için 1492R primeri dizilimindeki primerler kullanılmıştır. Kullanılan primerler ile ilgili bilgiler Tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tüm çalışmalar boyunca hem pozitif hem de negatif kontrol reaksiyonları hazırlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %1’lik agaroz jellerde gözlenmişlerdir (Anton ve ark., 1999).

Reaksiyonlar için Techne (Tc-5000) Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. *Archaea* ve *Bacteria* üyelerinin 16S rRNA genlerinin amplifikasyonları için uygulanan reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir;

Tablo 2.1. 16S rRNA genlerinin amplifikasyonları için kullanılan PCR koşulları

94°C	3 dak.	(1 Döngü)
94°C	30 sn.	
50°C	1 dak.	(30 Döngü)
72°C	2 dak.	
72°C	10 dak.	(1 Döngü)

Amplifiye edilmiş rDNA restriksiyon analizi (ARDRA)

İzolatlardan elde edilen 16S rRNA geni PCR ürünleri, *HinfI* (Fermentas) ve *MboI* (Fermentas) restriksiyon enzimleri kullanılarak kesime uğratılmıştır.

Kesim Reaksiyonu Bileşenleri

PCR ürünü	10 µl
Buffer	2 µl
Enzim	1 µl
<u>dH₂O</u>	<u>7 µl</u>
Toplam	20 µl

Kesim reaksiyonu bileşenleri bir gece 37°C’de su banyosunda bekletilmiştir. Kesime uğratılmış PCR ürünleri, 1X TBE tamponu ile hazırlanmış %2’lik agaroz jele yüklenmiştir. Örnekler, 60V akım uygulanarak 3 saat jelde yürütülmüştür. 1kb Plus DNA Ladder (Fisher BioReagents) marker olarak kullanılmıştır. Tüm jellerde DNA’nın gözlenebilmesi amacıyla jeller, 0.5 µg/µl konsantrasyonlu etidyum bromid solusyonları içinde 15 dakika bekletildikten sonra 10 dakika kadar da distile su içerisinde tutulmuştur. Jel fotoğrafları Uvitec Jel Dökümantasyon sistemi ile elde edilmiştir. Dizileme işlemi için her farklı profilden bir temsilci seçilmiştir.

PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Saflaştırma için PCR ürünleri %1’lik agaroz jele yüklenmiştir. Uygun büyüklükteki (1500bp) bantlar jelden kesilip özel saflaştırma kiti (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up SYSTEM; PROMEGA) ile saflaştırılmıştır. Jelden kesilen agaroz parçaları tartılarak, bunların üzerine her 10 mg için 10µl olmak üzere “membrane binding buffer” eklenmiştir. Tüp hafifçe vorteksenerek karıştırıldıktan sonra 60°C’de 5-15 dakika (agaroz tamamen eriyinceye kadar) su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda kolon “toplama tüpü” içine yerleştirilmiş ve su banyosundan çıkarılan örnek kolona konarak 16000g’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde toplanan sıvı atılmış ve kolon yeniden tüpe yerleştirilerek üzerine 700 µl yıkama buffer eklenip tekrar 16000g’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde toplanan sıvı atılmış ve kolon yeniden tüpe yerleştirilerek üzerine 500 µl yıkama buffer eklenip tekrar 16000g’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde toplanan sıvı atılmış ve kolon yeniden

tüpe yerleştirilerek üzerine herhangi bir solusyon eklemekten 16000g’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü atılmış ve kolona yeni bir ependorfa yerleştirilerek üzerine 50 µl nükleaz-free su eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyondan sonra 16000g’ de 1 dakika santrifüjlenerek saflaştırılmış ürünler elde edilmiştir.

PCR Ürünlerinden Dizi Analizi

Kültür haline getirilmiş izolatlardan her farklı ARDRA profiline ait birer temsilci seçilerek DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA’nın 16S rRNA geni PCR ile amplifiye edilerek bu ürünlerin direk olarak dizi analizlerinin eldesi yoluna gidilmiştir. Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı ile bu elde edilen PCR ürünlerinin baz dizilerinin belirlenmesi amacıyla Beckman dizi analiz kitinde önerilen şartlar ile sonuçlar alınmıştır. Dizi analizleri sırasında her örnek için toplam reaksiyon hacmi 20 µl olarak ayarlanmıştır. 4-6 µl kalıp DNA (50 ng/µl) (analiz yapılacak DNA örneği), 1 µl (=5 pmol) primer (21F, 27F, 1492R, 907R, 341F, 344F ya da 518R), 12 µl premix (Mix *GenomeLab™ DTCS* Quick Start Kit / Beckman Coulter) ve 1-3 µl steril su ile hazırlanan her bir reaksiyon için kullanılan şartlar aşağıda verilmiştir:

Tablo 2.2. Dizi Analizi için PCR Koşulları

96°C	20 sn.	
50°C	20 sn.	(30 Döngü)
60°C	4 dak.	

Dizi analizi için kurulan PCR sonrası ürünlerin saflaştırılması gerekmektedir. 10 µl PCR ürünü üzerine 5,5 µl stop solusyonu eklenmiştir.

Stop Solusyonu Bileşenleri:

dH ₂ O	50 µl
NaAc (3M) (pH5.2)	20 µl
NaEDTA (100mM) (pH 8.0)	20 µl
Glikojen	10 µl

İçerik yeni ependorfa aktarılır ve üzerine 10 µl manyetik boncuk eklenir ve pipetle karıştırılmıştır. 55µl % 73'lük isopropanol eklenir. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası tüpler magnete yerleştirilmiştir. Manyetik boncuklar çepere tutunur. 5 dakika bekletildikten sonra isopropanol uzaklaştırılmıştır. 200µl % 73'lük isopropanol eklenip 3 dakika bekletildikten sonra isopropanol uzaklaştırılmıştır. İşlem tekrarlanmıştır. Tüpler oda sıcaklığında 10 dakika kurumaya bırakılmıştır. Üzerlerine 40µl SLS (sample loading solution; formamid içerir) eklenip pipetle karıştırılmıştır. Tüpler magnete yerleştirilip 5 dakika bekletilmiş ve sonra sıvı kısım alınıp plate'e aktarılmıştır. PCR ürünleri böylece saflaştırılmıştır ve sonraki aşamada dizileme gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.3.16S rRNA gen amplifikasyonunda kullanılan primerler

Primerler	Baz Dizilimi (5'-3')	Spesifisitesi	Referans
27F	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	<i>Bacteria</i>	(Lane, D.I.,1991)
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Universal	(Lane, D.J., 1991)
21F	TTC CGG TTG A TC CTG CCG GA	<i>Archaea</i>	(DeLong, E.F.1992)
785F	GGA TTA GAT ACC CTG GTA G	<i>Bacteria</i>	(Amman ve ark.,1995)
341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	<i>Bacteria</i>	(Muyzer ve ark., 1993)
518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Universal	(Muyzer ve ark., 1993)
344F	ACG GGG CGC AGC AGG CGC GA	<i>Archaea</i>	(Schafer ve Muyzer 2001)
907R	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	<i>Bacteria</i>	(Muyzer ve ark.,1993)
341F-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G CCT ACG GGA GGC AGC AG	<i>Bacteria</i>	(Muyzer ve ark. 1993)
907R-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	<i>Bacteria</i>	(Muyzer ve ark. 1993)
344F-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G ACG GGG CGC AGC AGG CGC GA	<i>Archaea</i>	(Schafer veMuyzer 2001)

16S rRNA Gen Dizilerinin Analizi

İzolatların ya da DGGE bantlarının 16S rRNA geni amplifikasyonlarından elde edilen ürünlerin dizi analizinden sonra elde edilen dizi bilgileri NCBI ("National Center for Biotechnology Information", (www.ncbi.nlm.nih.gov)

genbankasındaki verilerle BLAST (Altschul ve ark. 1997) programı üzerinden karşılaştırılarak bunların filogenetik benzerlik durumları ortaya konmuştur.

2.2.4.Moleküler Teknikler

2.2.4.1.Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için önce 100 ml su örneği 0.2 µm por çaplı membran filtreden (Millipore, Isopore GTTP04700) vakumlu filtrasyon sistem yardımı ile süzölmüş daha sonra ekstraksiyon işlemine kadar filtre -85 °C de muhafaza edilmiştir (Casamayor ve ark., 2002). DNA ekstraksiyonu Cifuentes ve ark. (2000) ve Nogales ve ark. (1999) a göre küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir:

Filtreler makasla küçük parçalar halinde kesilerek RNase içermeyen özel ependorf tüplere konduktan sonra bunların üzerine 600 µl ekstraksiyon tamponu eklenmiştir. Kısa bir santrifüjle parçaların dibine toplanmaları sağlanıp, 6 µl (3 mg/ml) lizozim eklendikten sonra 15 dakika 37 °C’de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Üzerine 9 µl proteinaz K (150 µg/ml) ve 60 µl %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenip, 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. 120 µl 5 M NaCl eklenerek tüp ters düz edilerek karıştırılmış ve 90 µl CTAB (%10 CTAB (Cetil Trimetil Ammonyum Bromid), 0.7 M NaCl) eklenip tekrar karıştırılmıştır. 10 dakika 65 °C’de su banyosunda inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası sıvı azot içinde 1-2 dakika bekletilerek dondurulmuş ve tekrar 65 °C’ye konulmuştur. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra, 900 µl Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) eklenip karıştırılmış ve 5 dakika 4 °C’de 13.000 rpm de santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı faz alındıktan sonra üzerine 1 hacim Fenol:Kloroform:İsoamilalkol eklenmiştir. Bu işleme protein ara fazı indirgeninceye kadar devam edilmiştir. 80 µl sodyum asetat (3M, pH 4.8) ve 480 µl isopropanol, 8 µl MgCl₂ (1M) eklendikten sonra, 30 dakika 13.000 rpm’de 4 °C’de santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine %70’lik alkol konmuş ve tekrar 15 dakika 13.000 rpm’de 4 °C’de santrifüj edilmiştir. Alkol pipetle uzaklaştırıldıktan sonra, pelet oda sıcaklığında kurutulmuş ve 50 µl dietilpirokarbonat (DEPC)’li su ile resüspanse edilerek, -85°C’de muhafaza edilmiştir (Sambrook ve ark., 1982; Casamayor ve ark., 2002).

2.2.4.2.Denatüre Edici Gradient Jel Elektrophorezi (DGGE)

16S rRNA Geninin DGGE Analizi için Amplifikasyonu

DGGE analizi için 16S rRNA geninin amplifikasyonu için “GC clamp” adı verilen yaklaşık 40 nükleotidlik bir diziyi 5’ uçlarında içeren özel primerler kullanılmıştır. Tablo 2.3’de bu primerler ile ilgili detaylar verilmiştir (Muyzer ve Ark., 1993). Archaeal 16S rRNA geni amplifikasyonları için 344F-GC ve 907R olarak adlandırılmış olan primerler, Bacteria örnekleri için de 341F-GC ve 907R primerleri kullanılmıştır. Her bir reaksiyonda kalıp DNA olarak filtrelerden yapılan DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen nükleik asitler kullanılmıştır.

Tablo.2.4. *Bacteria* grubu için DGGE-PCR koşulları

94 °C 5 dakika		
65 °C 1 dakika		
72 °C 3 dakika		1 Döngü
94 °C 1 dakika		
64 °C.....55°C 1 dakika (her döngüde primer bağlanma sıcaklığı 1 °C azaltılarak)		9 Döngü
72 °C 3 dakika		
94 °C 1 dakika		
55 °C 1 dakika		20 Döngü
72 °C 3 dakika		
94 °C 1 dakika		
55 °C 1 dakika		1 Döngü
72 °C 10 dakika		

Tablo.2.5. *Archaea* grubu için DGGE-PCR koşulları

94 °C 5 dakika	<u>1 döngü</u>
94 °C 30 saniye	
56 °C 45 saniye	<u>29 döngü</u>
72 °C 2 dakika	
72 °C 7 dakika	<u>1 döngü</u>
4 °C	∞

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

***Archaea* ve *Bacteria* Grubu 16S rRNA Ürünleri için DGGE**

Archaea ve *Bacteria* spesifik primerlerle filtrelerden elde edilmiş total çevresel DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı amplifikasyon reaksiyonlarıyla elde edilen ürünlerin analizi için denatüre edici gradient jel elektroforezi uygulanmıştır. %0'lık ve %80'lik DGGE stok solusyonları hazırlanmış ve gradient oluşturucu düzenek yardımıyla solusyonların gradient jeli oluşturacak şekilde karıştırılması sağlanmıştır. Jelin artan konsantrasyonda üre ve formamid gradientine sahip olması sağlanmıştır. *Archaea* ve *Bacteria* örneklerinin denatüre edici gradient jellerinde denatürant konsantrasyonu %40'dan %70'e kadar artacak şekilde ayarlanmıştır. Polimerize edici ajanlar da eklendikten sonra sistemde alt kısımda yer alan gradient jel ve bunun üzerine denatürant içermeyen yükleme jeli dökülmüş ve çukur oluşumunu sağlayan tarak bu jel içine yerleştirilerek polimerizasyon için en az 4 saat bekletilmiştir. Polimerizasyon sonrasında elektroforez tankı 1X TAE tamponu ile doldurulmuştur. 20 µl örnek, 5 µl jel yükleme boyası ile karıştırılarak çukurlara yüklenmiş ve tampon sıcaklığı 60 °C'ye ulaştığında sisteme 5 V/cm akım 1 gece boyunca uygulanmıştır. Elektroforez sonrasında jeller etidyum bromür solusyonu (1 µg/ml) ile 10 dakika boyandıktan sonra yaklaşık 15 dakika distile su içine yıkanmış ve transilluminatörde UV ışığı ile gözlenmiştir. Jellerde farklı konumlardaki bantlar UV ışığı altında steril bisturi yardımıyla jelden kesilerek steril ependorf tüpleri içine alınmışlardır. Bunların üzerine 20 µl mQ su eklenerek 1 gece 4 °C'de inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrası elüt edilmiş olan DNA, DGGE primerleri ile tekrar amplifiye edilmesi için kalıp olarak kullanılmıştır. Buradan elde edilen ürünler de tekrar saflaştırılarak dizi analizleri yapılmıştır (Muyzer ve ark., 1996).

Agaroz Jel Elektroforezleri

Nükleik asitlerin filtrelerden ekstraksiyonunu, DGGE-PCR ve DGGE sonrası Re-PCR ya da 16S rRNA genlerinin PCR ile amplifikasyonundan sonra bunların elektroforez işlemleri için 1X lik TAE buffer içindeki 5V/cm² akım uygulanan %1'lik agaroz jeller kullanılmıştır. Jellerde 1Kb Plus Ladder Marker, (Fermentas) ve 1kb Plus DNA Ladder (Fisher BioReagents) marker olarak kullanılmıştır. Çukurlara 5 µl örnek ve 1 µl jel yükleme boyası olacak şekilde yükleme yapılmıştır.

2.2.4.3.Fluoresan in situ Hibridizasyon (FISH)

Fiksasyon

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

Hibridizasyon

Hibridizasyon için hazırlanan filtrelerden bir parça kesilip üzerine 2 µl prob ve 18 µl hibridizasyon tamponu içeren karışımdan eklenmiştir. Her bir prob 50 ng/µl konsantrasyonda kullanılmıştır. Lam üzerine konulan filtreler tüpler içerisinde yatay bir şekilde hibridizasyon fırınında 46°C'de 2 saat bekletilmiştir. Filtreler 48°C su banyosunda beklemekte olan yıkama tamponu içerisine aktararak 15 dakika bekletilmiş ve fazla prob kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Filtreler kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan filtreler 20 µl DAPI (1 µg/ml) (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) ile muamele edilmiştir. Filtreler, oda sıcaklığında beş dakika bekletildikten sonra %70 lik alkol ve ardından distile su ile onar saniye kadar muamele edilmiştir. Kurutma kağıdı üzerinde kurutulan filtreler lam üzerine alınmış ve üzerlerine Citifluor damlatılmıştır. Fluoresan mikroskopunda incelemeye alınmıştır (Amann ve ark., 1995; Anton ve ark., 1999; Aman ve ark., 2000).

Kullanılan *Archaea* ve *Bacteria* domainine spesifik problar Tablo 2.6'da verilmiştir.

Tablo 2.6. Çalışmada Kullanılan FISH Probları

Adı	Dizisi (5' > 3')	Formamid %'si	Probun Spesifisitesi	Referans
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35	Bacteria	(Amann ve ark.,1990)
Arc 915	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	20	Archaea	(Amann ve ark.,1995)

3.BULGULAR

3.1. Çalışma Alanları

Çalışma alanları olarak belirtilen bölgelerden örnekleme yapılmıştır.

3.2. Örneklerin Toplam Tuzluluk, İyonik Kompozisyon ve pH Değerlerinin Belirlenmesi

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

Tablo 3.1. Örneklerin Ölçülen Toplam Tuzluluk ve pH Değerleri

Çalışma Alanları	Örnekleme Zamanı	Toplam Tuzluluk (% NaCl)	pH
Çorum Sarıkaya Köyü Sungurlu	Nisan 2011	25	7.41
Kırıkkale Delice	Ağustos 2011	20	7.64
Erzincan Kemah Kaynak	Ağustos 2011	18	6.92
Erzincan Kemah Havuz	Ağustos 2011	27	6.12
Siva Zara Tuzlagözü	Ağustos 2011	27	7.28
Çorum Akçakoyunlu Kristalize	Haziran 2012	27	7.27
Kırıkkale Delice	Haziran 2012	14	7.57
Siva Zara Tuzlagözü Havuz	Haziran 2012	20	7.61
Siva Zara Tuzlagözü Kaynak	Haziran 2012	19	7.76
Siva Zara Tuzlagözü Kaynak Oluk	Haziran 2012	14	7.78
Bingöl Dinlenme	Haziran 2012	25	7.13
Bingöl Kaynak	Haziran 2012	25	7.51
Sivas Fadlum Tepeönü Kaynak	Haziran 2012	25	7.73
Sivas Fadlum Tepeönü Kristalize	Haziran 2012	27	7.31
Sivas Fadlum Tepeönü Dinlenme	Haziran 2012	26	7.23

Su örneklerinin yapılan ölçümler sonucu iyonik kompozisyonları (Na^+ , Mg^{+2} , K^+ , Mn^{+2} , Ca^{+2}) Tablo 3.2’de verildiği şekilde belirlenmiştir.

