

**HALOFİLİK MİKROORGANİZMA İZOLATLARININ EKTOİN ÜRETİM
YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ezgi TOSUN

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2022

ÖZET

HALOFİLİK MİKROORGANİZMA İZOLATLARININ EKTOİN ÜRETİM YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ezgi TOSUN

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2022

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Bu çalışmada Tunceli’de 1750 m rakımda bulunan Pülümür kaynak tuzlarından Haziran ayında alınan su numunelerinden halofilik mikroorganizmaların izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen izolatların 16S rRNA gen analizine dayalı karakterizasyonları gerçekleştirilerek çalışılmak üzere 2 halofilik suş seçilmiştir. Seçilen *Halomonas sp. P-6-8-3* ve *Chromohalobacter israelensis Ba1* suşları ektoin üretim yetenekleri açısından incelenmiştir. Farklı iki besiyeri kullanılarak yapılan bakteriyel sağım (hiperozmotik ve hipoozmotik şok uygulanarak) yöntemiyle elde edilen ektoinlerin analizi HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemi ile yapılmıştır. HPLC analizleri sonucunda her iki suşunda ektoin ürettiği, üretilen ektoin konsantrasyonunun besiyerleri arasında ve farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren çözeltilerle yapılan hipoozmotik şoklar arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Bakteriyel sağım, Biyoteknoloji, Ektoin, Halofilik mikroorganizmalar, Uyumlu çözünen madde.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ECTOINE PRODUCTION CAPABILITIES OF HALOPHILIC MIKROORGANISM ISOLATES

Ezgi TOSUN

Department of Advanced Technologies

Programme in Biotechnology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, January 2022

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

In this study, halophilic microorganisms were isolated from water samples taken in June from the Pülümür spring salts at an altitude of 1750 m in Tunceli. Characterization of the obtained isolates based on 16S rRNA gene analysis was performed, and 2 halophilic strains were selected to be studied. Selected *Halomonas* sp. P-6-8-3 and *Chromohalobacter israelensis* Ba1 strains were examined for their ectoine production abilities. Ectoines obtained by bacterial milking (by applying hyperosmotic and hypoosmotic shock) method using two different media were analyzed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) method. As a result of HPLC analysis, it was determined that both strains produced ectoine, and the concentration of ectoine produced differed between the media and between hypoosmotic shocks with solutions containing different concentrations of NaCl.

Keywords: Bacterial milking, Biotechnology, Ectoine, Halophilic microorganisms,
Compatible salute.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca maddi ve manevi anlamda her zaman bana destek olan, beni cesaretlendiren, tecrübesi ve bilgileriyle bana rehber olan, bilim insanı kişiliğini ve insanîyetini hayatım boyunca örnek alacağım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya

Çalışmalarım sırasında laboratuvarlarının kapılarını bana açarak bilgi ve birikimleriyle desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ayça ÖZCAN'a

Bugünlere gelmemde emeği geçen tüm hocalarıma,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım Ece ŞENEL ve Şenay ESER'e

Doğduğum günden bugüne kadar maddi ve manevi anlamda her zaman yanımda olan, bana her zaman güvenen, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Ezgi TOSUN

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ezgi TOSUN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
DANIŞMAN ONAYI	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Halofilik ve Halotolerant Mikroorganizmalar	2
1.2. Halofilik Mikroorganizmaların Sınıflandırılması.....	3
1.3. Halofilik Mikroorganizmaların Adaptif Özellikleri	4
1.4. Halofilik ve Halotolerant Mikroorganizmaların Biyoteknolojideki Kullanımları ve Uygulama Alanları.....	4
1.5. Ektoin ve Ektoin Sentezi Yapan Mikroorganizmalar	6
1.6. Ektoinin Görevleri ve Kullanım Alanları	9
1.7. Bakteriyel Sağım Yöntemi.....	11
1.8. Ektoinin Saflaştırılması	12
1.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	13
2. MATERYAL VE METOD	16
2.1. Materyal.....	16
2.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri	16
2.1.1.1. <i>Halomonas medium</i>	16
2.1.1.2. <i>MG1 medium (Monosodium Glutamat medium 1)</i>	16

2.1.1.3. <i>MG2 Medium (Monosodyum Glutamat medium 2)</i>	17
2.1.1.4. <i>%8,9'luk MM63 (Minimal Medium 63) (L)</i>	17
2.1.1.5. <i>%17,5'luk MM63 (Minimal Medium 63) (L)</i>	18
2.1.1.6. <i>Luria Bertani medium (%8,9luk) (L)</i>	18
2.1.2. Çalışmada kullanılan solüsyonlar	18
2.1.2.1. <i>%0, %1,5 ve %3 NaCl içeren tuzlu su solüsyonlar</i>	18
2.1.2.2. <i>TAE 50X</i>	19
2.1.3. Çalışmada kullanılan primerler	19
2.2. Metod	19
2.2.1. Çalışma alanı	19
2.2.2. Su örneğinin tuzluluk oranının ölçümü	20
2.2.3. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi ile ilgili metodlar	20
2.2.3.1. <i>Kaynak tuzlası su örneklerinden izolasyon ve saflaştırma</i>	20
2.2.3.2. <i>PCR ile 16S rRNA geninin amplifikasyonu (çoğaltılması)</i>	21
2.2.3.3. <i>Dizi analizi</i>	22
2.2.3.4. <i>Mikroorganizmaların epifluoresan mikroskopunda incelenmesi</i>	23
2.2.4. Mikroorganizmaların ektoin üretim yeteneklerinin belirlenmesi ile ilgili metodlar	24
2.2.4.1. <i>Biyokütle ve ektoin üretimi</i>	24
2.2.4.2. <i>Bakteriyel sağım aşaması</i>	24
2.2.4.3. <i>Ektoinin HPLC ile belirlenmesi</i>	26
3. BULGULAR	28
3.1. Su Örneğinin Tuzluluk Oranının Belirlenmesi	28
3.2. Mikrobiyal Çeşitlilik İle İlgili Bulgular	28
3.2.1. <i>Kaynak tuzlası su örneklerinin izolasyon ve saflaştırması</i>	28
3.2.2. <i>PCR ile 16S rRNA geninin amplifikasyonu(çoğaltılması)</i>	29
3.2.3. <i>Dizi analizi sonuçları</i>	30
3.2.4. <i>Mikroorganizmaların epifluoresan mikroskopunda incelenmesi</i>	33
3.3. Mikroorganizmaların Ektoin Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi İle İlgili Bulgular	34
3.3.1. <i>Biyokütle ve ektoin üretimi</i>	34

3.3.2. Bakteriyel sağım aşaması.....	35
3.3.3. Ektoinin HPLC ile belirlenmesi	37
4. TARTIşMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKÇA.....	47
ÖZGEÇMİş	



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. <i>Halofilik mikroorganizmaların tarihçesi</i>	2
Tablo 2.1. <i>Kullanılan primerler ve baz dizilimi</i>	19
Tablo 2.2. <i>PCR karışımının hazırlanması</i>	21
Tablo 2.3. <i>Bakteri 16S rRNA için PCR koşulları</i>	22
Tablo 2.4. <i>Ektoinin tespitinde kullanılan HPLC analizi gradient elüsyon şartları</i>	27
Tablo 3.1. <i>Dizi analizine gönderilen örneklerin analiz sonrası BLAST sonuçları</i>	31
Tablo 3.2. <i>Ticari ektoin ile hazırlanan ektoin çözeltilerine ait kalibrasyon verileri</i>	37
Tablo 4.1. <i>MM63 besiyeri tek döngü (bir hiperozmotik şok, üç hipoozmotik şok) ektoin konsantrasyonu</i>	44
Tablo 4.2. <i>MM63 besiyeri üç döngü (tek döngüsünde bir hiperozmotik şok, bir hipoozmotik şok) ektoin konsantrasyonu</i>	45
Tablo 4.3. <i>MG besiyeri tek döngü (bir hiperozmotik şok, üç hipoozmotik şok) ektoin konsantrasyonu</i>	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Renk koduyla tanımlanmış, her cinsin en az bir türünde görülen ekstremofilleri ve dirençli özellikleri gösteren filogenetik ağaç.....	1
Şekil 1.2. Hayatın üç alanı içinde halofillerin dağılımı.....	3
Şekil 1.3. Ektoinin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.4. Ektoin ve hidroksiektoin için biyosentetik yol.....	8
Şekil 1.5. Bakteriyel sağım prosesi.....	12
Şekil 1.6. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemi.....	14
Şekil 2.1. Pülümür Kaynak Tuzlaları.....	20
Şekil 2.2. Çalışmada kullanılan sonikatör (ultrasonik homojenizatör).....	26
Şekil 3.1. İzolasyonu ve saflaştırması yapılan bazı izolatların <i>Halomonas medium</i> (agar) görüntüleri.....	29
Şekil 3.2. 16S rRNA geninin amplifikasyonunun agaroz jel elektroforezi sonucunda UV görüntüleri.....	30
Şekil 3.3. Dizi analizi sonuçlarına ait kromatogramların BioEdit programı görüntüsü.....	31
Şekil 3.4. Epifluoresan mikroskobu görüntüleri.....	34
Şekil 3.5. Biyokütle ve ektoin üretimi aşamalarında MM63 besiyeri içerisinde yer alan bakteri kültürleri.....	35
Şekil 3.6. Farklı tuzluluklarda hipoozmotik şoklarda bakteriyel sağım yapılan <i>Chromohalobacter israelensis</i> Ba1 ve <i>Halomonas sp. P-6-8-3</i> suşlarına ait görüntüler.....	36
Şekil 3.7. Standart ektoin çözeltisine ait kromatogram.....	37
Şekil 3.8. Ticari ektoin ile hazırlanan çözeltilere ait kalibrasyon grafiği ve denklemi.....	38