Tablo 3.2. Örneklerin İyonik Kompozisyonları

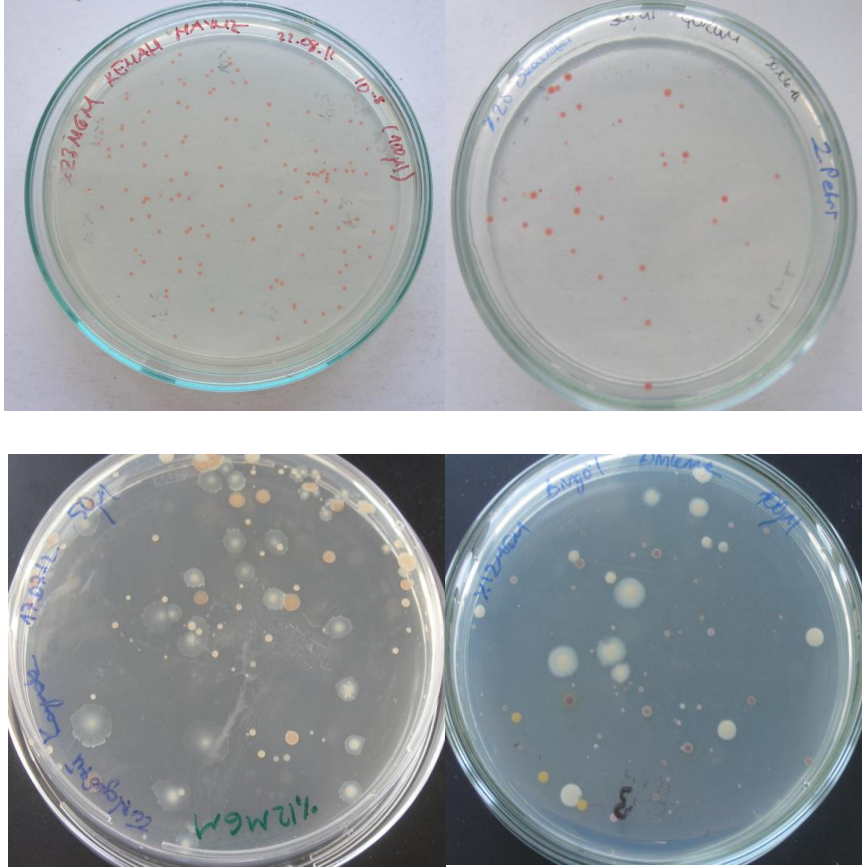
1.Örnekleme (2011)					
	Na ⁺ ,(ppm)	K ⁺ ,(ppm)	Ca ⁺² ,(ppm)	Mg ⁺² ,(ppm)	Mn ⁺² ,(ppb)
Çorum Sarıkaya Sungurlu	31.06x1000	84.54 x10	10.40 x10	78.79	127.9
Erzincan Kemah-Kaynak	59.08x1000	11.49x200	3.366 x200	80.09	38.92
Erzincan Kemah-Havuz	88.21x1000	24.28x200	44.07	8.180x200	63.64
Kırıkkale Delice	57.96x1000	15.98x200	3.265 x200	22.05	<10
Sivas Zara Tuzlagözü	66.56x1000	18.17x200	2 x200	54.06	<10

2.Örnekleme (2012)					
	Na ⁺ , (g/L)	K ⁺ , (mg/L)	Ca ⁺² , (mg/L)	Mg ⁺² , (mg/L)	Mn ⁺² , (µg/L)
Çorum Akçakoyunlu Kristalize	1506	93.41	90.41	55.42	965.6
Kırıkkale Delice	3648	73.43	168.8	19.55	914 µ
Sivas Zara Tuzlagözü Havuz	509.2	134.4	96.21	20.78	<
Sivas Zara Tuzlagözü Kaynak	526.7	137.1	96.83	21.15	420.2
Sivas Zara Tuzlagözü Kaynak Oluk	518.2	126.3	96.84	20.92	1362
Sivas Tepeönü Fadlum Dinlenme Havuzu	565.5	68.07	67.94	26.79	435.9
Sivas Tepeönü Fadlum Kristalize	4977.5	185.5	84.55	65.18	490.3
Sivas Tepeönü Fadlum Kaynak	340	61.43	101.5	37.63	522.6
Sivas Bingöl Tuzlası Dinlenme Havuzu	814	53.76	33.68	38.49	1214
Sivas Bingöl Tuzlası Kaynak	514.5	74.09	74.48	34.21	483.6

3.3.Kültür Bağımlı Testler

3.3.1.Su Örneklerinden *Archaea* ve *Bacteria* İzolasyonu ve Kültüre Alınmaları

Su örneklerinden belirtildiği şekilde ekim yapılmış ve gelişim için inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.1. İnkübasyon sonrası farklı örneklere ait petri fotoğrafları

3.3.2. İzolatların Optimum Büyüme İçin İhtiyaç Duyduğu Tuz Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen tüm izolatların değil, sadece ARDRA analizinden sonra belirlenen her farklı profilden seçilen birer temsilci izolatın gelişim gösterdiği tuz konsantrasyonu aralığı belirlenmiştir(Tablo 3.3 ve 3.4)

Tablo 3.3. *Bacteria*'ya Ait Temsilci İzolatların Gelişim Gösterdiği Tuz Konsantrasyonu Aralıkları

ARDRA Profili	Koloni Rengi	Gelişim Gösterdiği Tuz Konsantrasyonu Aralığı
Profil Bacteria1	Krem	% 2-23
Profil Bacteria2	Pembe	%18-23
Profil Bacteria3	Kahverengi	%6-12
Profil Bacteria4	Krem	% 6
Profil Bacteria5	Krem	%12
Profil Bacteria6	Kahverengi	%6-18
Profil Bacteria7	Krem	% 12-25
Profil Bacteria8	Krem	% 18
Profil Bacteria9	Krem	%2-18
Profil Bacteria10	Krem	% 18
Profil Bacteria11	Krem	% 12-18
Profil Bacteria12	Krem	% 12
Profil Bacteria13	Krem	% 12-18
Profil Bacteria14	Krem	% 2-23
Profil Bacteria15	Krem	% 2-18
Profil Bacteria16	Krem	% 2
Profil Bacteria17	Krem	% 12-23
Profil Bacteria18	Krem	% 2-18
Profil Bacteria19	Krem	% 6-18
Profil Bacteria20	Krem	%12
Profil Bacteria21	Krem	% 2-23
Profil Bacteria22	Krem	% 18
Profil Bacteria23	Krem	% 23
Profil Bacteria24	Krem	% 18-23
Profil Bacteria25	Krem	% 23
Profil Bacteria26	Krem	% 23-25

Profil Bacteria27	Krem	% 12-18
Profil Bacteria28	Krem	% 18
Profil Bacteria29	Krem	% 18
Profil Bacteria30	Krem	% 23
Profil Bacteria31	Krem	% 6-12
Profil Bacteria32	Krem	% 6
Profil Bacteria33	Krem	% 23
Profil Bacteria34	Açık kahverengi	% 12
Profil Bacteria35	Turuncu	% 18
Profil Bacteria36	Sarı	% 12

Tablo 3.4. *Archaea*'ya Ait Temsilci İzolatların Gelişim Gösterdiği Tuz Konsantrasyonu Aralıkları

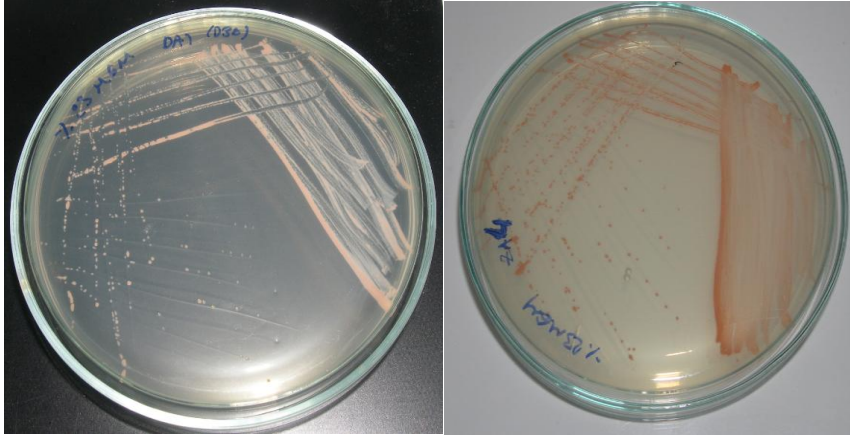
ARDRA Profili	Koloni Rengi	Gelişim Gösterdiği Tuz Konsantrasyonu Aralığı
Profil Archaea1	Kırmızı	% 12-23
Profil Archaea2	Kırmızı	%18-25
Profil Archaea3	Kırmızı	%18-25
Profil Archaea4	Pembe	% 23
Profil Archaea5	Kırmızı	% 23
Profil Archaea6	Pembe	% 18- 25
Profil Archaea7	Kırmızı-pembe	% 25
Profil Archaea8	Açık pembe	% 18

İki ayrı örneklemeden toplam 397 izolat elde edilmiş ve analize alınmıştır.

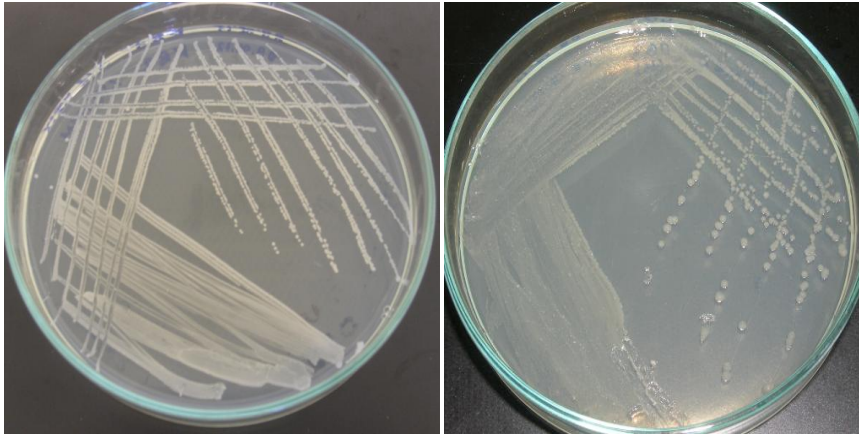
İlk örnekleme ait Çorum, Sungurlu bölgesinden 117 örnek; Sivas, Zara, Tuzlagözü bölgesinden 75; Kırıkkale, Delice bölgesinden 36; Erzincan, Kemah Havuz bölgesinden 11; Erzincan, Kemah Kaynak bölgesinden 42 örnek; toplamda 281 izolat elde edilmiştir.

İkinci örnekleme ait Çorum Akçakoyunlu Kristalize bölgesinden 19; Sivas, Tuzlagözü Kaynak ve Kaynak Oluk bölgesinden 34; Sivas, Tuzlagözü

Havuz bölgesinden 8; Sivas, Bingöl Dinlenme Havuz bölgesinden 27; Sivas Bingöl Kristalize bölgesinden 17; Sivas Tepeönü Fadlum Dinlenme Havuz bölgesinden 2; Sivas Tepeönü Fadlum Kaynak bölgesinden 9; toplamda 116 izolat elde edilmiştir.



Şekil.3.2. Farklı Archaea izolatlarının agarlı besiyeri üzerindeki görünüşleri (D.A1 kodlu izolat) ve (Z.A4 kodlu izolat)



Şekil.3.3. Farklı Bacteria izolatlarının agarlı besiyeri üzerindeki görünüşleri (K.B2 kodlu izolat) ve (D1.B5 kodlu izolat)

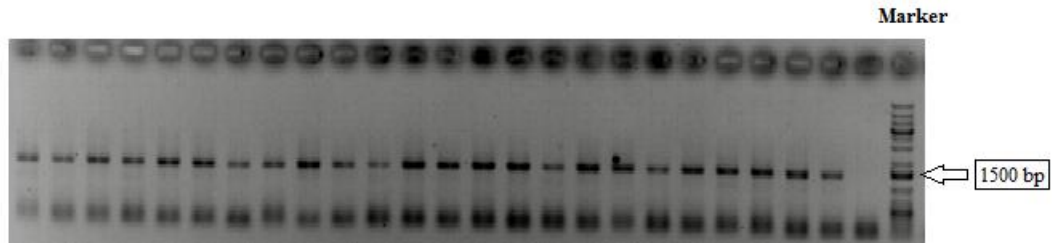
3.3.3. İzolatların Nükleik Asit Analizine Dayalı Testler

16S rRNA Geni Amplifikasyonu için İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada farklı kaynak tuzlarından izole edilen mikroorganizmaların 16S rRNA geni amplifikasyonları için kullanılan distile su içinde homojenizasyon sonrası kaynatma esasına dayanan yöntemin DNA ekstraksiyonu için yeterli olduğu görülmüştür.

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

İzolatların 16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu ve bu sayede *Archaea* üyesi mi yoksa *Bacteria* üyesi mi olduklarının tespiti için yapılan PCR lar sonrası elde edilen ürünler %1'lik agaroz jellerde yürütülmüşlerdir.



Şekil.3.4. 16S rRNA geni PCR ürünleri temsili bir jel görüntüsü (GeneRuler 1Kb Plus Ladder Marker, Fermentas)

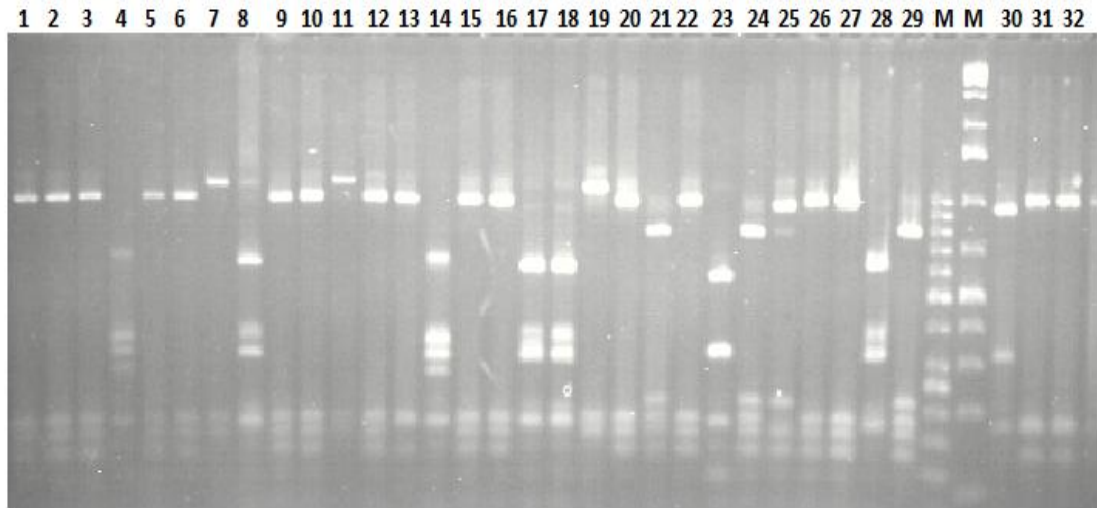
İzolatlara Ait 16S rRNA Geni Amplifikasyonu Ürünlerinin Enzimatik Kesimi (ARDRA)

Farklı tuz konsantrasyonları içeren besiyerlerinde gelişen mikroorganizmalardan birçoğunun, 16S rRNA geni için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri için *Hinf* I ve *Mbo* I enzimleri (Fermentas) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon kesimleri sonrası %2 lik agaroz jele yüklenerek yürütülmüş olan jellerden bazıları aşağıda gösterilmiştir.

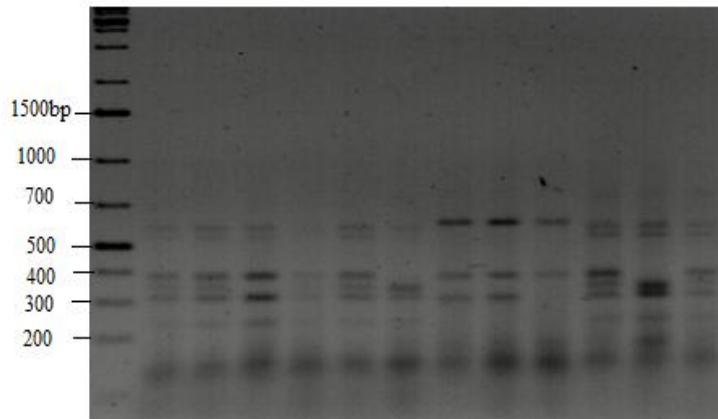
İki ayrı örneklemeden toplam 397 izolat elde edilmiş ve hepsi analize alınmıştır.

8'i *Archaea* ve 36'sı *Bacteria*'ya ait olmak üzere toplam 44 farklı profil belirlenmiştir (Tablo 3.5 ve 3.6). Aynı ARDRA profilini veren izolatların, izole edildiği bölgerin her birinden ikişer örnek seçilerek stok hazırlanmıştır. Bu seçilen izolatlar %15'lik gliserol stokları içerisinde -85 °C'de muhafaza edilmektedir.

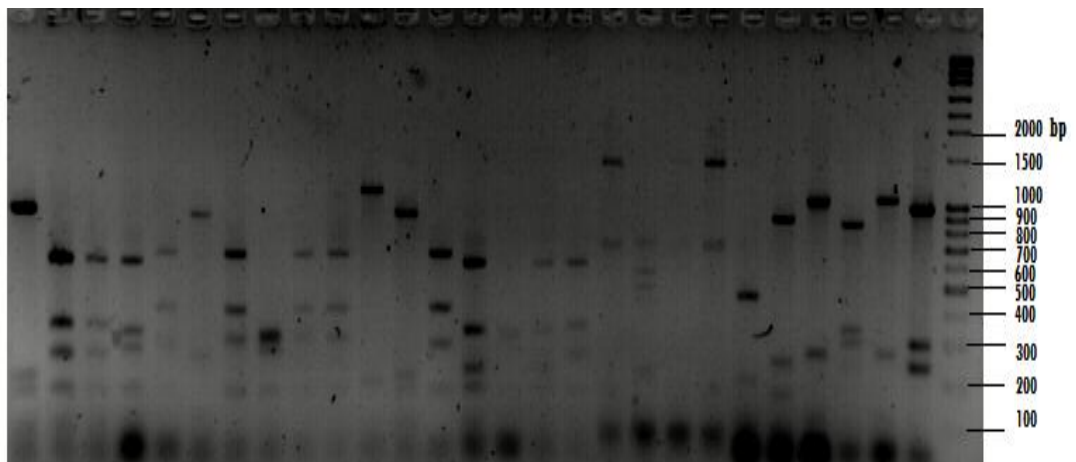
Aynı ARDRA profili veren izolatlardan birer temsilci seçilmiştir. Seçilen 44 farklı temsilci profilden 28 tanesinin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Seçilen 28 örnekten kalıp hazırlanmış ve 16S rRNA geni PCR ile amplifiye edilerek bu ürünlerin direkt olarak dizi analizlerinin eldesi yoluna gidilmiştir.



Şekil.3.5. *HinfI* enzimi ile kesimi yapılmış *Bacteria* örneklerine ait temsili bir jel görüntüsü
(GeneRuler 1Kb Plus Ladder Marker, Fermentas; M, Marker)



Şekil.3.6. *HinfI* enzimi ile kesimi yapılmış *Archaea* örneklerine ait temsili bir jel görüntüsü
(GeneRuler 1Kb Plus Ladder Marker, Fermentas)

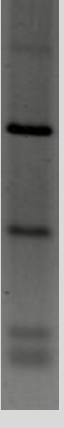


Şekil.3.7. *MboI* enzimi ile kesimi yapılmış *Bacteria* ve *Archaea* örneklerine ait temsili bir jel görüntüsü(Marker; 1kb Plus DNA Ladder, Fisher BioReagents)

Tablo 3.5. *Bacteria* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Bacteria* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyerleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

ARDRA Profilleri	Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip <i>Bacteria</i> İzolatları			
	İzole Edilen Bölgeler	Analiz Edilen İzolat Sayısı	Geliştiği Besiyerleri	Jel Görüntüsü
Profil Bacteria 1	Sungurlu	27	%18MGM,%23MGM,%12MGM	
	Tuzlagözü.1	22	%18MGM,% 23MGM,%12MGM	
	Delice.1	4	% 23MGM	
	Kemah Havuz	1	%18MGM	
	Kemah Kaynak	32	% 23MGM	
	Akçakoyunlu	8	%18MGM,% 23MGM	
	Tuzlagözü.2 Kaynak	4	%2MGM, %6MGM	
	Bingöl Dinlenme	2	%12MGM, %23MGM	
	Delice.2	2	%23MGM	
	Bingöl Kaynak	1	%18MGM	
Profil Bacteria 2	Sungurlu	7	%18MGM,%23MGM,S.ruber besiyeri	
	Bingöl Dinlenme	1	%18MGM	
Profil Bacteria 3	Sungurlu	17	%12MGM, %6MGM	
	Tuzlagözü.1	1	%12MGM	

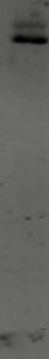
Tablo 3.5. (Devam). *Bacteria* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Bacteria* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

Profil Bacteria 4	Sungurlu	2	%6MGM	
	Tuzlagözü.1	1	%12MGM	
Profil Bacteria 5	Tuzlagözü.1	1	%12MGM	
Profil Bacteria 6	Tuzlagözü.1	1	%12MGM	
	Bingöl Dinlenme	2	%6MGM, %12MGM	
	Akçakoyunlu	1	%12MGM	
	Fadlum Kristalize	2	%18MGM	
Profil Bacteria 7	Kemah Kaynak	10	%18MGM,% 23MGM	
	Delice.1	15	%12MGM ,%18MGM, % 23MGM, %25 Seawater	

Tablo 3.5. (Devam). *Bacteria* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Bacteria* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

Profil Bacteria 8	Delice.1	3	%18MGM	
	Delice.2	2	%18MGM	
Profil Bacteria 9	Delice.1	2	%18MGM	
	Tuzlagözü.2 Kaynak	5	%2MGM, %18MGM	
	Fadlum Kristalize	1	%6MGM	
	Delice.2	3	%18MGM	
Profil Bacteria 10	Delice.1	1	%18MGM	
Profil Bacteria 11	Delice.1	4	%12MGM	
	Tuzlagözü.2 Kaynak	1	%18MGM	

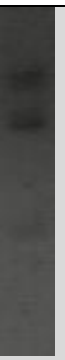
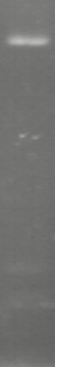
Tablo 3.5. (Devam). *Bacteria* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Bacteria* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

Profil Bacteria 12	Delice.1	3	%12MGM	
Profil Bacteria 13	Tuzlagözü.2 Kaynak	6	%2MGM, %6MGM	
Profil Bacteria 14	Tuzlagözü.2 Kaynak	4	%2MGM, %6MGM	
	Tuzlagözü.2 Havuz	3	%12MGM	
	Bingöl Kaynak	1	%23MGM	
	Fadlum Kristalize	3	%18MGM, %23MGM	
	Bingöl Dinlenme	6	%18MGM, %23MGM	
	Fadlum Dinlenme	1	%23MGM	
	Akçakoyunlu	1	%12MGM	
Profil Bacteria 15	Tuzlagözü.2 Kaynak	1	%2MGM	
	Fadlum Kaynak	1	%18MGM	

Tablo 3.5. (Devam). *Bacteria* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Bacteria* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

Profil Bacteria 16	Tuzlagözü.2 Kaynak	1	%2MGM	
Profil Bacteria 17	Bingöl Dinlenme	2	%12MGM	
	Akçakoyunlu	1	% 23MGM	
	Tuzlagözü.2 Havuz	1	%23MGM	
	Delice.2	1	%23MGM	
Profil Bacteria 18	Delice.2	1	%18MGM	
	Tuzlagözü.2 Kaynak	1	%18MGM	
Profil Bacteria 19	Delice.2	1	%18MGM	
	Bingöl Kaynak	3	%12MGM, %18 MGM	
	Fadlum Kristalize	1	%12MGM	
	Tuzlagözü.2 Havuz	1	%6MGM	
	Tuzlagözü.2 Kaynak	1	%18MGM	

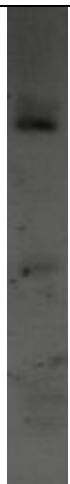
Tablo 3.5. (Devam). *Bacteria* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Bacteria* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

Profil Bacteria 20	Tuzlagözü.2 Kaynak	2	%12MGM	
Profil Bacteria 21	Tuzlagözü.2 Kaynak	2	%2MGM, %23MGM	
Profil Bacteria 22	Tuzlagözü.2 Kaynak	1	%18MGM	
Profil Bacteria 23	Fadlum Kristalize	1	%23MGM	

Tablo 3.5. (Devam). *Bacteria* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Bacteria* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

Profil Bacteria 24	Tuzlagözü.2 Havuz	1	%18MGM	
	Tuzlagözü.2 Kaynak	1	%18MGM	
Profil Bacteria 25	Tuzlagözü.2 Havuz	2	%23MGM	
Profil Bacteria 26	Delice.2	2	%25 Seawater	
	Fadlum Kaynak	1	%23MGM	
Profil Bacteria 27	Fadlum Kristalize	2	%12MGM, %18 MGM	
	Fadlum Kaynak	1	%18MGM	

Tablo 3.5. (Devam). *Bacteria* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Bacteria* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

Profil Bacteria28	Bingöl Kaynak	1	%18MGM	
Profil Bacteria29	Fadlum Kaynak	1	%18MGM	
Profil Bacteria30	Bingöl Kaynak	1	%23MGM	

Tablo 3.5. (Devam). *Bacteria* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Bacteria* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

Profil Bacteria 31	Tuzlagözü.2 Kaynak	1	%12MGM	
	Fadlum Kristalize	1	%6MGM	
Profil Bacteria 32	Fadlum Kristalize	1	%6MGM	
Profil Bacteria 33	Tuzlagözü.2 Kaynak	2	%23MGM	
Profil Bacteria 34	Fadlum Kristalize	1	%12MGM	

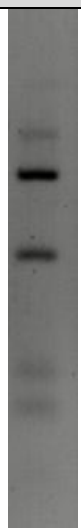
Tablo 3.5. (Devam). *Bacteria* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Bacteria* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyerleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

Profil Bacteria 35	Bingöl Dinlenme	1	%18MGM	
Profil Bacteria 36	Bingöl Dinlenme	2	%12MGM	

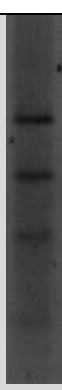
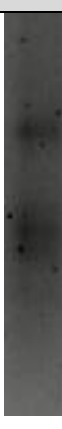
Tablo 3.6. *Archaea* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Archaea* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyerleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

ARDRA Profilleri	Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip <i>Archaea</i> İzolatları			
	İzole Edilen Bölgeler	Analiz Edilen İzolat Sayısı	Geliştiği Besiyerleri	Jel Görüntüsü
Profil Archaea 1	Sungurlu	35	%18MGM	
	Tuzlagözü.1	8	%18MGM,%23MGM, %12MGM, Medium E	

Tablo 3.6 (Devam) *Archaea* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Archaea* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

Profil Archaea 2	Sungurlu	3	%18MGM	
	Kemah Havuz	1	%25 Seawater	
Profil Archaea 3	Sungurlu	26	Medium E,%25 Seawater	
	Tuzlagözü.1	23	%25 Seawater,% 23MGM	
	Akçakoyunlu	3	%18MGM,% 23MGM, %25 Seawater	
	Fadlum Kristalize	4	%18MGM, %23MGM, %25 Seawater	
	Fadlum Kaynak	4	%18MGM, %23MGM	
	Bingöl Dinlenme	4	%18MGM	
	Bingöl Kaynak	2	%18MGM, %23MGM	
Profil Archaea 4	Delice.1	5	% 23MGM	

Tablo 3.6 (Devam) *Archaea* ARDRA Profilleri, Farklı Örneklerdeki Aynı ARDRA Profiline Sahip *Archaea* İzolatları, Analiz Edilen İzolat Sayısı, İzole Edilen Bölgeler, Geliştikleri Besiyereleri ve Jel Görüntüleri (*HinfI* Enzimi ile Kesim Görüntüsü)

Profil Archaea 5	Tuzlagözü.1	9	% 23MGM	
	Akçakoyunlu	2	% 23MGM	
	Tuzlagözü.2 Kaynak	1	%23MGM	
Profil Archaea 6	Tuzlagözü.1	8	%18MGM,% 23MGM, %25 Seawater	
Profil Archaea 7	Tuzlagözü.1	1	%25 Seawater	
	Akçakoyunlu	2	%25 Seawater, Medyum D	
	Bingöl Dinlenme	7	%25 Seawater, Medyum D	
	Fadlum Dinlenme	1	%25 Seawater	
Profil Archaea 8	Akçakoyunlu	1	%18MGM	

PCR Ürünlerinden Dizi Analizi

Aynı ARDRA profili veren izolatlardan birer temsilci seçilmiştir. Seçilen 44 farklı temsilci profilden 28 tanesinin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Seçilen 28 örnekten kalıp hazırlanmış ve 16S rRNA geni PCR ile amplifiye edilerek bu ürünlerin direkt olarak dizi analizlerinin eldesi yoluna gidilmiştir. Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı ile bu elde edilen PCR ürünlerinin baz dizilerinin belirlenmesi amacıyla Beckman dizi analiz kitinde önerilen şartlar ile sonuçlar alınmıştır. Dizi analizleri kısmen yapılmış ya da tamamlanmış izolatlar ve bunların Blast programı ile benzerlik gösterdiği türler Tablo 3.7 ve 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3.7. Analizi yapılan *Archaea* izolatlarının gen bankasındaki en yakın temsilcileri, benzerlik oranları ve izolat sayısı

ARDRA Profili	En Yakın Temsilci	Benzerlik Oranı
Profil Archaea 1	<i>Halorubrum sp.</i>	(%98)
Profil Archaea 2	<i>Halorubrum sp.</i>	(%93)
Profil Archaea 3	<i>Haloarcula californiae</i>	(%99)
Profil Archaea 4	<i>Haloferax mediterranei</i>	(%98)
Profil Archaea 5	<i>Haloarcula sp.</i>	(%93)
Profil Archaea 6	<i>Haloarcula japonica</i>	(%95)
Profil Archaea 7	<i>Halobacterium salinarum</i>	(%98)

Tablo 3.8. Analizi yapılan *Bacteria* izolatlarının gen bankasındaki en yakın temsilcileri, benzerlik oranları

ARDRA Profili	En Yakın Temsilci	Benzerlik Oranı
Profil Bacteria 1	<i>Salicola marasensis</i>	(%94)
Profil Bacteria 2	<i>Salinibacter ruber</i>	(%95)
Profil Bacteria 3	<i>Rhodovibrio salinarum</i>	(%91)
Profil Bacteria 4	<i>Uncultured Bacteroidetes</i>	(%96)
Profil Bacteria 5	<i>Uncultured Bacteroidetes</i>	(%98)
Profil Bacteria 6	<i>Rhodovibrio sodomensis</i>	(%97)
Profil Bacteria 7	<i>Halomonas caseinilytica</i>	(%94)
Profil Bacteria 8	<i>Salinivibrio costicola.</i>	(%91)
Profil Bacteria 9	<i>Halomonas salina</i>	(%98)

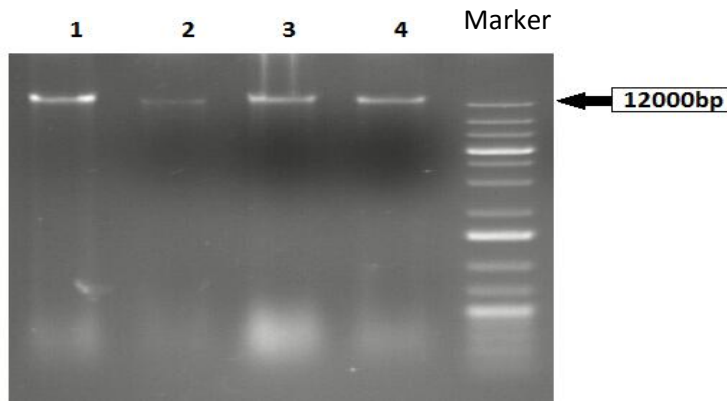
Tablo 3.8. (Devam). Analizi yapılan Bacteria izolatlarının gen bankasındaki en yakın temsilcileri, benzerlik oranları

Profil Bacteria 10	<i>Halomonas salina</i>	(%94)
Profil Bacteria 11	<i>Halomonas taeanensis</i>	(% 94)
Profil Bacteria 12	<i>Salinivibrio sp</i>	(%97)
Profil Bacteria 18	<i>Salinivibrio costicola</i>	(%97)
Profil Bacteria 19	<i>Idiomarina sp.</i>	(%97)
Profil Bacteria 20	<i>Marinobacter algicola</i>	(%92)
Profil Bacteria 23	<i>Chromohalobacter sp.</i>	(%97)
Profil Bacteria 25	<i>Halomonas taeanensis</i>	(%97)
Profil Bacteria 26	<i>Halomonas elongata</i>	(%97)
Profil Bacteria 29	<i>Idiomarina sp</i>	(%93)
Profil Bacteria 30	<i>Uncultured Bacteroidetes</i>	(%98)
Profil Bacteria 36	<i>Parvularcula sp.</i>	(% 90)

3.4.Moleküler Teknikler

3.4.1.Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

Su örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Aşağıda bazı örneklerin agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.8. DNA ekstraksiyonu sonrası temsili bir jel görüntüsü (TrackIt 1 Kb DNA Ladder, Invitrogen)

3.4.2.Denatüre Edici Gradient Jel Elektroföresi (DGGE)

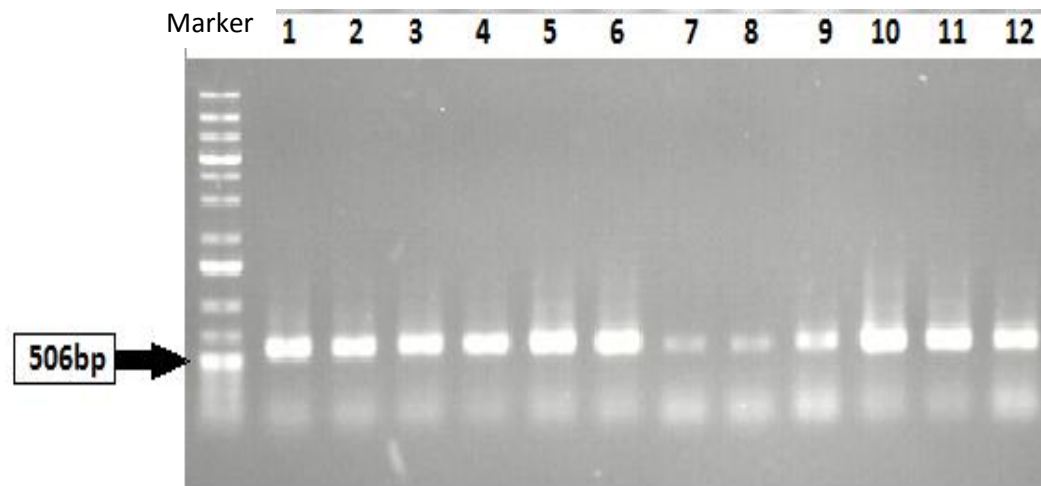
3.4.2.1.Birinci Örnekleme (2011)

16S rRNA Genlerinin DGGE Analizi için Amplifikasyonu

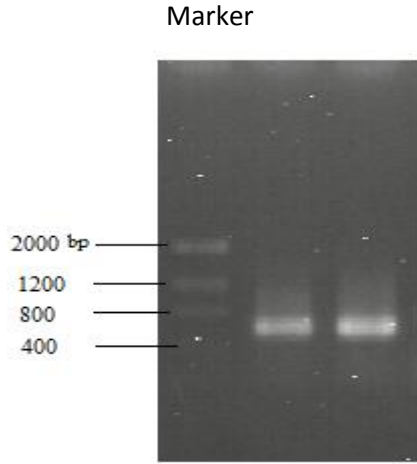
Archaea için 344F ve Bacteria için 341F primerleri ile 907R-GC primeri kullanılarak DGGE-PCR gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9). Her örnek için en az 5 reaksiyon kurulmuş ve aynı örneğe ait pozitif sonuç verenler bir araya toplanmıştır. Daha sonra miktar belirleme amaçlı DGGE-PCR ürünlerinde jele 2 μ l yüklenmiştir; karşılaştırma amaçlı Low Mass DNA Ladder markerdan da jele 2 μ l yüklenmiştir (Şekil 3.10). Örneklere ait bantların parlaklığına göre DNA'nın yaklaşık miktarı belirlenmiştir. Her örneğe ait DGGE-PCR ürünün DNA konsantrasyonu belirlendikten sonra DGGE jeline eşit konsantrasyonlarda PCR ürünü yüklenmiştir.