Şekil 3.9. Numunelere ait kromatogram örnekleri.....	39
Şekil 3.10. MM63 besiyerlerinde tek döngü sonucu elde edilen toplam ektoin konsantrasyonları grafiği.....	40
Şekil 3.11. MM63 besiyerlerinde üç döngü sonucu elde edilen toplam ektoin konsantrasyonları grafiği.....	40
Şekil 3.12. MG besiyerlerinde tek döngü sonucu elde edilen toplam ektoin konsantrasyonları grafiği.....	41



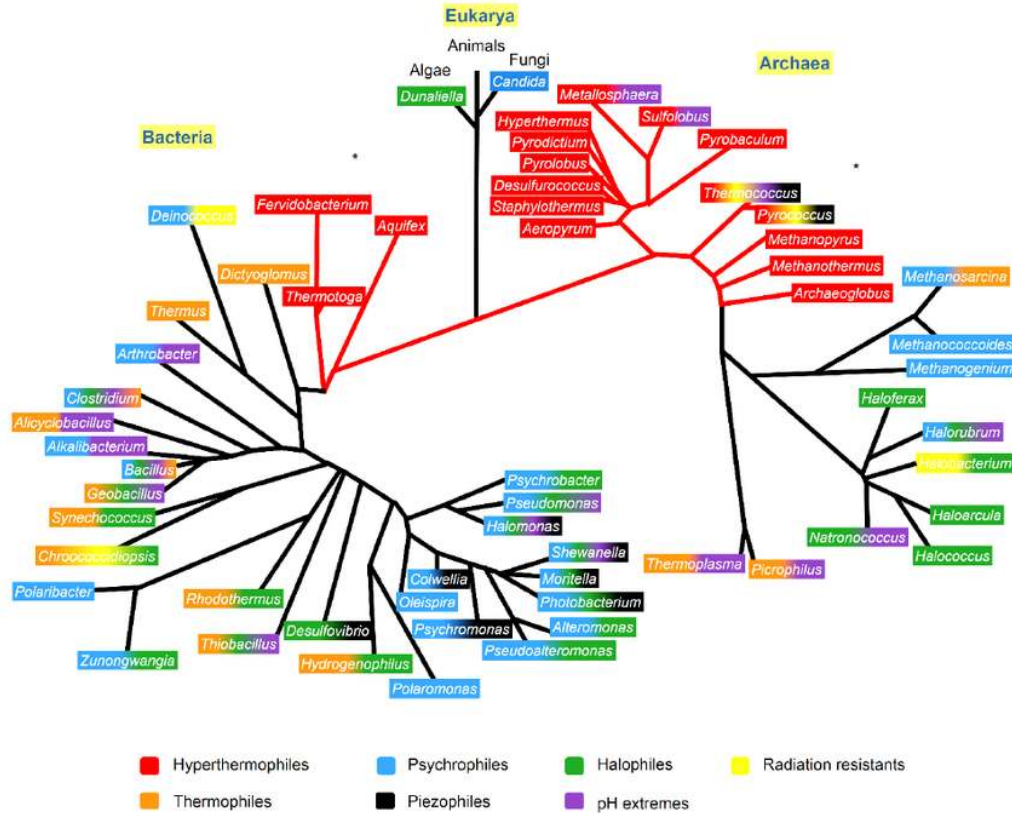
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

K^+	: Potasyum iyonu
NH_4^+	: Amonyum iyonu
Li^+	: Lityum iyonu
Na^+	: Sodyum iyonu
NaCl	: Sodyum klorür
Na_3 -citrate	: Trisodyum sitrat
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	: Magnezyumsülfat heptahidrat
K_2HPO_4	: Dipotasyum fosfat
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
KOH	: Potasyum hidroksit
NaOH	: Sodyum hidroksit
$Fe(NH_4)(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	: Amonyum demir(II) sülfat hekzahidrat
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	: Demir(II)sülfat heptahidrat
$(NH_4)_2SO_4$	: Amonyum sülfat
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	: Manganez(II) sülfat heptahidrat
16S rRNA	: 16S ribozomal ribonükleikasit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
TAE	: Tris-Asetik asit-EDTA
μm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
μl	: Mikrolitre
g	: Gram
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
L	: Litre
ml	: Mililitre
dk	: Dakika
M	: Molar
μM	: Mikromolar
ng	: Nanogram

m	: Metre
nm	: Nanometre
kb	: Kilobaz
A	: Amper
V	: Volt
w/v	: Hacimde ağırlıkça yüzde
µl/ml	: Mikrolitre/mililitre
ml/dk	: Mililitre/dakika
g/L	: Gram/litre
mol/L	: Mol/litre
g/L/d	: Gram/litre/day (gün)
rpm	: Revolutions per minute (dakikada devir sayısı)
ppm	: Parts per million (milyonda bir parça)
PBS	: Phosphate-buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
UV	: Ultraviyole
NCBI	: National center for biotechnology in information
BLAST	: Basic logal alignment search tool
DAPI	: 4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur
OD	: Optical density
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
LC-MS	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
M.Ö.	: Milattan önce
MG	: Monasodyum glutamat
MM	: Minimal medium
ILAB	: İyonik sıvı bazlı sulu iki fazlı sistem
(Bmim) BF ₄	: 1-bütıl-3-metilimidazolyum tetrafloroborat
Abeta	: Beta-Amiloidpeptit
PHB	: Polihidroksibütirat
LDH	: Laktik dehidrojenaz
PFK	: Fosfofruktokinaz

1. GİRİŞ

Diğer mikroorganizmaların hayatta kalamayacağı yüksek sıcaklık, tuz, basınç, asidik ve alkali pH gibi zorlu ortamlarda hayatta kalarak gelişme gösterebilen mikroorganizmalar ekstremofilik mikroorganizmalar olarak adlandırılır (Van den Burg, 2008; Cowan vd., 2015). Ekstremofiller; termal sular (termofiller), deniz buzları (psikrofiller), aşırı tuzlu sular (halofiller), asidik sıcak su kaplıcaları (asidofiller), soda gölleri (alkalifiller), derin su sedimentleri (barofiller) gibi ekstrem çevrelerde gelişmeye adapte olmuşlardır. Şekil 1.1’de renk koduyla tanımlanmış, her cinsin en az bir türünde görülen ekstremofiller ve dirençli özelliklerini gösteren filogenetik ağaç yer almaktadır (Dalmaso vd., 2015). Ekstremofilik mikroorganizmalar zorlu çevre koşullarında hayatta kalabilmek için çeşitli enzimler ve koruyucu biyomoleküller üretirler (Raddadi vd., 2015). Bu enzimlerin ve koruyucu biyomoleküllerin endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarına son yıllarda sıklıkla rastlanmaktadır.