Tablo 3.9. Low Mass DNA Ladder marker bantlarının büyüklükleri ve hacme göre içerdiği DNA miktarları

	Low DNA Mass Ladder Hacmi		
	2 μ l	4 μ l	8 μ l
Fragment büyüklüğü			
2000 bp	100 ng	200 ng	400 ng
1200 bp	60 ng	120 ng	240 ng
800 bp	40 ng	80 ng	160 ng
400 bp	20 ng	40 ng	80 ng

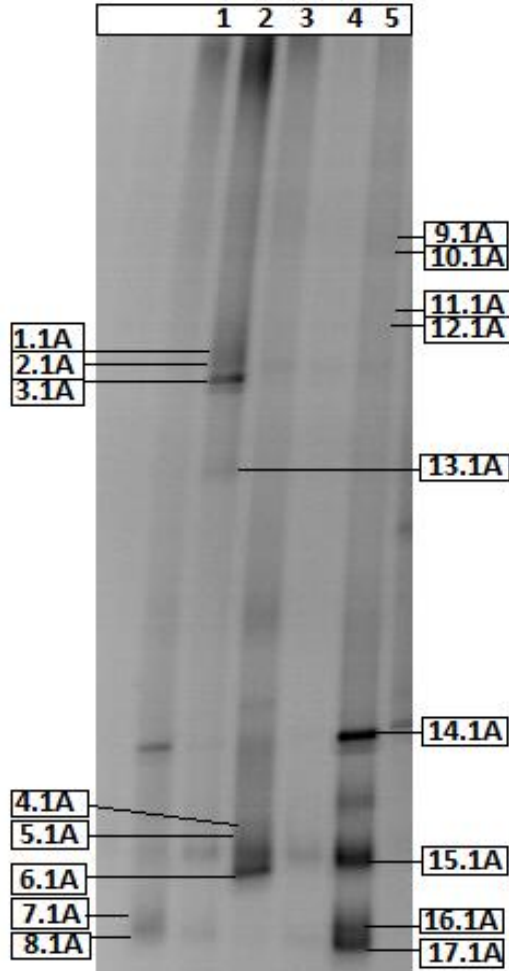


Şekil 3.9. DGGE-PCR ürünlerinin temsili bir agaroz jel görüntüsü (1 Kb Plus DNA Ladder , Fermentas)



Şekil 3.10. DGGE-PCR ürünlerinin miktarını belirleme amaçlı temsili bir agaroz jel görüntüsü
(Marker;Low Mass DNA Ladder, Invitrogen)

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



Şekil 3.11. 2011 örneklerine ait DGGE Archaea jelinin görüntüsü (1.Çorum-Sungurlu; 2. Kırıkkale-Delice; 3. Erzincan Kemah-Havuz; 4.Erzincan Kemah-Kaynak; 5. Sivas-Zara)

DGGE jelinde oluşan bantlar kesilip bir ependorf içerisine aktarılmış ve üzerine bir miktar distilesu eklenmiştir. Sonrasında bu örnekler Re-PCR kurulmuştur. Fakat bu sefer kullanılan primerler GC-takısı içermemektedir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jele yüklenmiştir. Daha sonra PCR ürünleri saflaştırılıp dizi analizleri gerçekleştirilmiştir.

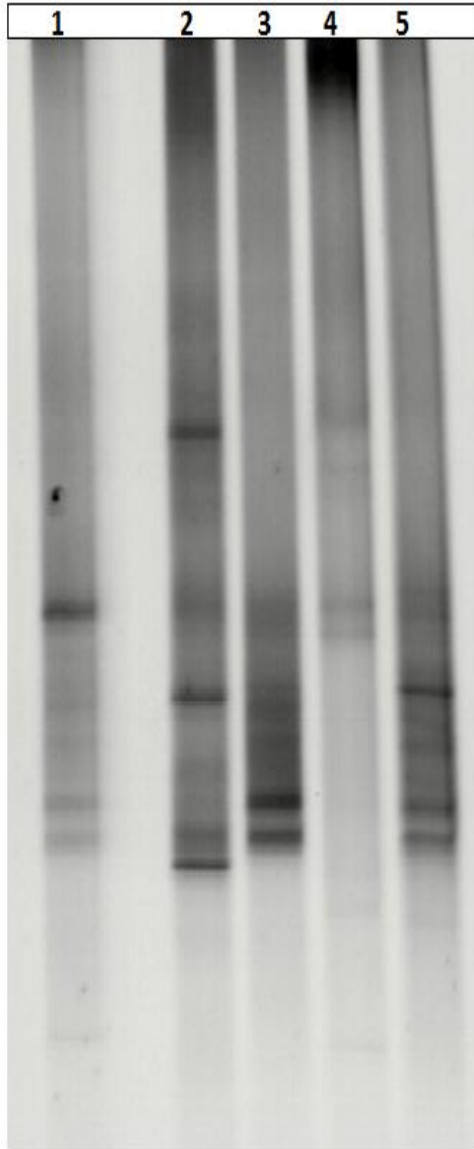
Dizilenen *Archaea* DGGE Bantları ve Gen Bankasındaki En Yakın Karşılıkları

Tablo 3.10. Elde edilen *Archaea* DGGE bantları ve bunların gen bankasındaki en yakın karşılıkları(Birinci Örneklem-2011)

DGGE bant numaraları	Dizileme için Kullanılan Primer	Eşleşen Baz Sayısı	Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı ve % Benzerliği
1.1A	907R	471/494	EU931309.1 Halorubrum sp. RBCA-10 ³ (%95)
2.1A	907R	343/368	EU931309.1 Halorubrum sp. RBCA-10 ³ (%93)
3.1A	907R	419/449	JN196523.1 Halorubrum sp. GV-4 16S (%93)
4.1A	907R	256/278	AB576121.1 Halonotius pteroides (%92)
5.1A	907R	487/503	AY498648.1 Halonotius pteroides strain 6.14.5 (%97)
6.1A	907R	474/503	AB576121.1 Halonotius pteroides (%94)
7.1A	907R	407/435	JN216851.1 Halorubrum sp. YC-6 (%94)
8.1A	907R	390/422	JN216864.1 Halorubrum sp. YC-X8 (%92)
9.1A	907R	472/530	JN216851.1 Halorubrum sp. YC-6 (%89)
10.1A	907R	494/516	JN216851.1 Halorubrum sp. YC-6 (%96)
11.1A	907R	494/516	JN216851.1 Halorubrum sp. YC-6 (%96)
12.1A	907R	493/502	JN216851.1 Halorubrum sp. YC-6 (%98)

13.1A	907R	460/487	JN216851.1 Halorubrum sp. YC-6 (%94)
14.1A	907R	491/500	JN216851.1 Halorubrum sp. YC-6 (%98)
15.1A	907R	495/507	JN216864.1 Halorubrum sp. YC-X8
16.1A	907R	293/326	JN216851.1 Halorubrum sp. YC-6 (%90)
17.1A	907R	491/508	JN216851.1 Halorubrum sp. YC-6 (%97)

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



Şekil 3.12. 2011 örneklerine ait DGGE Bacteria jelinin görüntüsü (1.Çorum-Sungurlu; 2. Kırıkkale-Delice; 3. Erzincan Kemah-Havuz; 4.Erzincan Kemah-Kaynak; 5. Sivas-Zara)

Jelden kesilen DGGE Bacteria bantlarından Re-PCR kurulmuştur. Ürünlerin verimleri düşük elde edilmiştir. Miktarı artırmak için daha fazla reaksiyon kurulmuştur. Ürünlerin bir kısmı saflaştırılıp dizileme gerçekleştirilmiştir. Kesilen bantlardan sadece bir bandın dizi bilgisi çıkarılmıştır. Bu, Kemah kaynak örneğine ait bandın dizi bilgisinin gen bankasındaki en yakın karşılığı *Salicola* örneğine aittir.

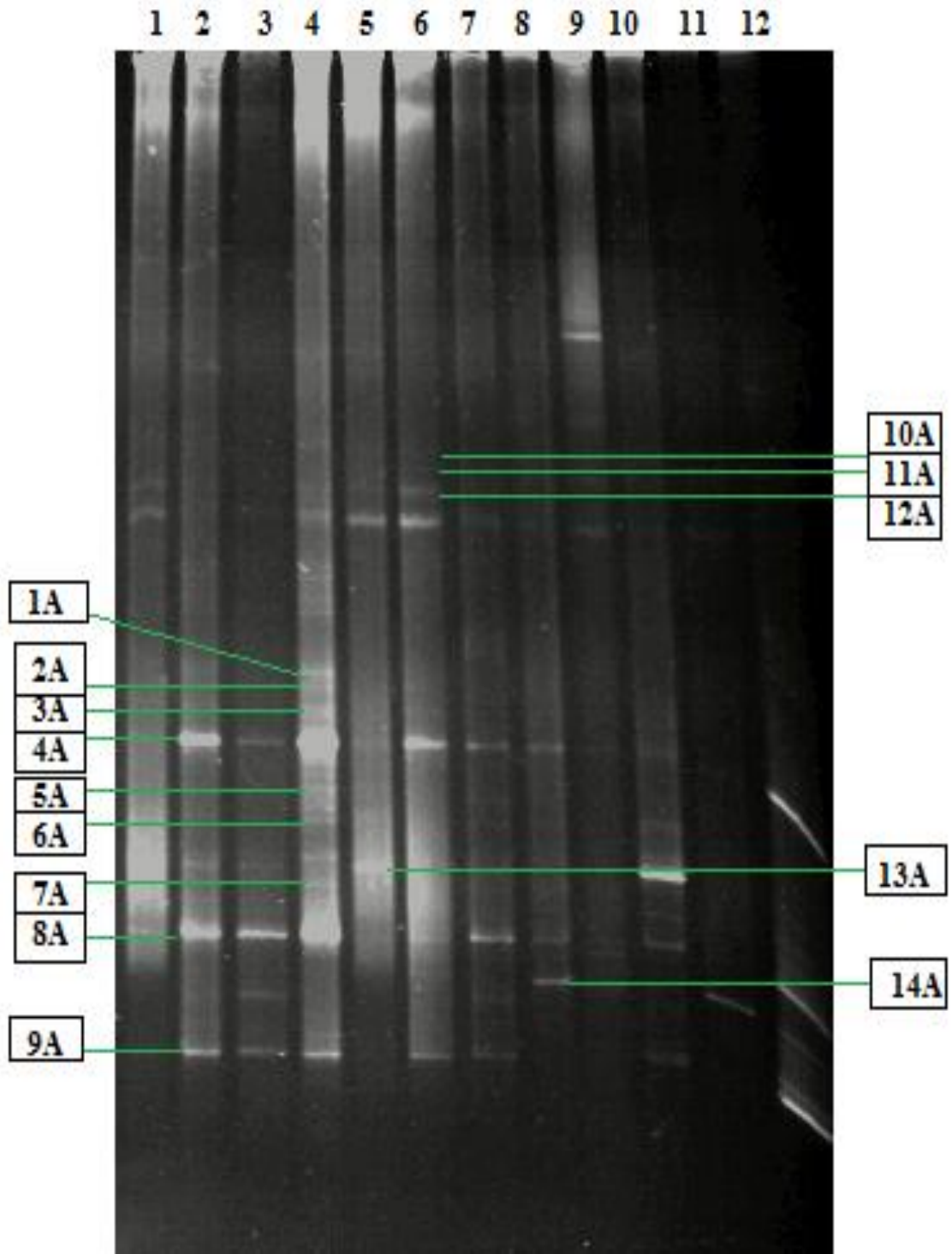
3.4.2.2.İkinci Örnekleme(2012)

16S rRNA Genlerinin DGGE Analizi için Amplifikasyonu

Archaea için 344F ve Bacteria için 341F primerleri ile 907R-GC primeri kullanılarak DGGE-PCR gerçekleştirilmiştir. Her örnek için en az 5 reaksiyon kurulmuş ve aynı örneğe ait pozitif zonuç verenler bir araya toplanmıştır. Daha sonra miktar belirleme amaçlı DGGE-PCR ürünlerinde jele 2 µl yüklenmiştir; karşılaştırma amaçlı Low Mass DNA Ladder markerdan da jele 2 µl yüklenmiştir. Örneklerle ait bantların parlaklığına göre DNA'nın yaklaşık miktarı belirlenmiştir. Her örneğe ait DGGE-PCR ürünün DNA konsantrasyonu belirlendikten sonra DGGE jeline eşit konsantrasyonlarda PCR ürünü yüklenmiştir.

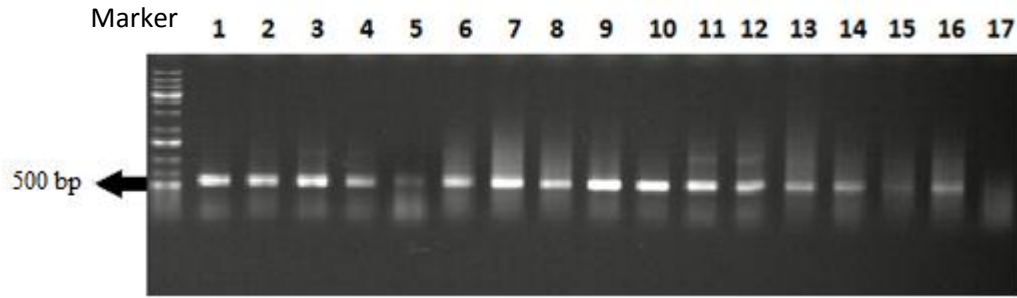
Archaea Grubu 16S rRNA Ürünleri için Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi

DGGE Archaea jelinin görüntüsü Şekil 3.13'te verilmiştir.



Şekil 3.13. 2011-2012 örneklerine ait DGGE Archaea jelinin görüntüsü (Haziran 2012 örneklemeleri: 1.Çorum-Akçakoyunlu; 2. Bingöl Dinlenme; 3. Kırıkkale-Delice; 4. Sivas Fadlum Dinlenme; 5. Sivas Fadlum Kristalize; 6. Sivas Tuzlagözü Havuz; 7. Sivas Tuzlagözü Oluk) (Nisan 2011örneklemeleri: 8.Çorum-Sungurlu; 9. Kırıkkale-Delice; 10. Erzincan Kemah-Havuz; 11.Erzincan Kemah-Kaynak; 12. Sivas-Zara)

DGGE jeline oluşan bantlar kesilip bir ependorf içerisine aktarılmış ve üzerine bir miktar distile su eklenmiştir. Sonrasında bu örneklerden Re-PCR kurulmuştur (Şekil 3.14). Fakat bu sefer kullanılan primerler GC-takısı içermemektedir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jele yüklenmiştir. Daha sonra PCR ürünleri saflaştırılıp dizi analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil.3.14. Archaea örneklerinin Re-PCR ürünlerinin jel görüntüsü (marker, 1 Kb Plus DNA Ladder, Fermentas)

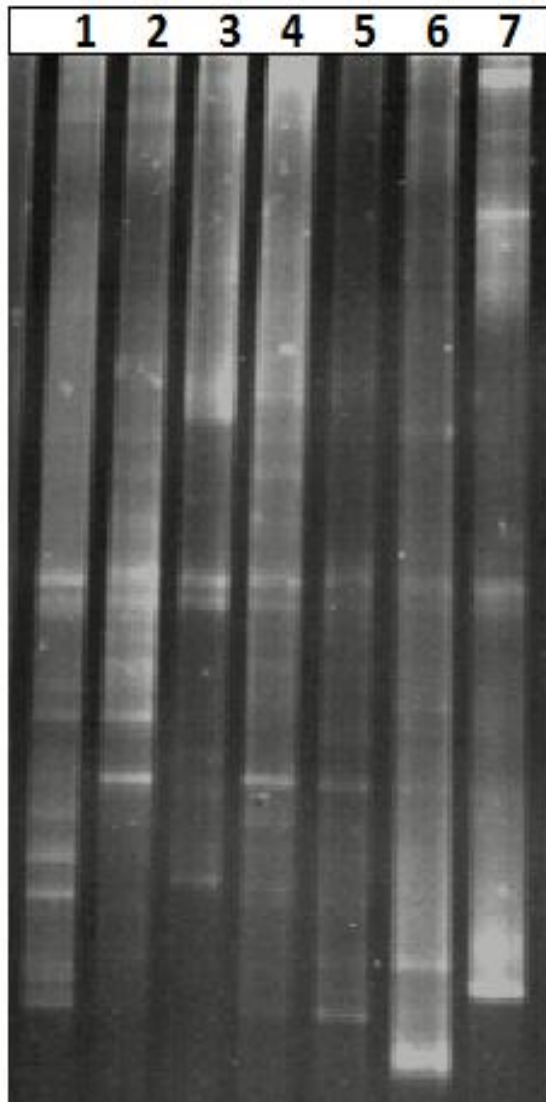
Dizilenen *Archaea* DGGE Bantları ve Gen Bankasındaki En Yakın Karşılıkları

Tablo.3.11. Elde edilen Archaea DGGE bantları ve bunların gen bankasındaki en yakın karşılıkları

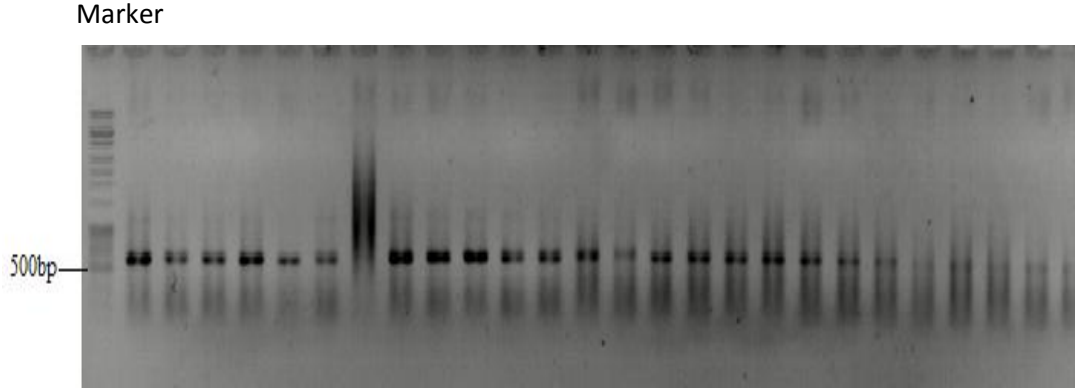
DGGE bant numaraları	Dizileme için Kullanılan Primer	Eşleşen Baz Sayısı	Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı ve % Benzerliği
1A	907R	471/505	JX188265.1 Halorubrum sp. LYG-1(%93)
2A	907R	368/409	JX188265.1 Halorubrum sp. LYG-1(%90)
3A	907R	325/352	JX188265.1 Halorubrum sp. LYG-1(%92)
4A	907R	491/500	JN216851.1 Halorubrum sp. YC-6(%98)
5A	907R	454/523	JX188265.1 Halorubrum sp. LYG-1(%87)
6A	907R	468/487	JX188265.1 Halorubrum sp. LYG-1(%96)
7A	907R	427/441	JX188265.1 Halorubrum sp. LYG-1(%97)
8A	907R	495/507	JN216864.1 Halorubrum sp. YC-X8
9A	907R	293/326	JN216851.1 Halorubrum sp. YC-6 (%90)

10A	907R	409/469	JX188265.1 Halorubrum sp. LYG-1(%87)
11A	907R	398/440	FR746099.1 Haloquadratum walsbyi c23 (%90)
12A	907R	149/150	JX188265.1 Halorubrum sp. LYG-1(%99)
13A	907R	178/185	FR746099.1 Haloquadratum walsbyi c23 (%96)
14A	907R	394/457	JX188265.1 Halorubrum sp. LYG-1(%86)

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



Şekil.3.15. 2012 örneklerine ait DGGE Bacteria jelinin görüntüsü (1.Çorum-Akçakoyunlu; 2. Bingöl Dinlenme; 3. Kırıkkale-Delice; 4. Sivas Fadlum Dinlenme; 5. Sivas Fadlum Kristalize; 6. Sivas Tuzlagözü Havuz; 7. Sivas Tuzlagözü Oluk)

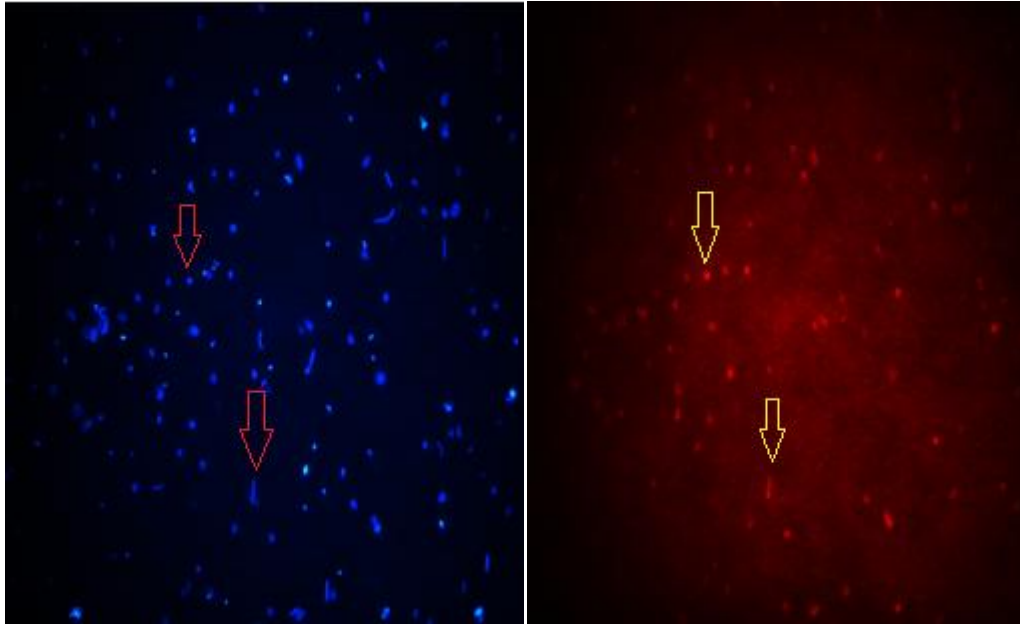


Şekil.3.16.Bacteria örneklerinin Re-PCR ürünlerinin jel görüntüsü(Marker; 1kb Plus DNA Ladder, Fisher BioReagents)

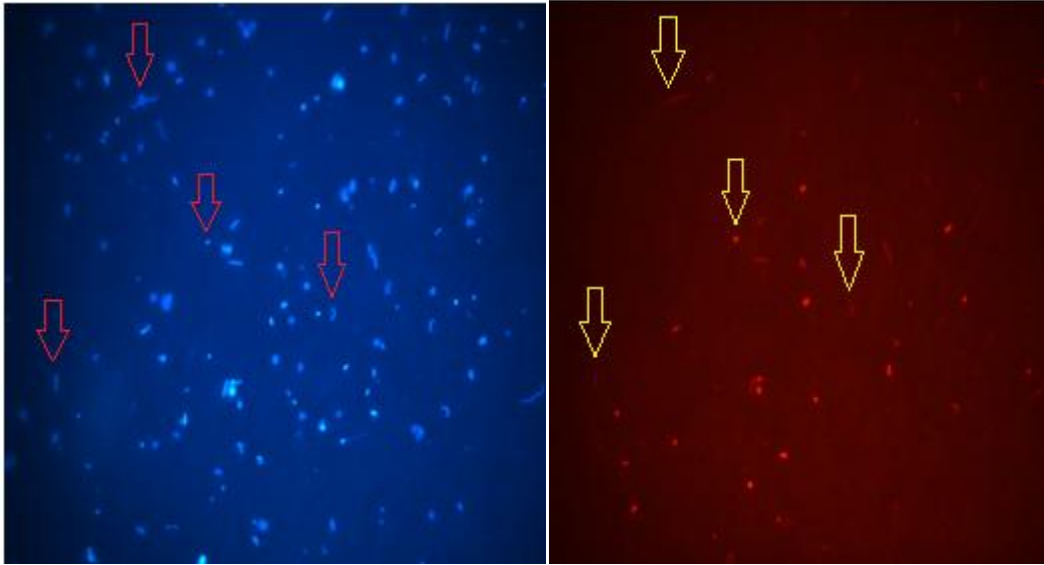
Jelden kesilen DGGE Bacteria bantlarından Re-PCR kurulmuştur. Re-PCR ürünlerinin jel görüntüsünde smear gözlenmiştir. Ürünlerin bir kısmı saflaştırılıp dizileme gerçekleştirilmiştir.

3.4.3.Fluoresan in situ Hibridizasyon (FISH)

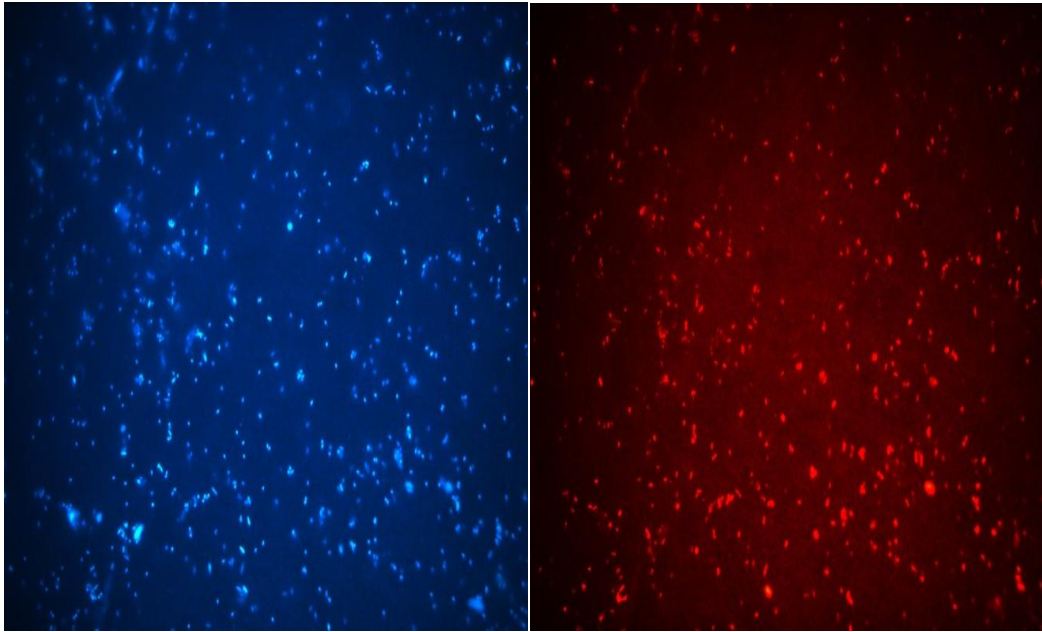
Farklı tuzlaldan alınan su örneklerinin DAPI boyama ile toplam hücre sayımları, Eub 338 (Thermo) probu ile hibridizasyondan sonra Bacteria, Arc915 (Thermo) probu ile hibridizasyondan sonra Archaea sayıları tesbit edilmiştir.



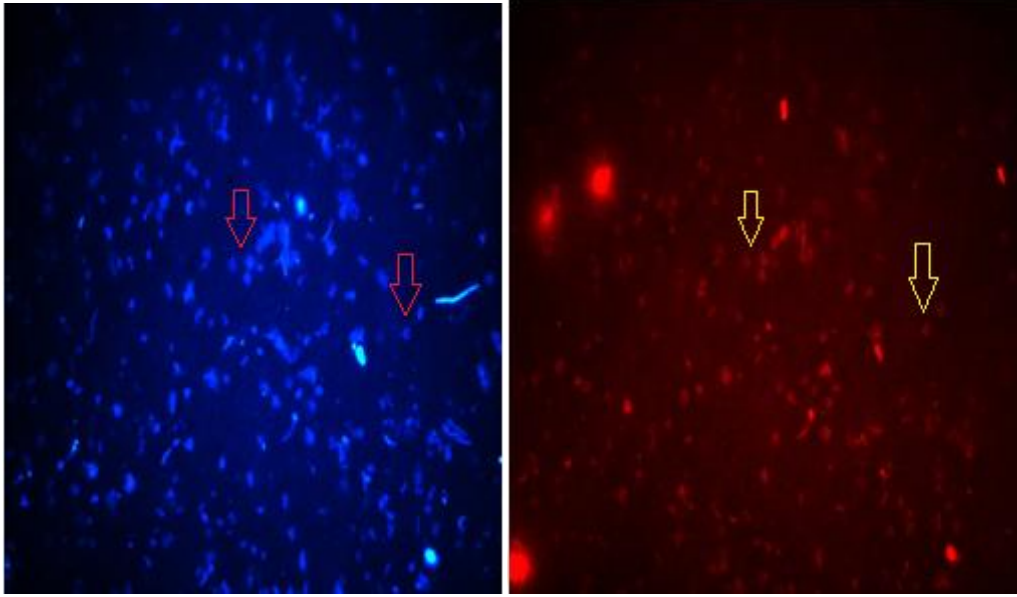
Şekil.3.17. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Arc915 Probu ile boyanan Archaea hücreleri (Kare ve çubuk şekilli Archaea örnekleri okla gösterilmiştir) (Çorum Sungurlu)



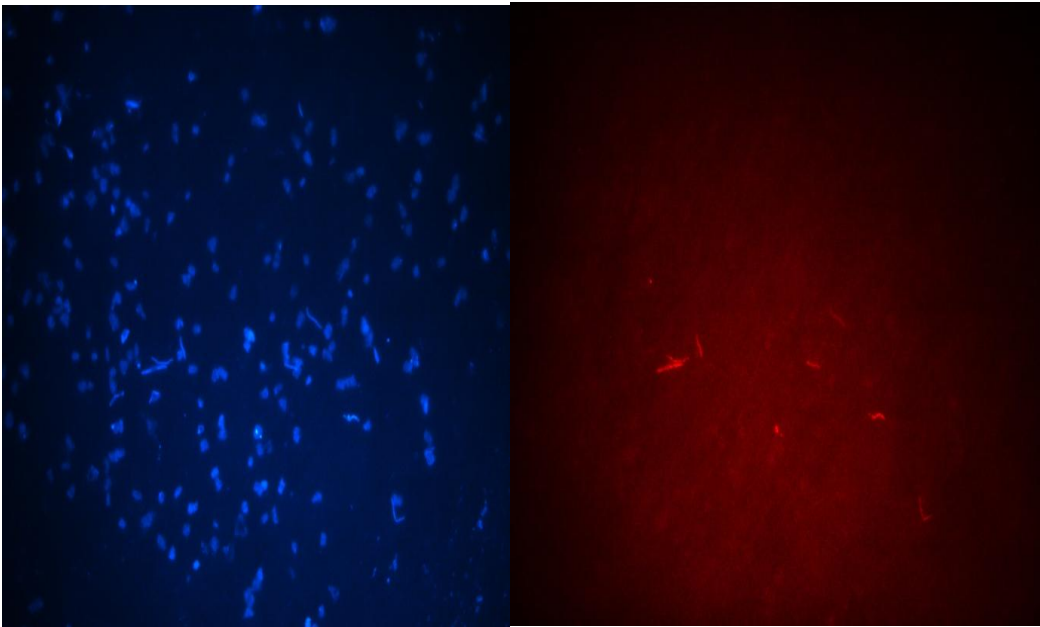
Şekil.3.18. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Eub338 Probu ile boyanan Bacteria hücreleri(Çubuk, virgül, kok ve spiral şekili Bacteria hücreleri okla gösterilmiştir) (Çorum Sungurlu)



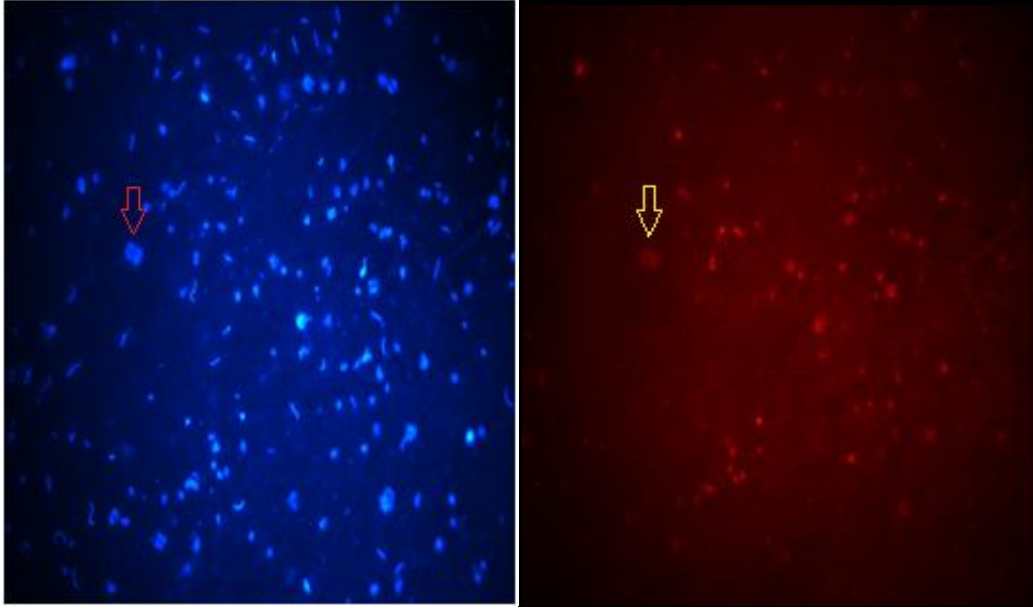
Şekil.3.19. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Eub338 Probu ile boyanan Bacteria hücreleri (Kok şeklinde Bacteria hücreleri tüm alanı kaplamaktadır)(Erzincan Kemah Havuz)



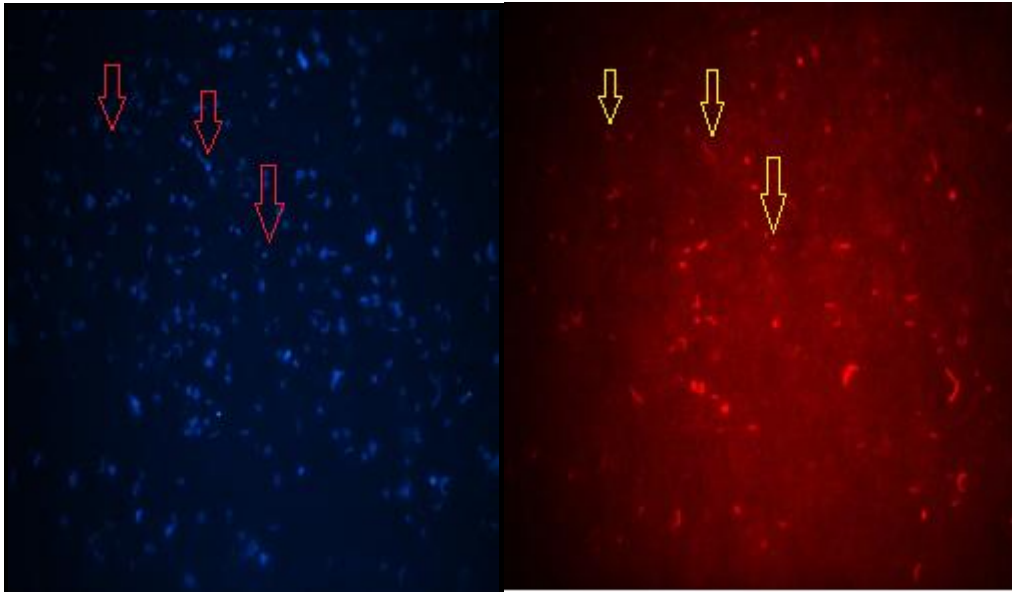
Şekil.3.20. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Arc915 Probu ile boyanan Archaea hücreleri (Kare şekilli Archaea örnekleri okla gösterilmiştir) (Sivas Zara Tuzlagözü 1. Örneklem)



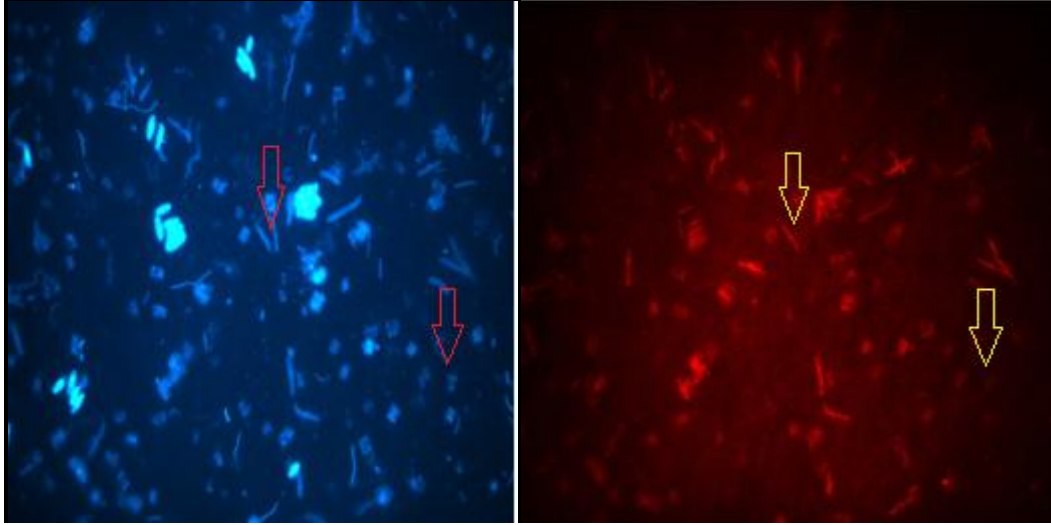
Şekil.3.21. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Eub338 Probu ile boyanan Bacteria hücreleri (Sivas Zara Tuzlagözü 1. Örneklem)