Şekil 1.1. Renk koduyla tanımlanmış, her cinsin en az bir türünde görülen ekstremofilleri ve dirençli özellikleri gösteren filogenetik ağaç (Dalmaso vd., 2015)

Tablo 1.1. *Halofilik mikroorganizmaların tarihçesi (Edbeib vd., 2016)*

Tarih	Keşif	Kaynak
M.Ö. 2700	Bilinen en eski halofilik mikroorganizmanın keşfi	Bass-Becking, 1931
Antik Mısır Dönemi	Halofilik mikroorganizmaların izolasyonu ile ilgili rapor edilen en eski bilgi (Pierce)	Pierce, 1914
1920 sonları 1940 başları	Birçok farklı kaynaktan (hayvan postları, balık vb.) halofilik mikroorganizmaların izolasyonu	Baumgartner, 1937
1932-1935	Tuzun doyma noktasına ulaştığı hipersalin ortamlarda yaşayan halofilik mikroorganizmaların keşfi (Peter ve Hof)	Peter, 1932; Hof, 1935
1936	Ölü Deniz'den bazı ekstrem halofillerin (<i>Halobacterium trapanicum</i> ve <i>Micrococcus morrhuae</i>) ve ılımlı halofillerin (<i>Chromohalobacterium marismortui</i> , <i>Pseudomonas halestrogus</i> , ve <i>Flavobacterium halmephium</i>) izole edilmesi (Benjamin Elazari)	Volcani, 1940, 1944
1980	Ölü Deniz'in mikrobiyal ekoloji araştırmaları (Antonio Ventosa ve arkadaşları)	Ventosa vd., 1998, 2015
1980 ve sonrası	Hipersalin ortamların ekolojisi, fizyolojisi, biyokimyası, mikrobiyolojisi çalışmaları (Oren ve arkadaşları)	Oren, 1983, 2015; Oren ve Gurevich, 1995; Oren ve Litchfield, 1998
2000	Bildirilen ilk genom dizisi (halofilik arke olan <i>Halobacterium sp. NRC-1</i> suşuna ait)	Ng vd., 2000
2013-2015	Yarısı <i>Halomonas</i> cinsinin üyeleri olan sekiz halofilik türün genomu dizilenmesi	Oren, 2014; Edbeib, 2016

1.1. Halofilik ve Halotolerant Mikroorganizmalar

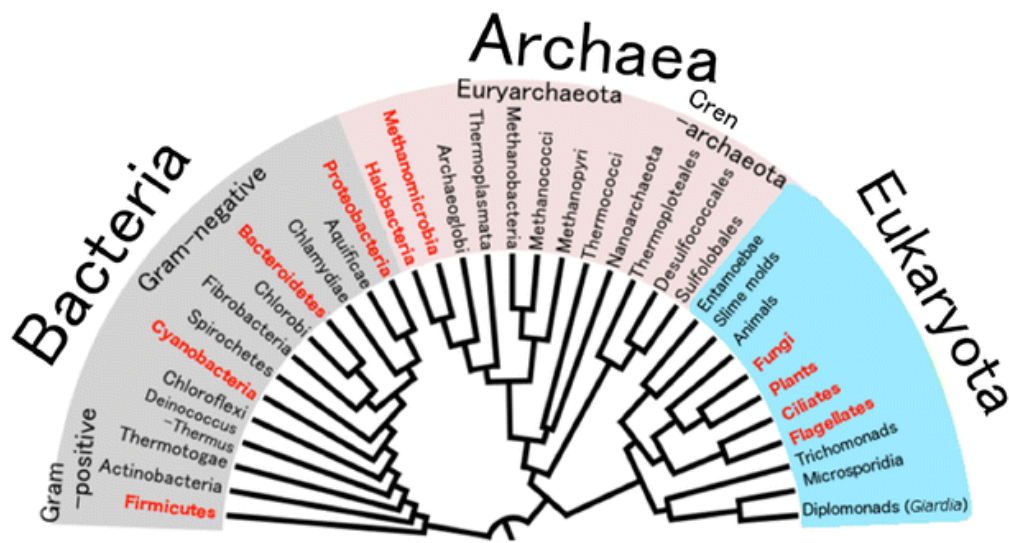
Halofiller; gelişmeleri için yüksek miktarlarda tuz konsantrasyonlarına ihtiyaç duyan, tuzcul çevrelerde yaşayabilmek için farklı stratejiler geliştirmiş olan hem prokaryotik hem ökaryotik organizmaları içinde barındıran gruptur (Mutlu, 2006). Yüksek tuz konsantrasyonu varlığında veya yokluğunda gelişebilen organizmalar halotolerant mikroorganizmalar olarak adlandırılır (DasSarma ve DasSarma, 2017). Halofilik bakteriler; morfolojik olarak basil veya kok görünümünde olup kendi optimal tuz derişimlerinin dışındaki derişimlerde morfolojilerini değiştirebilirler. Örneğin; üreme

ortamlarında Na⁺ veya K⁺ iyonları yerine NH₄⁺ veya Li⁺ ya da iki değerlikli katyonları bulunduran basil şeklindeki halofilik bakterilerin küresel (sferik) bir morfoloji aldığı gözlenmiştir (Mohr ve Larsen, 1963; Aksöz, 1985).

1.2. Halofilik Mikroorganizmaların Sınıflandırılması

Halofiller; büyümeleri ve gelişmeleri için farklı tuz konsantrasyonlarına ihtiyaç duyarlar. Kushner'e göre; halofiller, büyümeleri için ihtiyaç duydukları NaCl miktarlarına göre 4 sınıfa ayrılabilirler. Bunlar; halofil olmayanlar, hafif halofiller, ılımlı halofiller, ekstrem halofillerdir. Halofil olmayanlar; < 0,2M (<%1.2) NaCl konsantrasyonunda (bazıları daha yüksek konsantrasyonları tolare edebilen halotolerantlar), hafif halofiller; 0.2 – 0.5 M (%1.2 – 2.9) NaCl konsantrasyonunda (deniz bakterileri), ılımlı halofiller; 0.5 – 2.5 M (%2.9 – 13.6) NaCl konsantrasyonunda, ekstrem halofiller ise 2.5 – 5.2M (%13.6 – 30.4) (doygun) NaCl konsantrasyonlarında optimum gelişim gösterirler. (Kushner, 1985; Ventosa ve Nieto, 1995).

Halofilik mikroorganizmalar bakteri, arke ve ökarya arasındaki yaşamın tüm alanlarında bulunabilirler. Şekil 1.2'de küçük altbirim rRNA gen dizilimleri kullanılarak yapılmış filogenetik ağaçta hayatın üç alanı içinde bulunabilen halofillerin dağılımı gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Hayatın üç alanı içinde halofillerin dağılımı. Kırmızı ile açıklanmış gruplar en az bir halofil içerir. Ağaç, küçük alt birim rRNA gen dizileri kullanılarak inşa edildi. GNU Görüntü İşleme Programı (GIMP) ile ek bilgiler ve renkler eklendi. <http://www.gimp.org> (Ciccarelli vd., 2006; Edbeib vd., 2016)

1.3. Halofilik Mikroorganizmaların Adaptif Özellikleri

Halofilik mikroorganizmalar tuzcul çevrelerde yaşayabilmeleri için farklı stratejiler geliştirerek karşılaştıkları osmotik güçlere karşı koymak zorundadırlar. Bu stratejiler ‘‘Uyumlu Çözünmüş Madde’’ ve ‘‘Salt-in’’ stratejileridir. NaCl’ce zengin habitatlar gibi yüksek çözünür madde içeren ortamlarda yaşayan organizmalar osmotik güce karşı koyabilmek için intraselüler çözünür maddeleri sentezlemek veya biriktirmek zorundadırlar. Bu maddeler uyumlu çözünür maddeler olarak adlandırılır. Bu bileşikler yüksek osmotik şartlar altında hücrenin su kaybetme eğilimini, hücrenin çevresine göre pozitif su dengesini sağlayarak engellerler. Bu uyumlu çözünür maddelere ektoin, glisin-betain, gliserol vb. örnek verilebilir. Bazı halofilik mikroorganizmalar ise çözünür uyumlu madde olarak organik madde yerine çevreden sitoplazmaya pompaladıkları yüksek miktardaki K^+ iyonlarını kullanırlar. Bu sayede hücre içindeki K^+ konsantrasyonunun hücre dışındaki Na^+ konsantrasyonuna göre daha yüksek olması sağlanır ve bu iyonik durum pozitif su dengesinin korunmasını sağlar (Madigan ve Martinko, 2005; Karan vd., 2012).