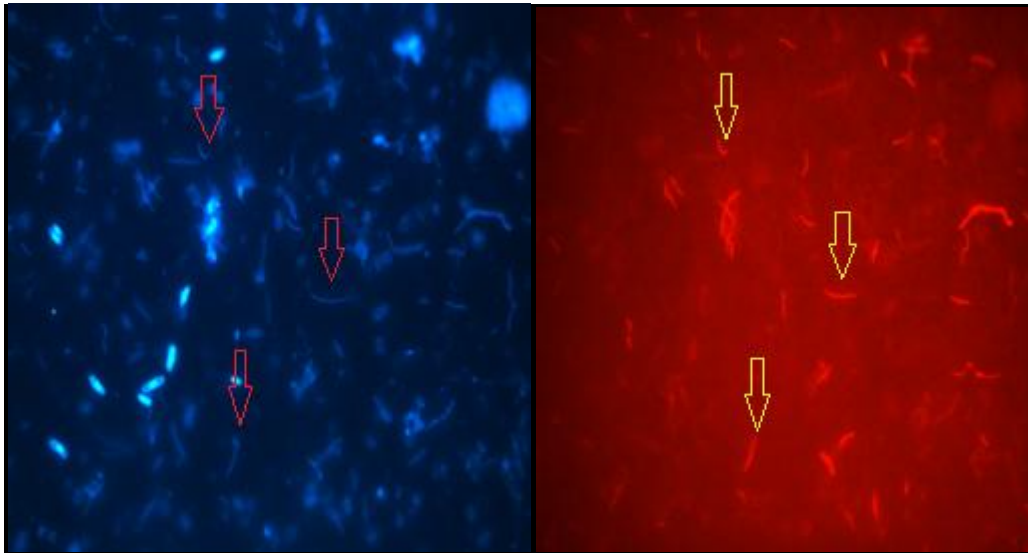
Şekil.3.22. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Arc915 Probu ile boyanan Archaea hücreleri (Kare şekilli Archaea örnekleri okla gösterilmiştir) (Sivas Zara Tuzlagözü Havuz 2. Örneklem)



Şekil.3.23. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Eub338 Probu ile boyanan Bacteria hücreleri (Çubuk, virgül, kok şekilli Bacteria hücreleri okla gösterilmiştir) (Sivas Zara Tuzlagözü Havuz 2. Örneklem)



Şekil.24.20. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Arc915 Probu ile boyanan Archaea hücreleri (Kare ve çubuk şekilli Archaea örnekleri okla gösterilmiştir) (Çorum Akçakoyunlu)



Şekil.3.25. Solda DAPI ile boyanan hücreler ve sağda aynı görüntü alanında Eub338 Probu ile boyanan Bacteria hücreleri(Çubuk, virgül, spiral şekilli Bacteria hücreleri okla gösterilmiştir) (Çorum Akçakoyunlu)

4.TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Hipersalin ortamlar dünyada ve ülkemizde oldukça yaygındır. Bu ortamlar, sadece tuzluluk açısından değil anaerobik zon, yüksek ve düşük pH, yüksek ve düşük sıcaklık gibi pek çok diğer ekstrem koşullara da sahip olabilmektedir. Bu ekstrem koşullara adapte olmuş ilginç türler hipersalin ortamlarda yaşamaktadır. Ekstrem koşullarda gelişen organizmaların metabolik çeşitliliği oldukça fazladır ve biyoteknolojik potansiyelleri açısından bu organizmalar önemlidir.

Türkiye’de hipersalin ortamların mikroorganizma çeşitliliği ilgili çalışmalar yapılmıştır (Yalçın, 2000; Kallı, 2000; Birbir ve Sesal, 2003; Özcan, 2004 ve Mutlu, 2006). Ekonomik değeri de olan tuzun elde edildiği hipersalin ortamlardan özellikle bir göl tuzlası olan Tuz gölü ve deniz tuzlası olan Çamaltı tuzlası ile yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir. Fakat kaynak tuzluları ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Dünyada ise bu konuda yapılmış olan çalışma sayısı oldukça azdır.

Tuz gölü ile ilgili yapılan çalışmada göldeki baskın Archaea üyesinin *Haloquadra walsbyi* ve Bacteria üyesinin *Salinibacter ruber* olduğunu gösterilmiştir DGGE analizi sonrası *Haloquadra walsbyi*, *Archaeoglobus profundus*, *Halorubrum* sp., *Halobacterium saccharovororum* ve *Halorubrum orientalis* Archaea örneklerinin ortamda varlığı belirlenmiştir. DGGE Bacteria jelinden ise *Cytophaga* sp., *Salinibacter ruber* ve Halophilic euBacterium EHB-2’ye benzerlik gösteren diziler elde edilmiştir. Tuz Gölü’nden elde edilen izolatlar *Haloferax mediterranei*, *Haloferax alexandrinus*, *Haloarcula hispanica*, *Haloarcula argentinensis*, *Haloarcula marismortui*, *Halorubrum xinjiangense* ve *Halomicrobium mukohatei* ve *Chromohalobacter marismortui* olarak tanımlanmışlardır (Mutlu ve ark., 2008).

Peru’daki Maras tuzlularından 2003 Ekim ayında Maturrano ve ark.(2006(a)) örnekleme yapmışlardır. Örneklerin toplam tuzluluk değerlerini pH ve iyonik kompozisyonlarını belirlemişlerdir (Tablo 4.1). Bu tuzluların thalassohaline ortamlar olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışma alanlarının pH değerleri ortalaması pH 7 (nötral) olarak kaydedilmiştir. Toplam tuzluluk değerleri ise % 14 ile % 27 arasında değişmektedir. Yapılan ölçümler sonrası aynı örneklere ait havuz ve kaynakların toplam tuzluluk değerlerinde büyük bir

farklılık gözlenmemiştir. İyonik bileşenlerine bakıldığında Na^+ 'un oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu belirlenmiştir. K^+ ve Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının yakın miktarlarda ortamda bulunduğu, Mn^{+2} 'in çok düşük miktarda olmakla birlikte ortamda varlığı saptanmıştır. Bu verilere göre Maras tuzlaları ile çalıştığımız bölgeler arasında karşılaştırma yapılacak olursa, toplam tuzluluk, pH değeri ve iyonik kompozisyon bakımından bu tuzlalar benzemektedir. Ancak sodyum iyonlarının konsantrasyonu, çalıştığımız bölgelerde çok daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 4.1. Maras Tuzlalarının İyonik Kompozisyonu ve pH'sı (Maturrano ve ark. 2006(a))

Parametreler	ÖRNEK			
	1	2	5	7
Konsantrasyon (g/L)				
Na^+	116.40	121.10	118.80	139.30
Mg^{2+}	0.76	1.00	0.78	0.79
Ca^{2+}	1.72	1.13	1.29	1.33
K^+	0.30	0.37	0.30	0.30
Mn^{2+}	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Cl^-	157.89	186.30	174.20	177.90
SO_4^{2-}	4.57	4.89	4.56	4.59
HCO_3^-	0.03	0.04	0.03	0.01
CO_3^{2-}	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Tuzluluk (%)	25	30	31	30
pH	7.0	6.5	7.0	7.0

Sungurlu bölgesi Çankırı-Çorum Havzası'nın bir bölümünü oluşturur. Norman ve ark. (1980) yaptıkları çalışmada Sungurlu havzasının Eosen dönemine kadar denizel bir ortam olduğunu ve Eosen sonunda denizin tamamen kurumuş olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu bilgiden yola çıkarak bu bölgedeki tuzlaların thalassohaline ortamlar olduğu söylenebilir.

Maturrano ve ark. (2006(a)), Peru'daki Maras tuzlalarının mikrobiyal çeşitliliğini kültür-bağımlı ve moleküler teknikler kullanarak ortaya çıkarmışlardır. Maras tuzlaları deniz seviyesinden 3380 m yukarıda bulunmaktadır; bu tuzlalar aralarında bağlantı bulunmayan 3000'den fazla küçük havuzdan oluşmaktadır. Bu havuzlar sodyum ve kloridce zengin **hipersalin kaynak suları** ile beslenmektedir. Hem havuzdan hem de kaynaktan örnekleme yaparak FISH yöntemi ile analiz ettiklerinde mikrobiyal çeşitliliğin oldukça düşük

olduğunu belirlemişlerdir. Havuzlardaki baskın grubun Archaea olduğunu ve kaynaklardaki mikroorganizma sayısının oldukça düşük olduğunu (100 hücre/ml) belirlemişlerdir.

Çalışmamızda kaynak tuzlarının çoğunun hem **havuz** ve hem de **kaynak** kısımlarından bahar sonunda veya yaz aylarında ikişer kez örnekleme yapılmıştır. Kaynak tuzlarının FISH analizine göre birbirleriyle karşılaştırdığımızda havuzlarda (Kemah örneği hariç); Archaea üyelerinin, özellikle kare şekilli olanlarının birçok örnekte baskın olduğu gözlenmiştir. Ayrıca mikroorganizma sayısı da oldukça yüksektir. Havuz örnekleri çeşitlilik açısından da zengin gözükmemektedir, birçok örnekte farklı mikroskobik morfolojide mikroorganizma gözlenmiştir. Arch915 probu ile kare, çubuk ve kok şekilli hücreler gözlenmiştir. Eub338 probu ile kok, virgül, spiral ve farklı uzunluklarda çubuk şekilli hücreler gözlenmiştir. Kaynak örnekleri FISH yöntemi ile analiz edildiğinde hücre sayısının oldukça düşük olduğu belirlenmiştir ve kaynak kısımlarından alınan örneklerde *Archaea*'ya ait örneklere sadece Fadlum ve Bingöl örneklerinde rastlanmıştır. Bunun sebebi her iki örneğin kaynak bölgelerinin % 25 gibi yüksek bir tuz konsantrasyonuna sahip olması olabilir.

Fadlum, Tuzlagözü ve Bingöl kaynak örneklerinden 1'er ml su örneği filtre edilip bu filtrelerin DAPI ile boyanması sonucu ortamdaki mikroorganizma yoğunluğunun oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Daha sonra bu örneklerden 10'ar ml su örneği filtre edilip FISH için analiz öyle gerçekleştirilmiştir.

Mililitredeki hücre yoğunluğu çoğu örnekte 10^3 - 10^6 arasında değişmektedir. Kemah ve Bingöl kaynak örneklerinde mililitredeki hücre sayısı 10^3 - 10^4 arasındadır. Fakat diğer kaynak örneklerinde hücre yoğunluğu çok düşüktür. Delice örneğindeki hücre yoğunluğu mililitre 10^3 'den küçüktür.

Birinci örnekleme sonrası FISH analizi sonucu; Çorum Sungurlu örneğinde kare şekilli *Archaea*, düz ve virgül şekilli çubuk, kok morfolojisine sahip *Bacteria* üyeleri gözlenmiştir. Delice örneğinde düz ve virgül şekilli çubuk morfolojisine sahip bakteriler gözlenmiştir. Kemah bölgesinin hem havuz hem de kaynak örneklerinde kok şeklinde bakterilerin oldukça yoğun olduğu belirlenmiştir. Halbuki bu iki bölge arasındaki tuz konsantrasyonu oldukça farklıdır; sırasıyla %27-%18. Dolayısıyla bu sonuç ilginçtir. Tuzlagözü örneğinde

kare şekilli *Archaea* örnekleri oldukça baskın olduğu ve çubuk şekilli bakterilerin varlığı da belirlenmiştir.

İkinci örnekleme sonrası FISH analizi sonucu; Akçakoyunlu örneğinde oldukça değişik morfolojilere rastlanmıştır. Farklı çubuk şekilleri ve spiral şekillerde *Bacteria*; çubuk, spiral ve kare şekilli *Archaea* üyeleri gözlenmiştir. Bingöl havuz ve kaynak örneklerinde kare şekilli *Archaea* üyeleri baskındır; farklı çubuk şekilleri ve spiral şekillerde *Bacteria* örnekleri görülmektedir. Delice örneğinde mikroorganizma yoğunluğu oldukça düşüktür. Sadece farklı çubuk şekillerinde bakterilere rastlanmaktadır. Fadlum dinlenme kare şekilli *Archaea* üyeleri, farklı çubuk şekilli bakterilerin olduğu belirlenmiştir. Tuzlagözü örneğinde kare şekilli *Archaea* örnekleri oldukça baskın olduğu ve virgül ve çubuk şekilli bakterilerin varlığı da belirlenmiştir. Tuzlagözü oluk örneğinde yoğun farklı çubuk şelillerinde bakteri örnekleri gözlenmiştir.

Kültür-bağımlı çalışmalar sonucu çok sayıda izolat elde edilmiştir. *Archaea* grubuna ait izolatlar *Haloarcula sp.*, *Haloarcula japonica*, *Haloarcula californiae*, *Haloferax mediterranei*, *Halorubrum sp.*, *Halobacterium salinarum*; *Bacteria* grubuna ait izolatlar *Halomonas salina*, *Halomonas caseinilytica*, *Halomonas taeanensis*, *Halomonas elongata*, *Salinibacter ruber*, *Rhodovibrio sodomensis*, *Rhodovibrio salinarum*, *Salinivibrio sp.*, *Salicola marasensis*, *Idiomarina sp.*, *Marinobacter algicola*, *Chromohalobacter sp.*, kültür-edilmemiş *Bacteroidetes*, *Parvularcula sp.* olarak belirlenmiştir. Düşük tuz konsantrasyonlarında bakteriler daha iyi ve yoğun gelişirken yüksek tuz konsantrasyonunda arkeler daha iyi gelişim göstermiştir.

Çorum Sungurlu örneğinde baskın gelişen *Archaea* örneklerinin % 18 tuzlulukta *Halorubrum* ve % 25 tuzlulukta *Haloarcula* olduğu belirlenmiştir. Baskın *Bacteria* örneği ise *Salicola*'dır. *Salinibacter ruber* de bu ortamdan izole edilen örnekler arasındadır. *Salinibacter ruber* gelişim için en az 15%, optimum gelişim için % 15–30 tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duymaktadır (Anto'n ve ark. 2002). Yüksek konsantrasyonda tuz ihtiyacı ve oluşturduğu pembe renkli kolonileri ile diğer halofilik bakterilerden ayrılır. *Haloquadratum walsbyi*, Medyum DBCM2 sıvı besiyerinde gözlenmiştir, ancak saf kültür halinde izole

edilememiştir. Bakterilerden bir izolat kültüre edilmemiş *Bacteroidetes* grubuna ait bir örnektir.

Burns ve ark. tarafından (2004) ilk kez kültür edilen *Haloquadratum walsbyi* hücreleri haloarchaea grubu içerisinde geliştirilmesi en güç olanlardandır. Sıvı kültürde gelişmeyi tercih ettiklerini ve kültürasyon sürelerinin diğer arkelere göre yaklaşık olarak iki kat daha uzun olduğunu, agarlı besiyeri üzerinde gelişmelerinin çok yavaş olduğunu ve küçük kolonilerin oluşmasının 4-12 haftayı bulduğunu belirlemişlerdir.

Kemah havuz örneğinde, kültürel çalışmalarda *Archaea* grubunun, kaynak örneğinde ise *Bacteria* grubunun baskın gelişim gösterdiği belirlenmiştir. *Halorubrum* ve *Halobacterium* baskın örneklerdir. *Halobacterium* %25 gibi yüksek tuz konsantrasyonunda iyi gelişim göstermektedir. *Halomonas* %18 ve *Salicola* %23 tuz konsantrasyonunda baskın olan *Bacteria* örnekleridir.

Tuzlagözü örneğinde, *Archaea* grubundan *Haloarcula* ve *Bacteria* grubundan *Salicola* baskın gelişim göstermiştir. Düşük tuz konsantrasyonunda *Rhodovibrio sodomensis* iyi gelişmektedir. Bakterilerden bir izolat kültüre edilmemiş *Bacteroidetes* grubuna ait bir örnektir.

Delice örneğinde ise *Halomonas* baskın *Bacteria* örneğidir. *Salinivibrio* ve *Salicola* ortamdan izole edilen diğer bakterilerdir. İzole edilen tek *Archaea* üyesi *Haloferax mediterranei*'dir; izole edilen bu mikroorganizmanın biyoteknolojik önemi yüksektir. Delice örneğinde *Haloferax mediterranei*'nden başka *Archaea* örneğine rastlanmamıştır.

Salicola marasensis Maras solar tuzlalarının kristalize havuzlarından ilk kez Maturrano ve ark. (2006(b)) tarafından izole edilmiştir. Maras tuzları hipersalin kaynak suları ile beslenmektedir. *Salicola marasensis* yaptığımız çalışmada birçok örnekten izole edilmiştir.

Haloferax mediterranei büyük miktarda poli- β -hidroksi bütirikasit (PHB) ve poli- β -hidroksialkanat (PHA) içerirler. PHA, biyolojik olarak parçalanabilir plastikler için bir kaynaktır. (Dworkin ve ark., 2006(a)). PHB, termoplastiklerin (biyolojik polyester) üretiminde kullanılabilir. *Haloferax mediterranei* değerli birçok polisakkariti üretme potansiyeline sahip bir mikrororganizmadır.

Ürettikleri ekzopolisakkaritlerden dolayı koloniler mukozal bir görünüme sahiptir (Anton ve ark., 1988).

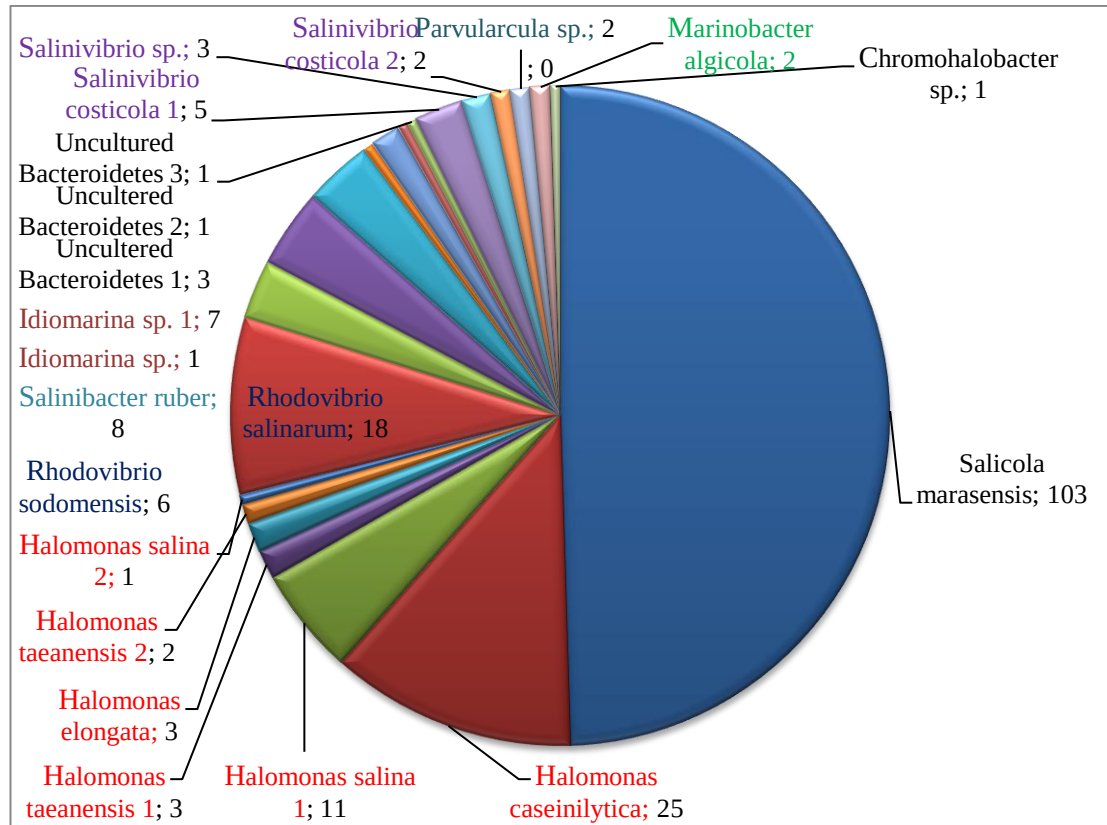
İkinci örnekleme sonrası Delice örneği hariç Fadlum, Bingöl, Akçakoyunlu, Tuzlagözü örneklerinin hepsindeki baskın Archaea örneği *Haloarcula*'dır. % 25 tuz konsantrasyonunda ise *Halobacterium*, Fadlum, Bingöl, Akçakoyunlu örneklerinde gelişim göstermektedir. *Salicola* baskın Bacteria örneklerinden biridir; Delice, Bingöl, Akçakoyunlu, Tuzlagözü örneklerinde varlığı saptanmıştır. *Idiomarina*, *Marinobacter*, *Chromohalobacter*, *Salinivibrio* ve *Halomonas* 'a ait örnekler farklı ortamlardan izole edilmiştir. Bakterilerden bir izolat kültüre edilmemiş *Bacteroidetes* grubuna ait bir örnektir. Bir diğer Bacteria izolatının dizisi, Blast programı ile karşılaştıma yapıldığında en yakın karşılığının *Parvularcula sp.* olduğu ve düşük benzerlik verdiği belirlenmiştir.