1.4. Halofilik ve Halotolerant Mikroorganizmaların Biyoteknolojideki Kullanımları ve Uygulama Alanları

Halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmaların ürünleri ilgi çekici birçok biyoteknolojik uygulamalarda ve endüstriyel alanlarda yer bulmuştur. Halofilik mikroorganizmalardan özelleşmiş ürünler (bakteriyorodopsin, uyumlu çözünen maddeler vb.) sentezlenir. Sentezlenen ürünlerden biri olan bakteriyorodopsin adı verilen protein havalandırmanın yetersiz olduğu koşullarda *Halobacterium salinarum* ve bazı ekstrem halofiller tarafından üretilir ve retinal molekülü ile bağlanarak ışığı absorblayıp, protein motive gücün oluşmasını katalizler (Madigan ve Martinko, 2005). Ayrıca halografik real-time, foton değişimi, yapay retina ve halografik interferometri gibi özellikleri ile pek çok uygulama alanına sahiptir (Shakuri vd., 2016). Sitoplazmada uyumlu çözünen madde birikimi, halofilik mikroorganizmaların adaptasyon mekanizmalarından biri olup, bu maddeler çeşitli biyolojik yapılar için dengeleyici görevi görür ve ısıya, soğuğa, kurumaya, donmaya, tuzlara vb. ortamlara adapte olmayı mümkün kılar (Delgado-Garcia vd., 2012). Bu maddelere nemlendirici ve biyomoleküllerin

stabilitesinde kullanılan ve aynı zamanda bu çalışmada konusu olan ektoin ve türevleri, besin takviyesinde kullanılan glisin-betain ve yumuşatıcı, koruyucu ve önemli bir ticari besin kaynağı olan *Dunaliella salina* gliserolü örnek verilebilir (DasSharma vd., 2010).

Gıda endüstrisinde karşılaşılan halofilik mikroorganizmalara örnek halofilik laktik asit bakterileri verilebilir. Halofilik laktik asit bakterileri gelişmeleri ve canlılıklarını devam ettirebilmeleri için yüksek tuz (NaCl) konsantrasyonlarına ihtiyaç duyarlar. Fermente ürünlerden izole edilen halofilik laktik asit bakterileri arasında *Tetragenococcus* ve *Pediococcus* cinslerine ait türlere sıklıkla rastlandığı belirlenmiştir. Yüce ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada *T. halophilus*, *T. muriaticus*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus plantarum* türlerinin fermentasyon aşamalarında sıkça bulunduğunu tespit etmişlerdir. *Lactobacillus plantarum* halofilik bir laktik asit bakterisi olup, bağırsak florasını düzenlemek amacıyla probiyotik olarak kullanılmaktadır (Uchida vd., 2014; Yüce vd., 2017).

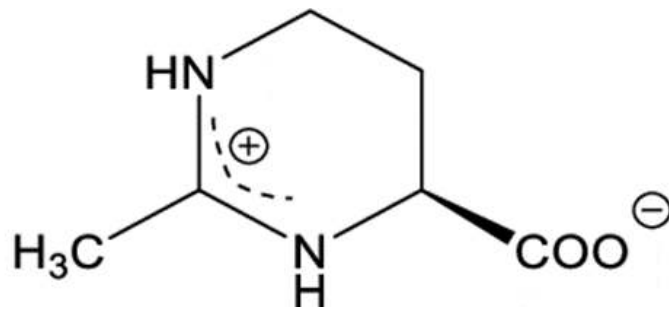
Halofilik mikroorganizmalara çeşitli çevresel uygulamalarda da sıklıkla rastlanmaktadır. Mikroorganizmalar çoğalma sırasında hidrofobik bileşiklerin parçalanmasını sağlama, ağır metalleri parçalama, yüzey gerilimi azaltma, emülsiyon ve biyofilm oluşturma, patojen mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını engelleme gibi farklı özelliklere sahip biyosüpfektanlar sentezlemektedir (Kahyaoğlu, 2008). Halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların sentezledikleri biyosüpfektanlar ise tuzcul çevrelerde yağ kirliliğinin iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca tekstil endüstrisinde %15-20 tuz konsantrasyonlarına sahip olan, fazla miktarda azo boyaları, fenol ve toksik anyonları içeren atık sulardan bazı ılımlı halofil türleri izole edilmiştir. İzole edilen bu türlerin fenolü birincil karbon kaynağı olarak kullandığı ve azo boyaların rengini giderdiği Guo ve arkadaşları (2008) tarafından bildirilmiştir.

Dünya çapında, enzimler için çok büyük bir yıllık harcama vardır. 2011 yılında BCC Research, özellikle endüstriyel uygulamalar açısından enzim pazarının geçtiğimiz yıl 3.3 milyar ABD dolarına yükseldiğini ve bu pazarın 2015 yılına kadar 4.4 milyar ABD dolarına ulaşması beklendiğini belirtmiştir (Delgado Garcia vd., 2012). Mikrobiyal enzimler, bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre daha yüksek katalitik aktivite göstermeleri, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, stabilite özellikleri, ekonomik olmaları ve fazla miktarlarda elde edilebilme özellikleriyle üstünlük sağlamaktadır (Yüce

vd., 2017). Ancak çoğu enzimin yüksek sıcaklık, asit veya alkalın pH seviyeleri gibi aşırı koşullara maruz kaldıklarında denatüre olup yüksek performans gösterememesi nedeniyle son yıllarda halofilik enzimler ilgi çekmeye başlamış ve araştırmalar halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar üzerine yoğunlaşmıştır (Delgado Garcia vd., 2012). Halofilik enzimler, zorlu endüstriyel koşullarda gösterdikleri yüksek aktivite, geniş substrat özgüllüğü ve kararlılıklarından dolayı deterjan katkılarında, biyoyakıt üretiminde, tekstil sanayisinde, atık arıtmada ve diğer birçok teknolojik uygulamada kullanılmaktadır.

1.5. Ektoin ve Ektoin Sentezi Yapan Mikroorganizmalar

Ektoin (kimyasal adı (4S)-2metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-karboksilik asit); birçok ekstremofilik mikroorganizma tarafından üretilen, ekstremolitler olarak da adlandırılan uyumlu çözünen maddeler sınıfına ait, düşük moleküler ağırlıklı, siklik bir aminoasit türevi olup kimyasal yapısı Şekil 1.3'te gösterilmiştir. Ektoin, ilk olarak halofilik ve fototrofik bir tür olan *Halorhodospira halochloris* (eski adıyla *Ectothiorhodospira halochloris*)'ten izole edilmiştir (Galinski vd., 1985). Daha sonra tuzlu ortamlarda yaşayan birçok halofilik ve halotolerant bakterilerin de ektoin ürettiği tespit edilmiştir.



Şekil 1.3. Ektoinin kimyasal yapısı (Chen vd.,2020)

Ektoinin büyük ölçekli biyoteknolojik üretimi için seçilecek mikroorganizmaların bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler şunlardır;

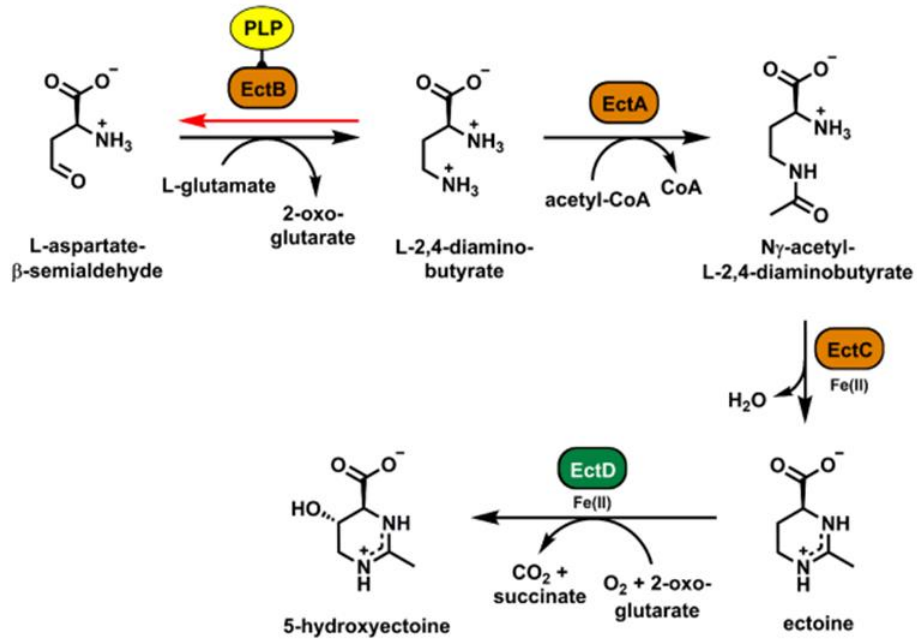
1. Geniş bir tuz toleransına sahip olmalı (Düşük ve yüksek tuzlu ortamlarda canlılığının devam etmesi ve iyi bir şekilde büyüyüp gelişmeleri)

2. Birikmiş çözünenlerin hızlı salınımı yoluyla hipoozmotik şoka yanıt vermeli

3. Ektoin üreticisi olan mikroorganizma, hiperozmotik bir ortama transfer edildikten sonra atılan uyumlu çözünenleri yeniden sentezleyebilmelidir (Sauer ve Galinski, 1998).