Kültür-bağımlı çalışmalar sonucu farklı kaynak tuzlaları analiz edildiğinde Archaea grubuna ait izolatların %18-%25 tuzluluk arasında iyi geliştiği belirlenmiştir. *Haloarcula* ve *Halobacterium* cinslerine ait türler kültürlerde baskın bir şekilde ortaya çıkmıştır. *Halobacterium* sadece % 25 SW agar'da güzel bir gelişim göstermiştir. Bu da gelişim için yüksek tuz ihtiyacı olduğunun göstermektedir. Bacteria grubuna ait izolatların farklı ve geniş bir aralıkta tuz konsantrasyonunda (%2-%23) gelişebildikleri gözlenmiştir. *Salicola* cinsi en yaygın Bacteria örneğidir. Farklı *Halomonas* türleri de birçok örnekten izole edilmiştir.

Halomanos elongata ektoin üretir. Ektoin enzim stabilize edici(moleküler şaperon) ve kozmetik ürünlerde nemlendirici olarak yakın zamanda ticari olarak üretilmeye başlanmıştır (Oren, 2002).

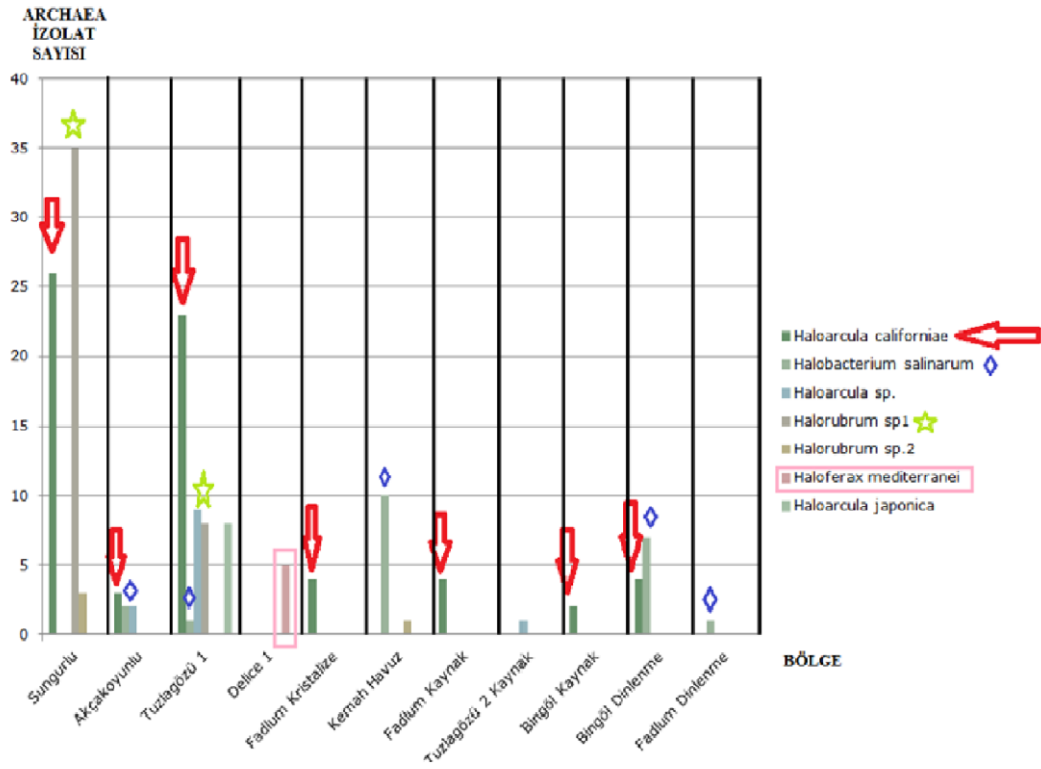
İzole edilen *Haloferax* ve *Halomonas* örneklerinin PHB üretimi açısından çalışılması ilerleyen çalışmalarda hedeflenmektedir.

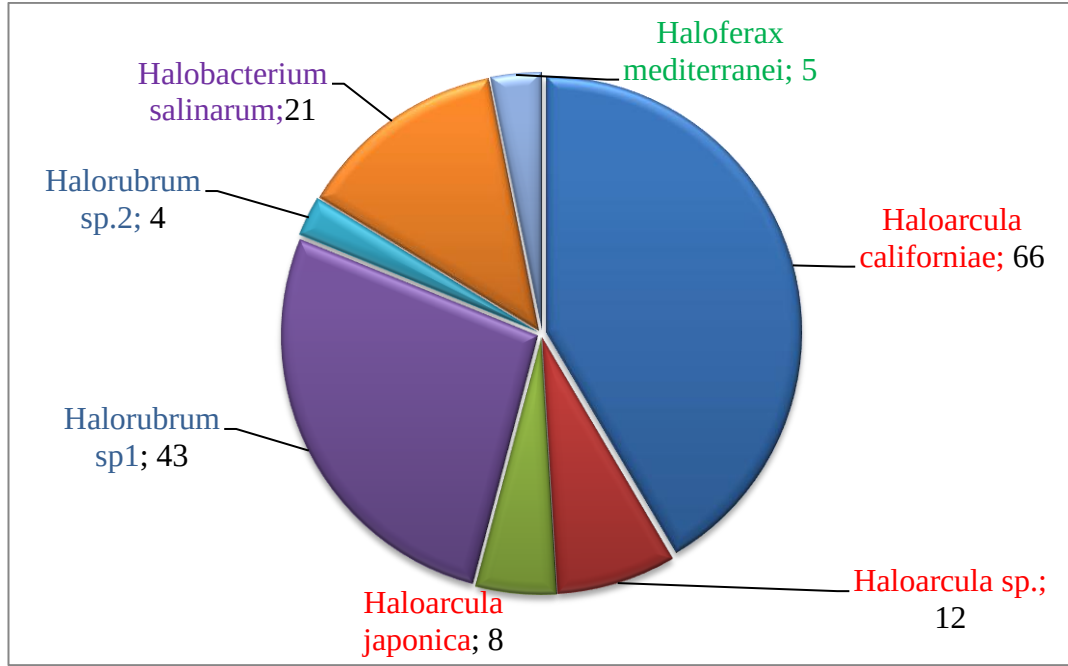
16S rRNA geni dizilenen 3 izolatın dizi bilgisi, NCBI genbankasındaki verilerle karşılaştırıldığında herhangi bir kültüre edilmiş örnekle örtüşmemektedir. Bu örneklerin dizi bilgisi, 16S rRNA geni klon kütüphanesinden elde edilmiş, kültüre edilememiş *Bacteroidetes* grubuna ait bazı dizilerle örtüşmektedir. Örtüşen diziye sahip örneklerden biri, Great Salt Plain (Oklahoma, USA) tuzlasının toprak örneğinin 16S rRNA geni klon kütüphanesinden elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Tanımlanan *Bacteria* izolatları ve sayıları

Tablo 4.3. Farklı *Archaea* izolatlarının bölgelere göre dağılımı ve elde edilen izolat sayılarının grafiksel gösterimi





Şekil 4.2. Tanımlanan Archaea izolatları ve sayıları

Maturrano ve ark. (2006(a)) kültür-bağımlı çalışmalar sonucu kaynak tuzlasından elde ettikleri izolatları *Haloarcula marismortui*, *Halobacterium salinarum*, *Halorubrum trapanicum*, ve *Halogeometricum borinquense*, *Pseudomonas* sp., *Marinococcus halophilus*, *Rhodovibrio salinarum* ve *Salinibacter ruber* olarak belirlemişlerdir.

Ölü Deniz'in batı kıyısındaki Hamei Mazor hipersalin sülfür kaynak sularından ve dış kanallarından filamentli siyanobakteriler (*Oscillatoria*-tipi) ve *Thiohalocapsa benzeri* hareketsiz mor sülfür bakteriler elde edilmiştir. (Oren 1989, 1990). Günümüzde bu kaynak nerdeyse kurumuş haldedir. Bu kaynaktan iki ilginç anoksijenik fotosentetik prokaryot izole edilmiştir; *Rhodovibrio sodomensis* (basonim *Rhodospirillum sodomense*) (Mack ve ark., 1993) ve *Ectothiorhodospira marismortui* (Oren ve ark., 1989; Ventura ve ark., 2000). *Ectothiorhodospira marismortui* uyumlu çözünür madde (compatible solute) olarak $N\alpha$ -karbomil glutamin amid üreten bilinen tek organizmadır (Galinski ve Oren, 1991).

La Malá (Granada) tuzlasını besleyen tuzlu yeraltı suyu kuyuları 180g/L tuz içermektedir. Su örneğinden farklı tuz konsantrasyonu içeren agarlı besiyerleri üzerine ekimi ve oluşan kolonilerin karakterizasyonu sonucu izole edilen

organizmaların 70%'i deniz suyu tuz konsantrasyonuna adapte olduğu, %30'nun ılımlı halofil olduğu belirlenmiştir (del Moral ve ark., 1987).

Kanada'nın yüksek Arktik kesimlerindeki soğuk tuzlu kaynak sularının mikrobiyal çeşitliliği çalışılmıştır. Su ve sediment örneklerinden, heterotrofik bakteriler ve ototrofik sülfür-oksitleyen bakteriler izole edilmiştir. İzolatlar, *Actinobacteria*(%12), *Bacteroidetes*(%12), *Firmicutes*(%18) ve *Proteobacteria* (%58) filumlarına aittir. Heterotrofik izolatlar psikrotolerant, halotolerant, fakültatif anaerobtur. *Gillisia*, *Psychrobacterium*, *Marinobacter*, *Sporosarcina* ve *Halothiobacillus* cinsleri oldukça fazla çeşitliliğe sahiptir. Fakat klon kütüphanesinde bu grupların üyelerine rastlanmamıştır. Sülfür oksitleyen bakterilerden gelen DNA'nın yoğunluğu, bu örneklerin varlığını maskeliyor olabilir. Ancak heterotrofik bakterilerin kültürü, sülfür-oksitleyen bakterilerin gelişimini destekleyen besinleri içermeyen heterotrofik besiortamları üzerinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. *Marinobacter* türleri kaynak sularının sedimentlerinden kültürü en fazla gerçekleştirilen heterotroflardır ve diğer kutup ortamlarında da yaygın bir şekilde bulunduğunu belirlemişlerdir (Perreault ve ark., 2008).

DGGE analizi sonucu baskın Archaea grubunun *Halorubrum* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Haloquadratum walsbyi* ve *Halonotius pteroides* türlerinin de ortamda varlığı DGGE analizi sonucu ortaya çıkarılmıştır. DGGE ile varlığı belirlenen bu türlerin kültürasyonu gerçekleştirilememiştir. *Haloquadratum walsbyi* için Burns ve ark. (2007)'nin ortaya koyduğu kültür yöntemleri kullanılmıştır. Burns ve ark. (2010) *Halonotius* strainlerini solar tuzlalardan izole etmişlerdir. *Halonotius pteroides* hücreleri yassı, çubuk şeklinde morfolojiye sahiptir. Faz kontrast mikroskobu ile uzun, yassı hücreler, kanat şeklinde bir görünüm sergilemektedir. DGGE Bacteria örneklerinden sadece tek bir bant dizilenebilmiştir. Kemah kaynak örneğine ait bu bandın dizi bilgisinin gen bankasındaki en yakın karşılığı *Salicola* örneğine aittir.

Halorubrum ve *Salicola* örneklerinin hem kültür bağımlı hem de kültür bağımsız yöntemlerle ortamdaki varlığı belirlenmiştir.

İki örnekleme sonrasında da DGGE Bacteria analizi yapılmıştır. Dizileme aşamasına kadar bir problemle karşılaşılmamıştır. Ancak dizilemede olumlu

sonuç alınamamıştır. DGGE jelinden bantler kesilirken uzun süreli UV'ye maruz kalmalarının DNA'lara hasar verebileceği göz önünde bulundurularak, DGGE jeli yürütme sonrası küçük parçalara ayrılarak kesme işlemi öyle gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla bantların UV'ye maruz kaldığı süre kısaltılmıştır. Ancak dizilemede yine sonuç alınamamıştır. DNA miktarının yetersiz gelebileceği düşünülerek dizileme reaksiyonuna sokulan DNA miktarı artırılmıştır; ancak sonuç alınamamıştır. Bacteria re-pcr ürünlerinin Archaea'ya göre verimi daha düşüktür. Özellikle son yapılan Bacteria re-pcr ürünleri agaroz jele yüklendiğinde smear gözlenmiştir. PCR koşullarının tekrar gözden geçirilip birtakım optimizasyonlar yapılması gerektiği de düşünülmektedir. Daha sonra tekrarlanacak olan bu analizde bu durumlar göz önünde bulundurulacaktır.

Peru'daki Maras tuzlalarındaki mikrobiyota 16S rRNA geni klon kütüphanesi kurularak analiz edilmiştir. *Haloquadra walsbyi* ortamdaki dominant Archaea'dır. Klon kütüphanesindeki diğer baskın (%31) Archaea örneğinin ise, solar tuzlaların klon kütüphanelerinde rastlanmayan *Halobacterium* sp. olduğunu belirlenmiştir. Tüm bakteriyal klonlar, gamma-proteoBacterium grubuna ait *Pseudomonas halophila* DSM 3050 ile yakın ilişkilidir (Maturrano ve ark., 2006(a)).

Bu çalışmada 16S rRNA klon kütüphanesi kurmaya yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Ancak birkaç kez denenmesine rağmen verimli sonuç elde edilememiştir. Çeşitliliği en bol görünen örneklerden iki tanesi seçilip hem Archaea hem de Bacteria için 16S rRNA klon kütüphanesi kurulmaya çalışılmıştır. Farklı kitlerle yapılan klon kütüphanesi çalışmaları sonrasında istenen sonuçlar elde edilememiştir. TA klonlama sonrasında koloni verimi açısından sorun yaşanmışken farklı bir klonlama kiti kullanıldığında ise insert içermeyen ya da plazmid ekstraksiyonları negatif sonuçlanan koloniler elde edilmiştir. Kompetent hücrelerimizin kompetentlik durumlarının değişebileceği göz önüne alınarak CaCl₂ metodu ile yeni kompetent hücreler hazırlanmasına rağmen istenen sonuçlar elde edilememiştir. Klonlama ile ilgili optimizasyon çalışmaları devam etmektedir. Çünkü mevcut haliyle bu çalışmada klonlamadan elde edilen veriler oldukça yetersizdir. Mikrobiyal çeşitliliğin tam anlamıyla belirlenebilmesi için yüksek sayıda klonun analizine ihtiyaç vardır.

Sonuç;

1. Bu çalışma, farklı kaynak tuzlalarının mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi üzerine ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. Çeşitliliği belirlemek için hem kültür bağımlı hem de moleküler yöntemler kullanılmıştır.

2. 397 izolatu temsil eden 28 farklı profilin 16S rRNA geninin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir ve bunların Archaea domaininden *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum* ve *Halobacterium*; Bacteria domaininden *Halomonas*, *Salinibacter*, *Rhodovibrio*, *Salinivibrio*, *Salicola*, *Idiomarina*, *Marinobacter*, *Chromohalobacter* genusuna ait oldukları belirlenmiştir.

3. DGGE yöntemi ile Archaea jelinin analiz sonucu *Halorubrum*'un oldukça baskın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Haloquadratum walsbyi* ve *Halonotus pteroides* ve *Salicola sp.*'nin varlığı ortaya konmuştur.

4. FISH analizlerine göre mikroorganizma yoğunluğu havuz örneklerinde oldukça yoğun, kaynak örneklerinde ise düşük sayıdadır. Archaea grubuna ait kare şekilli mikroorganizmalar birçok örnekte baskındır.

5. 16S rRNA geni dizilenen 3 izolatın dizi bilgisi, NCBI genbankasındaki verilerle karşılaştırıldığında herhangi bir kültüre edilmiş örnekle örtüşmemektedir. Daha önce klon kütüphanesinde temsil edilmiş ancak kültür edilememiş 3 izolat, kültür edilebilmiştir.

Gelecekte yapılması planlanan çalışmalar;

Kültür bağımlı çalışmalar sonucu 44 farklı ARDRA profiline ait temsilcilerden 28'inin çoğunun 16S rRNA geni dizilenmiştir. Dolayısıyla diğer farklı profillere ait temsilcilerin dizilemesi daha tamamlanamamıştır. Bu temsilcilerin dizilemesi gerçekleştirilecektir. Ayrıca kültüre edilmemiş *Bacteroidetes* grubuna ait izolatların ayrıntılı tanımlanması gerçekleştirilecektir. Bu çalışma sonucu elde edilen izolatların, biyoteknolojik çalışmalarda kullanım potansiyeli üzerine çalışmalar yapılması planlanmaktadır. *Haloferax* ve *Halomonas* gibi PHB üretim potansiyelleri yüksek olan izolatlar üzerinde çalışmalar yapılması planlanmaktadır.

Bacteria grubunun DGGE sonrası dizileme işlemleri birçok kez denenmiş ancak verimli sonuç alınamamıştır. Birtakım optimizasyonlar gerçekleştirerek bu grubun dizileme çalışmaları tekrarlanacaktır.

FISH ile analiz sonucu tuzla havuzlarında kare şekilli mikroorganizmaların baskın olduğu belirlenmiştir. DGGE ile de *Haloquadratum walsbyi* 'nin ortamlar da mevcut olduğu belirlenmiştir. İlerleyen çalışmalarda *Haloquadratum walsbyi* 'nin kültüre edilip saf izolat olarak eldesine çalışılacaktır.

Çeşitliliği en bol görünen örneklerden 16S rRNA klon kütüphanesi kurulmaya çalışılmıştır. Oldukça düşük sayıda klon elde edilmiştir, bu da mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında veimsiz bir sonuçtur. Verimi artırmaya yönelik gerekli optimizasyonlar yapıp 16S rRNA klon kütüphanesi kurulması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- Anton, J., Meseguer, I., Rodriguez-Valera, F., (1988) *Production of an Extracellular Polysaccharide by Haloferax mediterranei*, Applied Environmental Microbiology, Oct., p. 2381-2386
- Anton, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodriguez-Valera, F., Amann, R., Rossello-Mora, (2002) R., *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds., Int. J. of Syst. and Evo. Microbio., 52, 485–491
- Arahal, D.R., Garcia, M.T., Vargas, C., Canovas, D., Nieto, J.J., Ventosa, A., (2001), *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 1457–1462,
- Arahal, D.R., Garcia, M.T., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Ventosa, A., (2001b). *Transfer of Halomonas canadensis and Halomonas israelensis to the genus Chromohalobacter as Chromohalobacter canadensis comb. Nov and Chromohalobacter israelensis comb. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1443–1448.
- Arahal, D.R., Ventosa, A., (2006) *The Family Halomonadaceae*, Dworkin, M. (Editor-in-Chief); Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E.(Editors), *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Volume: Proteobacteria: Gamma Subclass*, Springer Science+Business Media
- Baliga, N.S., Bjork, S.J., Bonneau, R., Pan, M., Iloanusi, C., Kottmann, M.C., (2004) *Systems level insights into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon Halobacterium NRC-1.* Genome Res **14**: 1025–1035.

- Bath, C., Cukalac, T., Porter, K., Dyall-Smith ML., (2006) *His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, Salterprovirus*
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Brown, M. V., Nichols, D. S., McMeekin, T. A. (1997). *Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice*. Appl Environ Microbiol 63, 3068–3078.
- Buczolits, S., Denner, E. B. M., Vybiral, D., Wieser, M., Kampfer, P., Busse, H.-J., (2002), *Classification of three airborne bacteria and proposal of Hymenobacter aerophilus sp nov.* Int J Syst Evol Microbiol 52, 445–456.
- Burns, D. G., Camakaris, H. M., Janssen, P. H., Dyall-Smith, M. L., (2004), *Combined Use of Cultivation-Dependent and Cultivation-Independent Methods Indicates that Members of Most Haloarchaeal Groups in an Australian Crystallizer Pond Are Cultivable.*, App. and Env. Microbio., Sept. p. 5258–5265
- Burns, D. G., Janssen, P. H., Itoh, T., Kamekura, M., Li, Z., Jensen, G., Rodri'guez-Valera, F., Bolhuis, H., Dyall-Smith, M.L., (2007) *Haloquadratum walsbyi gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 387–392
- Burns, D. G., Janssen, P. H., Itoh, T., Kamekura, M., Echigo, A., Dyall-Smith, M.L., (2010), *Halonotius pteroides gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon recovered from a saltern crystallizer*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 1196–1199
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T.(Editors), (2001), *The ProteoBacteria, Part B, The GammaproteoBacteria, BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriumiology*, Second Edition, Volume Two

- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., (Editors), (2001(b)), *The Proteobacteria, Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*, *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology*, Second Edition, Volume Two
- Brussaard, C.P.D., Payet, J.P., Winter, C., Weinbauer, M.G., (2009), *Quantification of aquatic viruses by flow cytometry*
- Caton, T.M., Witte, L.R., Ngyuen, H.D., Buchheim, J.A., Buchheim, M.A., Schneegurt, M.A., (2004), *Halotolerant Aerobic Heterotrophic Bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma*, *Microbial Ecology*
- Cho, J.C., Giovannoni, S.J., (2003), *Parvularcula bermudensis gen. nov., sp. nov., a marine bacterium that forms a deep branch in the α -Proteobacteria*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1031–1036
- Cohen, Y., Rosenberg, E. (Eds.), (1989), *Microbial mats. Physiological ecology of benthic microbial communities*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Çabuk, A., (2004) *Protein bilgisayarlara doğru*, Bilim ve Teknik, Nisan
- DasSarma, S., (2001) *Halophiles*, *Encyclopedia of life sciences*, Nature Publishing Group
- DasSarma, S., DasSarma, P. (2006) *Halophiles*. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester
- Del Moral, A., Quesada, E., Bejar, V., Ramos-Cormenzana, (1987), A., *Evolution of Bacterial flora from a subterranean saline well by graduated salinity changes in enrichment media*. *J. Appl. Bacteriology*. 62: 465- 471,
- Dyall-Smith, M., (2009), *The Halohandbook- Protocols for Haloarchaeal Genetics*, Version 7.1, [http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook /index.html](http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/index.html)

- Dworkin, M. (Editor-in-Chief); Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E.(Editors), 2006(a), *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, Oren, A., *The Order HaloBacteriales*, Springer Science
- Dworkin, M. (Editor-in-Chief); Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E.(Editors), 2006(b), *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Volume 4: Bacteria: Firmicutes, CyanoBacteria*, Oren, A., *The Order Halanaerobiales*, Springer Science
- Ergin, Z., (1988), *Tuzun üretim Teknolojisi ve İnsan Sağlığındaki Yeri*, Cilt XXVII, Sayı 1, Madencilik Mart
- Falb, M., (2005), *Computational Genome and Pathway Analysis of Halophilic Archaea*
- Farooq, A., (1997) *Kinetic studies of the folding of the membrane protein Bacteriumiorhodopsin*
- Galinski, E.A., Oren, A., (1991), *Isolation and structure determination of a novel compatible solute from the moderately halophilic purple sulfur Bacterium Ectothiorhodospira marismortui*. Eur. J. Biochem. 198: 593-598
- Garrity, G. M., Holt, J. G. (2001), *The road map to the Manual. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1, pp. 119– 166. Edited by D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. New York: Springer
- Green, D.H, Bowman, J.P., Smith, E.A., Gutierrez, T., Bolch, C.J.S., (2006), *Marinobacter algicola sp. nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxinproducing dinoflagellates*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 523–527

- Horikoshi, K., Aono, R., Nakamura, S. (1993), *The triangular halophilic archaeobacterium Haloarcula japonica strain TR-1*. *Experientia* 49: 497-502
- Horikoshi, K. (2011) *Extremophiles Handbook*, Springer
- Ivanova, E.P., Romanenko, L.A., Chun, J., Matte, M.H., Matte, G.R., Mikhailov, V.V., Svetashev, V.I., Huq, A., Mangel T., Colwell, R.R., (2000). *Idiomarina gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, Idiomarina abyssalis sp. nov. and Idiomarina zobellii sp. nov.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 901–907.
- Kivistö, A. T., Karp, M. T., (2010), *Halophilic anaerobic fermentative Bacteria*, *Journal of Biotechnology*, Elsevier
- Kolbe, M., Besir, H., Essen, L.O., Oesterhelt, D. (2000) *Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution*. *Science* 288: 1390–1396.
- Koru, E., (2004) *Çamaltı Tuzlası (İzmir, Türkiye) Ekosisteminde Artemia ve Önemi*
- Kottemann, M., Kish, A., Iloanusi, C., Bjork, S., DiRuggiero, J. (2005) *Physiological responses of the halophilic archaeon Halobacterium sp. strain NRC1 to desiccation and gamma irradiation*. *Extremophiles* 9: 219–227.
- Kuhsner ,DJ., Kamekura, M., (1988), *Physiology of halophilic euBacteria*. In: *Rodriguez-Valera F (ed) Halophilic Bacteria*, vol 1. CRC Press, Boca Raton, pp 109–138
- Lee, J-C., Jeon, CO., Lim, J-M., Lee, S-M., Lee, J-M., Song, S-M., Park, D-J., Li, W-J., Kim, C-J., (2005), *Halomonas taeanensis sp. nov., a novel moderately halophilic Bacterium isolated from a solar saltern in Korea*,

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 2027–2032

- Liaw, H.J., Mahw, R.A., (1992), *Isolation and Characterization of HaloanaeroBacterium chitinovorans gen. nov., sp. nov., a Halophilic, Anaerobic, Chitinolytic Bacterium from a Solar Saltern*, Applied and environmental microbiology, Jan., p. 260-266 Vol. 58, No. 1
- Ma, Y., Galinski, E.A., Grant, W.D., Oren, A., Ventosa, A., (2010), *Halophiles 2010: Life in Saline Environments*, Applied and environmental microbiology, Nov., p. 6971–6981
- Mack, E.E., Mandelco, L., Woese, C.R., Madigan, M.T., (1993), *Rhodospirillum sodomense, sp. nov., a Dead Sea Rhodospirillum species*. Arch. Microbiol. 160: 363-371
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., (2010), *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Palme Yayıncılık
- Mahirogulları, M. A., (2003), *İlk Çağlardan Günümüze Sivas İli Kitabı*. Sivas
- Margesin, R., Schinner, F., (2001) *Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology*, Extremophiles, 5:73–83, Springer
- Maturrano, L., Santos, F., Rossello'-Mora, R., Anton, J., (2006 (a)), *Microbial Diversity in Maras Salterns, a Hypersaline Environment in the Peruvian Andes*, Applied and environmental microbiology, June, p. 3887–3895 Vol. 72, No. 6
- Maturrano, L., Valens-Vadell, M., Rossello' -Mora, R., Anto'n, J., 2006(b), *Salicola marasensis gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic Bacterium isolated from the Maras solar salterns in Peru*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 1685–1691
- Mellado, E., Moore, E. R. B., Nieto, J. J., Ventosa, A., (1996), *Analysis of 16s rRNA Gene Sequences of Vibrio costicola Strains:Description of*

Salinivibrio costicola gen. nov., comb. nov., International journal of systematical bacteriology, p. 817-821

- 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., Baptiste, E., Doolittle, W.F., Charlebois, R.L., Legault, B., Rodriguez-Valera, F., (2005), *The genome of Salinibacter ruber: Convergence and gene exchange among hyperhalophilic Bacteria and archaea*
- Muyzer, G., Hottentrager, S., Teske, A., Wawer, C., (1996), *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rDNA-A New Molecular Approach to Analyse the Genetic Diversity of Microbial Communities.*, Mol. Microb. Ecol. Manual, 3.4.4.:1-23.
- Mutlu, M.B., Martínez-García, M., Santos, F., Peña, A., Guven, K., Antón, J., (2008), *Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey*
- Norman, T.N.; Gökçen, S.L., Genalp, M., (1980), *Sedimentation pattern in Central Anatolia at the Cretaceous-Tertiary boundary: Cretaceous Research*, 1, 61-84.
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J.L., Mah, R.A., (1994), *Anaerobic Bacteria from Hypersaline Environments*, Microbiological reviews
- Oren, A., (1989), *Photosynthetic and heterotrophic benthic Bacterial communities of a hypersaline sulfur spring on the shore of the Dead Sea* (Hamei Mazor), pp. 64-76
- Oren, A., (1990), *Anaerobic degradation of organic compounds in hypersaline environments: possibilities and limitations*, pp. 155-175 In: Wise, D.L. (Ed.), *Bioprocessing and biotreatment of coal*. Marcel Dekker, New York

- Oren, A., (2002), *Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 56–63
- Oren, A., Heldal, M., Norland, S., Galinski, E.A., (2002), *Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic Bacterium Salinibacter ruber*. *Extremophiles* 6: 491–498.
- Oren, A., (2003), *Halophilic Microorganisms and their Environments*, Kluwer Academic Publishers
- Oren, A., (2008), *Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity*,
- Oren, A., Litchfield C. D., (1999) *A procedure for the enrichment and isolation of Halobacterium*, *FEMS Microbiology Letters*, 173, 353-358.
- Otozai, K., Takashina, T., Grant, W.D., (1991), *A novel triangular archaeobacterium, Haloarcula japonica*, pp. 63-75 In: Horikoshi, K., and Grant, W.D. (Eds.), *Superbugs. Microorganisms in extreme environments*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin
- Pernthaler, P., Glöckner, F.O., Schönhuber, W., Amann, R., (2001) *Fluorescence in situ Hybridization (FISH) with rRNA-targeted Oligonucleotide Probes*, *Marine Microbiology*, *Methods in microbiology* Volume 30, Academic Press Ltd
- Perreault, N.N., Greer, D.W., Andersen, D.T., Tille, S., Lacrampe-Couloume, G., Lollar, B.S., Whyte, L.G., (2008), *Heterotrophic and Autotrophic Microbial Populations in Cold Perennial Springs of the High Arctic*, *Applied and environmental microbiology*, Nov., p. 6898–6907
- Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G., Imhoff, J.F., (1985), *Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern*, *Microb. Ecol.* 11:107-115.

- Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Kushner, D.J. (1983), *Halobacterium mediterranei spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile*. Syst. Appl. Microbiol. 4: 369-381.
- Sanda, R.A., Short, S.M., Schroeder, D.C., (2009), *Fingerprinting aquatic virus communities*
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989), *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Schafer, H., Muyzer, G., (2001), *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Marine Microbial Ecology, Marine Microbiology, Methods in microbiology* Volume 30, Academic Press Ltd
- Stchepinsky, V., (1939), *Sivas Vilâyeti İdrokarbürleri, Liğnitleri ve Tuzlu Menbaları*, Ankara
- Sharma, A.K., Walsh, D.A., Baptiste, E., Rodriguez-Valera, F., Doolittle, W.F., Papke, R.T., (2007), *Evolution of rhodopsin ion pumps in haloarchaea*
- Sklarz, M.Y., Angel, R., Gillor, O., Soares, I.M., (2011), *Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for identification and phylogenetic placement of 16S rRNA Clones*, Chapter 7, Bruijn, F.J., (Editor), *Handbook of Molecular Microbial Ecology I Metagenomics and Complementary Approaches* Several Chapters 1, Wiley-Balckwell
- Sonnenfeld, P., (1984), *Brines and Evaporites*. Orlando, FL, USA: Academic Press
- Steiner, M., Oesterhelt, D., Arikawa, M., Lanyi, J.K., (1984), *Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein, I. Effects on the chromophore*. J Biol Chem 259: 2179–2184
- Strobel, H.J., Mielenz, J.R., (ed.), (2009), *Basic Laboratory Culture Methods for Anaerobic Bacteria*, Biofuels: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 581,

- Şenalp, M., (1981), *Çankırı-Çorum Havzası'nın Sungurlu Bölgesindeki Karasal Formasyonların Sedimentolojik incelenmesi*, Maden Tetkik ve Arama Enstitüsü, Ankara, Türkiye Jeoloji Kurumu Bülteni, C. M65-14, Şubat
- Takashina, T., Hamamoto, T., Otozai, K., Grant, W.D., Horikoshi, K., (1990), *Haloarcula japonica* sp. nov., a new triangular halophilic archaeobacterium. Syst. Appl. Microbiol. 13: 177-181.
- Tsai, C-R., Bharat, J-L., Patel, K.C., Cayol, J-L., Baresi, L., Mah, R.A., (1995), *Haloanaerobium alcaliphilum* sp. nov., an Anaerobic Moderate Halophile from the Sediments of Great Salt Lake, Utah, International Journal of Systematical Bacteriology, p. 301-307,
- Torreblanca, M.F., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M., Kates, M. (1986), *Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov., Syst. Appl. Microbiol. 8: 89-99.
- Tsiamis, G., Katsaveli, K., Ntougias, S., Kyrpides, N., Andersen, G., Piceno, Y., Bourtzis, K., (2008), *Prokaryotic community profiles at different operational stages of a Greek solar saltern*
- Vaneechoutte, M., Rossau, R. P., Vos, D., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., Rouck, A. D., Fiers, T., Claeys, G. ve Kersters, K., (1992), *Rapid identification of Bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA)*. FEMS Microbiol. Lett. 93: 227-234
- Vaisman, N., Oren, A., (2009), *Salisaeta longa* gen. nov., sp. nov., a red, halophilic member of the Bacteroidetes, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 2571–2574
- Valderrama, M.J., Quesada, E., Bejar, V., Ventosa, A., Gutierrez, M.C., Ruizberruero, F., Ramoscormenzana, A., (1991), *Deleya salina* sp.

nov., a moderately halophilic Gram-negative bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 377–384.

Ventosa, A., (2006), *Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments*

Ventura, S., Viti, C., Pastorelli, R., Giovannetti, L., (2000), *Revision of species delineation in the genus Ectothiorhodospira*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 583-591

Wagner, M, Horn, M., Daims, H., (2003), *Fluorescence In Situ Hybridisation for the Identification and Characterisation of Prokaryotes.*, *Current Opinion in Microbiology*, 6:302–309

Wu, Y.H., Xu, X.W., Huo, Y.Y., Zhou, P., Zhu, X.F., Zhang H.B., Wu M., (2008), *Halomonas caseinilytica sp. nov.*, a halophilic bacterium isolated from a saline lake on the Qinghai–Tibet Plateau, China *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1259–1262

Yalçın, E., Ertem, M.E., (1997), *Deniz Tuzlalarının Türkiye Tuz Potansiyelindeki Yeri, Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu*, 16-17 Ekim, izmir Türkiye

Zhou, P., Xua, X.W., Wua, M., Huang, W.D., Oren, A., (2009), *Isolation and functional expression of the bop gene from Halobiforma lacisalsi*,

<http://www.maden.org.tr/resimler/ekler/22.pdf> (Barutoğlu, Ö.H., Türkiye tuz yatakları), 2012

<http://www.bioinformaticscourses.com/ISB/sp2002/1C8R/index.html>; Goodreid, M., *Bacteriorhodopsin, The Purple Membrane Protein*, 2012

<http://www.turkiyetuz.com/kaynak/kaynak.asp>, 2012

<http://textbookofBacteriumiology.net /procaryotes.html>, 2012

<http://serc.carleton.edu/microbelife/extreme/ hypersaline>, 2012

www.haloarchaea.com, 2012

<http://www.bioinformaticscourses.com/ISB/sp2002/1C8R/index.html>, 2012

http://gcat.davidson.edu/mediawiki-1.15.0/index.php/Haloarcula_californiae, 2012