Bunlara ek olarak halofilik mikroorganizmaların patojen olmaması ve kontamine olma riskinin az olması da halofilik mikroorganizmaların çalışılmasında önemli bir rol oynar.

İlk olarak Galinski ve arkadaşları tarafından keşfedilen ektoin birçok orta derecede halofilik bakteri ve halotolerant bakteriler tarafından sentezlenir ve biriktirilir. Bu biriktirme süreçleri Şekil 1.4'te gösterilmiş olup, 3 aşamada gerçekleşmektedir; ilk olarak L-2,4-diaminobutirat transaminaz (Ect B) L-aspartat- β -semialdehitten L-2,4-diaminobutirata (DAB) katalizler. Ardından L-2,4-diaminobutirat asetiltransferaz (Ect A) ile N γ -asetil-L-2,4-diaminobutirata dönüştürülür. Son aşamada ise ektoin oluşturmak için ektoin sentaz (Ect C) tarafından katalize edilen döngüsel bir yoğunlaşma reaksiyonu gerçekleşir (Zhao ve ark., 2006; Richter ve ark., 2019). Ektoin üreticisi olan mikroorganizmaların önemli bir alt grubu, ektoin hidroksilazın (Ect D) aktivitesi ile ektoini 5-hidroksiektoine dönüştürerek ektoin ile birlikte hidroksiektoini de üreterek biriktirir (Becker vd., 2013).



Şekil 1.4. Ektoin ve hidroksiektoin için biyosentetik yol. EctB, ektoin biyosentezinin ilk adımını katalize eder; L-aspartat-β-semialdehit ve L-glutamatın PLP'ye bağlı geri dönüşümlü dönüşümüne aracılık eder (siyah ok). Kırmızı ok, aynı zamanda kofaktör PLP'ye (sarı) bağımlı olan ve bu çalışmada (Pl)EctB aminotransferazın biyokimyasal aktivitelerini değerlendirmek için kullanılan EctB enziminin (kırmızı) "ters reaksiyonunu" gösterir (Richter ve ark., 2019).

Bakteriler için alanında en yaygın olan ozmotik maddelerden biri olan ektoin; birçok halofilik ve halotolerant bakteri tarafından sentezlenmektedir. Ektoin sentezi yapan halofilik mikroorganizmalara; *Chromohalobacter israelensis*, *Chromohalobacter salexigens*, *Halorhodospira halochloris*, *Halomonas elongata* verilebilirken, ektoin sentezi yapan halotolerant mikroorganizmalara *Sporosarcina pasteurii*, *Brevibacterium epidermidis*, *Thioalkalimicrobium aerophilum*, *Vibrio cholerae* örnek verilebilir (Roberts, 2005). Yang ve arkadaşları (2010) yapmış oldukları çalışmalarda buğday samanı siyah liköründen izole ettikleri *Halomonas hydrothermalis* Y2 suşunun ektoin sentezinden sorumlu olan EctABC gen kümelerine ve bu gen kümelerinden uzak hidroksiektoin biyosentezinden sorumlu EctD genine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Daha sonra Zhao ve arkadaşları 2019 yılında yaptıkları çalışmalarda *Halomonas hydrothermalis* Y2 suşunda ektoin katabolizmasından sorumlu olan ektoin hidroksilaz (EctD) ve ektoin hidrolaz (DoeA) genlerini çerçeve içi silmiştir. Bu genlerin silinmesiyle

ektoin kullanımına yönelik yolları bozarak, ektoin sentezindeki verimi artırmışlardır (Liu vd., 2021).

Halomonas elongata'dan alınan ektoin sentezinde görev alan EctABC genleri, *Escherichia coli*'ye dahil edilerek rekombinant *Escherichia coli* oluşturulmuştur. Oluşturulan rekombinant *Escherichia coli*'nin tam hücre biyokatalizinin kullanılmasıyla, karbon kaynağı olarak aspartat ve gliserol kullanılarak büyük miktarlarda ektoin sentezlediğini tespit etmişlerdir. 1 litrelik hücreleri kullanarak, aynı hücre partisinden 3 döngü olarak sentezlenen ektoinlerden toplam 63.4g ektoin verimi elde edilmiştir (He vd., 2015). Yine patojen olmayan, gram pozitif bir toprak bakterisi olan *Corynebacterium glutamicum*'a ektoin ve hidroksiektoin sentezinden sorumlu EctABCD gen kümelerini *Pseudomonas stutzeri* A1501 suşundan alınıp dahil edilerek rekombinant *Corynebacterium glutamicum* suşu oluşturulmuştur. Ayrıca oluşturulan bu rekombinant suşlardan metabolik mühendislik yoluyla yan ürün oluşumu engellenmiştir. Rekombinant *Corynebacterium glutamicum* suşu, glikozu karbon kaynağı olarak kullanarak ektoin ve hidroksiektoin sentezlemiş ve sentezlenen bu ektoinlerin çoğunu ortama salgılamıştır (Becker vd., 2013).

1.6. Ektoinin Görevleri ve Kullanım Alanları

Ektoin artan dış ozmotik basınca karşı osmoprotektan olarak görev yapmakta, bunun yanı sıra hücreleri yüksek tuzluluk, termal denatürasyon, kuruma ve donmanın zararlı etkilerine karşı korumaktadır. Radyasyon, üre ve diğer denatüre edici ajanların biyomoleküllerin ve hücre bütünlüğünün üzerindeki zararlı etkilerini azaltmakta, aynı zamanda biyomoleküllerin stabilizasyonunu sağlamaktadır (Da Costa vd., 1998; Lentzen ve Schwarz, 2006; Pastör vd., 2010). Bu özellikleri sayesinde kozmetik, tıp ve endüstri gibi birçok alanda kendine yer bulmuştur ve bu alanlarda ektoinle ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Laktik dehidrojenaz (LDH) ve fosfofruktokinaz (PFK) enzimleri destabilize edici faktörlere (dondurma-çözme, ısıtma ve dondurarak kurutma gibi) karşı yüksek hassasiyet göstermektedir. Lippert ve Galinski (1992) yaptıkları çalışmalarda ektoinin stabilize edici özelliklerini LDH ve PFK enzimleri üzerinde incelemişlerdir. Dondurmanın ve çözünmenin (hızlı/yavaş) en inaktive edici olduğu kombinasyonlarını seçerek yaptıkları

Çalışmalarda ektoinin hem LDH hem de PFK enzimleri üzerinde en iyi koruma (%100) ve stabilize etme özelliği gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Kanapathipillai ve arkadaşları (2005), ektoin ve hidroksi ektoinin Abeta42 (beta-Amiloidpeptit42) agregasyonunun inhibasyonu ve insan nöroblastom hücrelerine toksisitesi üzerindeki etkilerini göstermek amacıyla yapmış oldukları çalışmalarda; ektoinin amiloid oluşumunu önlediği ve Alzheimer hastalığının başlamasını ve ilerlemesini geciktirdiğini tespit etmişler ve nörodejeneratif hastalıklarla ilgili olarak potansiyel inhibitörler olarak ektoin ve hidroksi ektoinin geliştirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (Bownik ve Stepniewska, 2016). Yine ektoin ve hidroksi ektoinin birlikte uygulandığı in vitro çalışmalarda bir hayvan modelinde immnotoksitlerin yan etkilerini azalttığı tespit edilmiş ve kanser terapötikleri için bir eksipiyen olarak uygulamaya sahip olabileceği belirtilmiştir (Barth vd., 2000; Waditee-Sirisattha vd., 2016).

Radyasyon, rüzgar, nem gibi dış etkenlerin sebep olduğu cildin yaşlanması, UV ışınlarının sebep olduğu hücre hasarlarının yanı sıra kimyasal içerikli kozmetik ürünlerden kaynaklı cilt kuruluğu başta olmak üzere hücrelerin yaşlanması ve ölümüyle beraber ciltte kırışıklık ve lekelenmelerin meydana gelmesi günümüzde çok karşılaşılan bir sorundur. Ektoin; cilt dehidrasyonuna yol açabilecek stres faktörlerine ve yüzey aktif maddelere karşı cilt direncini artırır ve cildi nemlendirir. Yapılan alışmalar ektoinin; gliserol ve membran stabilizatörü olan fosfotidilkolinden daha uzun süreli ve daha etkili nemlendirme özelliğine sahip olduğunu göstermiştir (Graf vd., 2008; Pastor vd., 2010; Bownik ve Stepniewska, 2016). Ayrıca Marini ve arkadaşlarının (2014) yapmış olduğu çalışmalar ektoin içerikli kremlerin cilt iltihabını hafiflettiği, hafif ve orta dereceli atopik dermatit (egzama) tedavisinde etkili olduğu ve yeni bir seçenek olarak kullanılabileceğini gösterdi. Schröter ve arkadaşları (2017), jel elektroforezi ve atomik kuvvet mikroskobu uygulayarak, ilk kez ektoinin iyonlaştırıcı elektron radyasyonunun neden olduğu DNA zincir kopmalarını önlediğini yaptıkları çalışmalarla kanıtlamışlardır.

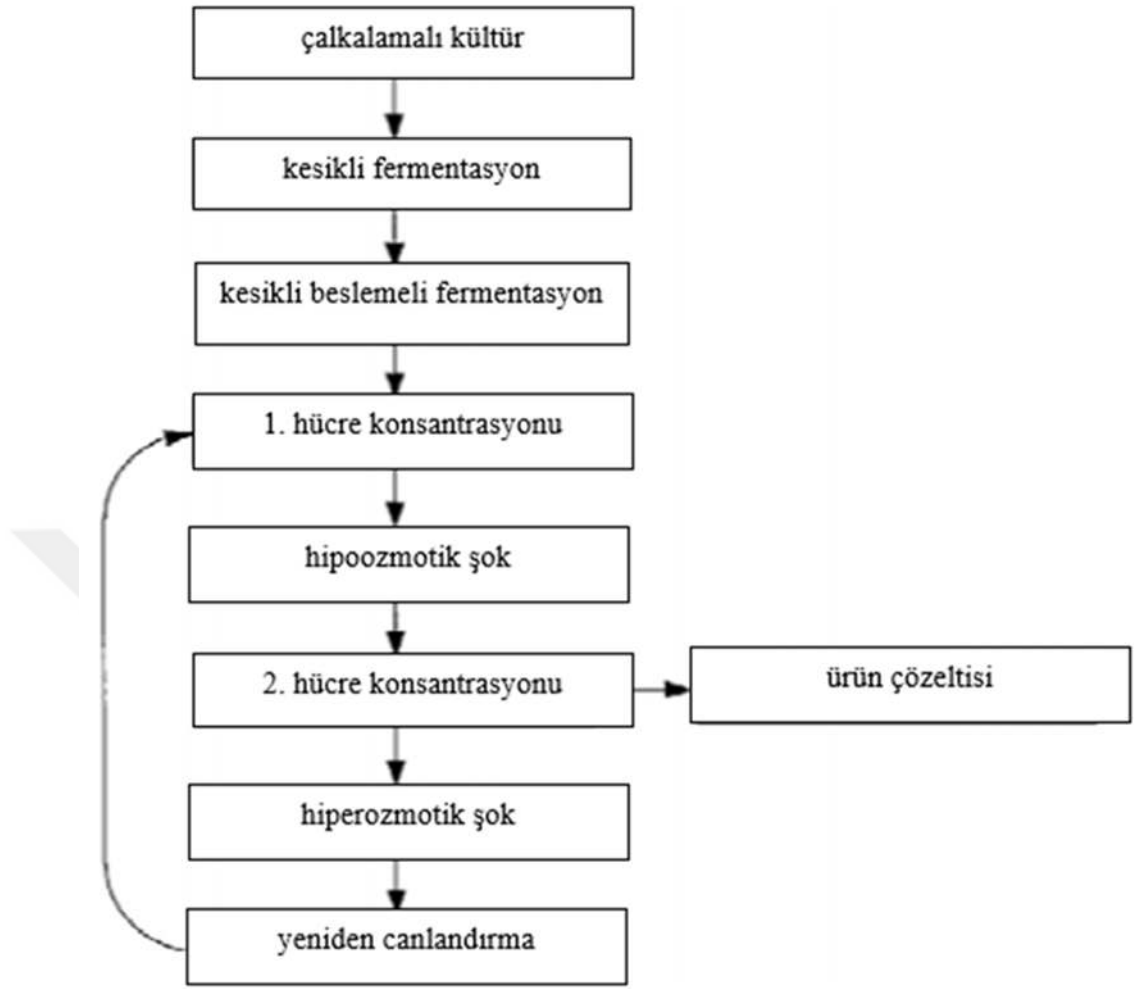
Günümüzde ektoin; güneşten korunmak, cilt kırışıklıklarını azaltmak ve cildi nemlendirmek için cilt bakım ürünleri başta olmak üzere, alerji tedavisinde kullanılan nazal spreylerin, göz damlalarının; soğuk algınlığının neden olduğu semptomları azaltmak için boğaz pastilleri ve spreylerinin içeriğinde bulunmaktadır. Alzheimer ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde potansiyel ilaçlardır. Son yıllarda ektoin hayvan

sağlığının korunmasında kullanılan birçok ürünün içeriğine de girmeye başlamıştır (Buenger vd., 2001; Kunte vd., 2014; http-1).

Ektoin; biyoteknoloji, kozmetik ve tıptaki geniş uygulamaları nedeniyle yüksek talep edilen bir ürün haline gelmiş olup yıllık yaklaşık 15.000 ton talep edilen ve yaklaşık 1000 USD/kg perakende fiyatlarıyla milyarlarca dolarlık bir pazarı temsil etmektedir (Strong vd., 2016; Liu vd., 2021). Czech ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış oldukları araştırmalar laboratuvar kimyasalları satıcılarının listelenen katalog fiyatlarının 1 kg ektoin için 9.000 Euro – 17.000 Euro arasında değiştiğini göstermiştir. Günümüzde, biyoteknoloji sürecine dayanan ana ektoin üreticisi Alman şirketi Bitop olup, ektoin üretiminde kullanılan organizma, Hollanda da yer alan güneş tuzu tesisinden izole edilen halofilik bir mikroorganizma olan *Halomonas elongata*'dır (Kunte vd., 2014).

1.7. Bakteriyel Sağım Yöntemi

1998 yılında Sauer ve Galinski tarafından gram negatif bir bakteri olan *Halomonas elongata* kullanılarak uyumlu çözünen maddelerin üretimi için "bakteriyel sağım" adı verilen biyoteknolojik bir yöntem kurulmuştur. Bu yönteme göre; uyumlu çözünen maddelerin üretimini yapan mikroorganizmalardan üretilen ektoin ve hidroksiektointi hasat etmek (toplamak) için çapraz akışlı filtrasyon tekniği ile birlikte ozmotik şok uygulanmıştır. Yüksek tuzlulukta bir ortama alınan *Halomonas elongata* ortamın tuzluluğuna yanıt olarak ektoin üretmiş olup hücrelere aşağı ozmotik şok (osmotic downshock) (düşük tuzlulukta bir ortama alınması) uygulandığında osmotik dengenin sağlanması için hücrelerin uyumlu çözünenleri hızla salgıladıklarını ve yüksek tuzlulukta bir ortamda yeniden inkübe edildiğinde bu çözünenleri tekrar sentezledikleri tespit edilmiştir. Daha fazla verim için bakteriyel sağım işlemi tekrarlanmıştır. Sauer ve Galinski'nin 1998 yılında kurmuş oldukları "bakteriyel sağım prosesi" Şekil 1.5'te gösterilmektedir. Bakteriyel sağım sürecinde; ektoin biyosentezini uyarmak için kullanılan yüksek tuzlu ortam, çelik fermentasyon tankları için aşındırıcı olmakla birlikte, atık su arıtımının zorluğunu da artırır. Bu nedenle araştırmacılar ektoinin verimli sentezlenmesi için gerekli tuzluluğu azaltmaya yönelik çalışmalar yapmaktadır (Liu vd., 2021).



Şekil 1.5. Bakteriyel sağım prosesi (Samuer ve Galinski, 1998)

1.8. Ektoinin Saflaştırılması

Biyoteknolojik üretim süreçlerinde ektoin ve hidroksiektoin karışımları elde edildiğinden dolayı ektoinin saflaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle ektoinin saflaştırılması, iki bileşiğin çözünürlük farklarına veya kromatografik izolasyona dayalı ek bir ayırma sürecini gerektirir (Onraedt, vd., 2005). Sauer ve Galinski (1998), ektoinin saflaştırılmasında katyon değişim kromatografisi ve kristalizasyonu içeren iki aşamalı basit bir prosedür kullanmışlardır. Bu prosedüre göre ilk aşama katyon değişim kromatografisi olup bu aşamada ektoinler katyon değişim reçinesine bağlanır ve kirlilikler yıkanarak uzaklaştırılır. Kirliliği uzaklaştırılan ektoinler elüe edilerek kristalizasyon aşamasına geçilir. Bu aşamada karışık ektoin çözeltisi (ektoin +

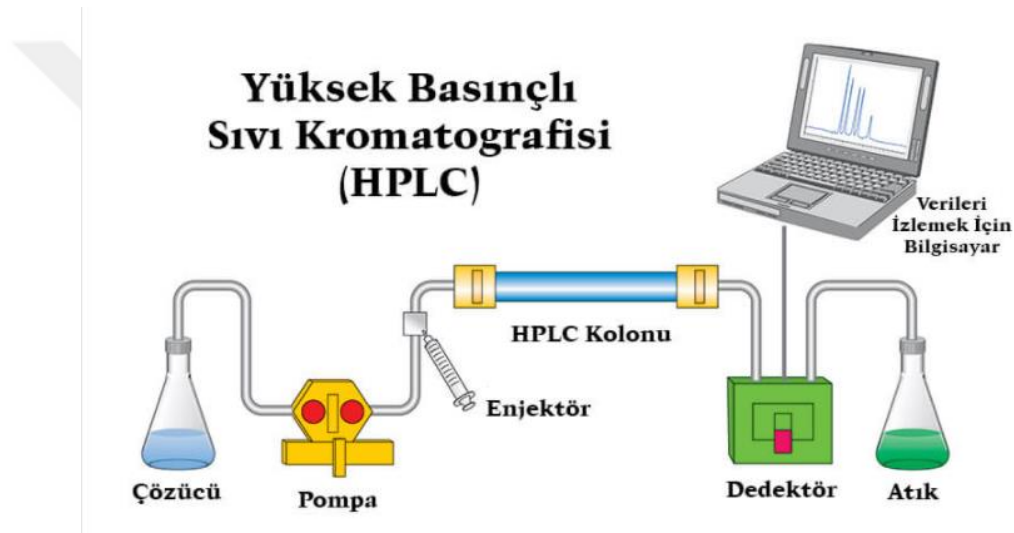
hidroksiektoin) liyofilize edilir ve daha sonra metanol içinde çözülür. Metanolün yavaşça buharlaştırılmasıyla çöken hidroksiektoin ayrılır ve kalan saf ektoini elde etmek için sudan kristalizasyon yapılır (Sauer ve Galinski, 1998; Onraedt vd., 2005).

Ektoinin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında Lang ve arkadaşları (2011), içi boş fiber ile ultrafiltrasyon, etanol ile sedimantasyon ve iyon değişimi ile ayırma aşamalarını kullanmışlardır. Literatürde ektoinin saflaştırılmasının etanol kristalizasyonu ve çok aşamalı iyon değişim kromatografisi gibi kimyasal ekstraksiyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirildiğini ve bunun genel üretim maliyeti ve istenmeyen ürün verimini arttırdığını belirten Ng ve arkadaşları (2020), çalışmalarında ektoin verimini artırmak ve ektoinin saflaştırılması için tek aşamalı iyonik sıvı bazlı sulu bifazik sistem (ILABS) kullanmışlardır. Ektoinin geri kazanılması için kullanılan ILAB sırasıyla sitrat ve sülfat tuzları ile (Bmim) BF₄'ten oluşmaktadır.

1.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografi, ilk olarak 1906 yılında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bitki pigmentlerinin ayrılmasında kullanılmasına karşın ilerleyen yıllarda biyokimyasal moleküllerin ölçümünde ve tanımlanmasında kullanılmıştır. Kromatografi; bir karışımın sabit bir faz üzerinde, hareketli (mobil) bir faz yardımıyla karışımı oluşturan maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre çözünerek ayrımlarının ve miktar tayinlerinin yapıldığı ayırma işlemlerine verilen isimdir (Yıldız vd., 1997; Eser ve Dinçel, 2018). Bir kromatografi sistemini oluşturan temelde sabit faz, hareketli (mobil) faz ve ayrıştırılmak istenen karışım olmak üzere üç bileşen vardır. Sabit faz; bir katı veya katı üzerine tutturulmuş bir sıvı fazdır. Katı sabit fazın yapısı kullanılan kromatografiye göre değişmekle beraber genellikle katı sabit fazlar silika ya da alümina gibi gözenekli maddelerdir. Hareketli faz; numune (ayrıştırılmak istenen karışım) ile birlikte sabit faz üzerinde hareket eden, sıvı veya gaz olan, çeşitli fiziksel veya kimyasal özelliklere sahip olan çözücü karışımlardır. Kromatografi kullanılan sabit ve hareketli fazların özelliklerine, tekniğin verimliliğine ve incelenen maddelere göre birçok farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Günümüzde en yaygın kullanılan HPLC ve LC-MS, sıvı kromatografisi temeline dayanmaktadır. HPLC analiz yöntemi, ilgilenilen bileşikler tanımlamak, miktar tayinlerini yapmak veya saflaştırmak için geliştirilmiştir (Sing, 2013; http-2). HPLC; solvent rezervuarı, pompa, enjektör, kolon, dedektör, kaydedici ve atık

kısımlarından oluşmaktadır. Bu kısımlardan bazıları (kolon tipi ya da dedektör çeşidi gibi) çalışılacak bileşene göre değişiklik gösterebilmektedir. HPLC'nin çalışma prensibi temelde 4 adımdan oluşur. İlk adım numunenin uygun bir çözücüde çözünmesidir. İkinci adımda çözünen numune kolona enjekte edilir, üçüncü adımda ise kolonda bileşenlerin ayrımı gerçekleşerek kolon boyunca sıvının hareket etmesi için bir basınç uygulanır. Bu sıvı karışımına hareketli faz denir. Son adım ise ayrılan bileşenlerin ve miktarlarının tayinleri yapılarak dedektörden elde edilen kromatogramların çeşitli bilgisayar programları aracılığıyla yorumlanmasıdır (http-3).



Şekil 1.6. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemi (http-4)

2006 yılında Doğanay; tuzları tuz çıkarılan kaynaklar olarak tanımlamış ve bu kaynakların deniz tuzları, göl tuzları, kaya tuzu tuzları ve kaynak tuzları olmak üzere dörde ayrıldığını belirtmiştir. Kaynak tuzları; yer altı sularının kaya tuzu yataklarından geçmesi sırasında bir miktar tuzu eritip iyon halinde bünyesine tuzu alarak kendiliğinden veya dışarıdan bir müdahale ile yüzeye çıkartılmasıyla oluşur. Türkiye’de Çorum, Çankırı, Sivas, Erzincan, Tunceli, Erzurum, Muş, Siirt dahil dağınık halde çok sayıda kaynak tuzlası bulunmaktadır. Toplam sayı 65 civarında olup, yaklaşık 56 kaynak tuzlasından tuz üretimi yapılmaktadır (Yaşar ve Uygun, 1979; Ergin, 1988; Yazıcı ve Başbüyük, 1998; Polat ve Güney, 2018). Bu çalışmada kaynak tuzlarından alınan numunelerle çalışıldığından diğer tuz çıkarılan kaynaklar hakkında bilgi verilmeyecektir.

Çalışmamızda geleneksel yöntemlerle kaynak tuzu üretimi yapan, 1750 m rakımda bulunan Pülümür (Tunceli) kaynak tuzlarından alınan su numunelerinden mikroorganizmalar izole edilmiştir. İzole edilen mikroorganizmaların türleri 16S rRNA geninin PCR ile çoğaltılması, agaroz jel elektroforezi yapılarak görüntülenmesi, dizilemeye gönderilmesi ve akabinde dizileme sonuçlarının BLAST analizi ile gen bankalarının veritabanlarında karşılıklarının bulunmasıyla tespit edilmiştir. Türleri tespit edilen mikroorganizmalar için laboratuvar imkanları göz önüne alınarak bir protokol oluşturulmuş, oluşturulan bu protokol doğrultusunda biyokütle ve ektoin üretimi yapılmıştır. Üretilen ektoinlerin miktarları HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) analizi ile belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri

2.1.1.1. *Halomonas medium*

NaCl (Sigma).....	80,00 g
Cosamino acids(with vitamins) (Difco).....	7,50 g
Proteose pepton No:3 (Himedia).....	5,00 g
Yeast Extract (Acumedia)	1,00 g
Na ₃ – citrate (Sigma).....	3,00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Emprove ^R).....	20,00 g
K ₂ HPO ₄ (Fluka).....	0,50 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O (Riedel-de Haën).....	0,05 g
Agar (Sigma-Aldrich).....	15,00 g
Distile su.....	1000,00 ml

Otoklavlanmadan önce pH NaOH ile 7,5'e ayarlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Atlas, 2004).

2.1.1.2. *MGI medium (Monosodyum Glutamat medium 1)*

L-Monosodium Glutamat (Havancızade).....	150 mmol l ⁻¹
NaCl (Sigma).....	1 mol l ⁻¹
İnorganik Tuz Karışımı.....	500 ml l ⁻¹
İnorganik Tuz Karışımı (% , w/v);	
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,6
K ₂ HPO ₄ (Fluka).....	1,8
MgSO ₄ .7H ₂ O (Merck).....	0,08

MnSO₄.4H₂O (Fluka)..... 0,002

+0,01 g L⁻¹ Yeast Extract (Acumedia).

Filtrasyon (0,2µm boyutlu filtre) ile steril edilir (Zhang vd., 2009; Lang vd., 2011).

2.1.1.3. MG2 Medium (Monosodyum Glutamat medium 2)

L-Monosodium Glutamat (Havancızade)..... 320 mmol l⁻¹

NaCl (Sigma)..... 0,5 mol l⁻¹

İnorganik Tuz Karışımı..... 500 ml l⁻¹

İnorganik Tuz Karışımı (% w/v);

KH₂PO₄ (Merck) 0,6

K₂HPO₄ (Fluka)..... 1,8

MgSO₄.7H₂O (Merck)..... 0,08

MnSO₄.4H₂O (Fluka)..... 0,002

+0,01 g L⁻¹ Yeast Extract (Acumedia).

Filtrasyon (0,2µm boyutlu filtre) ile steril edilir (Zhang vd., 2009; Lang vd., 2011).

2.1.1.4. %8,9'luk MM63 (Minimal Medium 63) (L)

KH₂PO₄ (Merck) 13,61 g

KOH (Merck)..... 4,21 g

(NH₄)₂SO₄ (Sigma)..... 3,7 g

MgSO₄.7H₂O (Merck)..... 0,15 g

FeSO₄.7H₂O (Merck)..... 0,0011 g

Glukoz.H₂O (Riedel-de Haën)..... 10.7 g

NaCl (Tekkim) 89 g

pH (7,1) ayarlaması NaOH ile yapılır ve glikoz ayrı olarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Otoklav sonrası ılıdıktan sonra steril kabinde besiyerine ilave edilir (Parwata vd., 2018).

2.1.1.5. %17,5’luk MM63 (Minimal Medium 63) (L)

KH ₂ PO ₄ (Merck)	13,61 g
KOH (Merck).....	4,21 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sigma).....	3,7 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Merck).....	0,15 g
FeSO ₄ .7H ₂ O (Merck).....	0,0011 g
Glukoz.H ₂ O (Riedel-de Haën).....	10.7 g
NaCl (Tekkim)	175 g

pH (7,1) ayarlaması NaOH ile yapılır ve glikoz ayrı olarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Otoklav sonrası ılıdıktan sonra steril kabinde besiyerine ilave edilir (Parwata vd., 2018).

2.1.1.6. Luria Bertani medium (%8,9luk) (L)

Peptone (Biomatik).....	10g
Yeast Extract (Acumedia).....	5g
NaCl (Tekkim).....	89g
Agar (Sigma-Aldrich).....	15g

pH, NaOH ile 7,1’e ayarlanarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.

2.1.2. Çalışmada kullanılan solüsyonlar

2.1.2.1. %0, %1,5 ve %3 NaCl içeren tuzlu su solüsyonlar

%0 İçin;

500ml distile su 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edilir.

%1,5 İçin;

7,5 g NaCl 500 ml distile su içerisinde çözdürülerek 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edilir.

%3 İçin;

15 g NaCl 500 ml distile su içerisinde çözdürülerek 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edilir.

2.1.2.2. TAE 50X

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 muhafaza edilir (Sambrook vd., 1989)

2.1.3. Çalışmada kullanılan primerler

Çalışmada kullanılan primerler Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan primerler ve baz dizilimi

Primer Adı	Baz Dizilimi	Spesifitesi
27F	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'	Bacteria (Lane vd., 1985)
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	Evrensel (Lane vd., 1985)

2.2. Metod

2.2.1. Çalışma alanı

Doğu Anadolu Bölgesi 39°30'25.5"N 39°52'42.6"E koordinatlarında bulunan Tunceli Pülümür'ün kaynak tuzlarından 1750 m rakımdan 2019 yılı Haziran ayında su örneği alınmıştır.



Şekil 2.1. *Pülümür Kaynak Tuzlaları, rakım: 1750m, GPS konum: 39°30'25.5"N 39°52'42.6"E*

2.2.2. Su örneğinin tuzluluk oranının ölçümü

Pülümür (Tunceli) kaynak tuzlarından 2019 yılı Haziran ayında alınan su örneğinin tuzluluk oranı Refraktometre (Eclipse) ile belirlenmiştir.

2.2.3. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi ile ilgili metodlar

2.2.3.1. Kaynak tuzlası su örneklerinden izolasyon ve saflaştırma

Pülümür (Tunceli) kaynak tuzlarından alınan su örneklerinden mikroorganizmaların izolasyonu için Halomonas medium (agar) kullanılmıştır. Su örneklerinden 100 µl yayma plak yöntemi ile Halomonas mediuma (agar) inoküle edilmiştir. Halomonas mediuma inoküle edilen örnekler 37°C etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmış ve gelişen karışık koloniler alınarak saf koloniler elde etmek amacıyla Halomonas mediuma çizgi ekim yöntemiyle ekilmiştir. Elde edilen saf kültürlerden 20

tanesi seçilerek çalışılmak üzere tekrar saflaştırılmıştır. Çalışılacak olan saf haldeki 20 kültür %20'lik gliserol stokların içerisinde -86°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.3.2. PCR ile 16S rRNA geninin amplifikasyonu (çoğaltılması)

2 ml'lik eppendorflara 200 µl steril ultra saf su konularak, suyun içine kürdan ucu ile (pirinç tanesi kadar) saf koloni örneklerinden alınarak süspanse edilmiştir. Eppendorfların kapakları hafif gevşetilerek (su kaçmaması için tam açılmamalı) köpük içine yerleştirilmiş ve bu köpük beherde kaynamakta olan suyun içine konulmuştur. Eppendorflar 10 dk kaynayan suda bekletildikten sonra alınarak 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant steril ayrı bir eppendorfa aktarılmıştır. Çalışmada seçilen 20 örnek için *Bacteria* spesifik primerler kullanılarak koloni PCR kurulmuştur. PCR reaksiyonu için 27F ileri primer, 1492R geri primer, template (kalıp) DNA ve One Taq 2X Master Mix (New England, Biolab - M0486S) kullanılmıştır. PCR karışımının hazırlanması Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. PCR karışımının hazırlanması

İçerik	25 µl	50 µl	Final Konsantrasyon
One Taq 2X Master Mix	12,5 µl	25 µl	1X
10µM İleri Primer (27F)	0,5 µl	1 µl	0,2 µM
10µM Geri Primer (1492R)	0,5 µl	1 µl	0,2 µM
Template (kalıp) DNA	değişken	değişken	<1,000 ng
Nükleaz İçermeyen Su	25 µl'ye kadar	50 µl'ye kadar	

Tüm çalışmada her reaksiyon seti ile birlikte hem pozitif hem negatif kontrol reaksiyonları kullanılmıştır. Pozitif kontrol reaksiyonu için *Bacteria* domainine ait halofilik bakterinin kalıp DNA'sı kullanılırken, negatif kontrol reaksiyonlarında DNA içermeyen reaksiyon karışımları kullanılmıştır. PCR reaksiyonu için Applied Biosystems® Thermal Cycler kullanılmıştır. PCR karışımı ve kontrol reaksiyon

karışımları hazırlandıktan sonra 16S rRNA amplifikasyonu için Bacter50 programı kullanılmış olup, programın reaksiyon koşulları aşağıda yer alan Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3. Bakteri 16S rRNA reaksiyonları için PCR şartları (Bacter50 programı)

Döngü (X kez)	Sıcaklık	Süre
1. Döngü (X1)	94°C	3 dakika
2. Döngü (X30)	94°C	30 saniye
	50°C	1 dakika
	72°C	2 dakika
3. Döngü (X1)	72°C	10 dakika
	4°C	süresiz

PCR sonucu oluşan ürünleri görüntülemek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. 1X TAE buffer içine %1 olacak şekilde agaroz jel tartılarak mikrodalgada hiç agaroz kalmayacak şekilde eritilmiştir. Jel ılıdıktan sonra DNA'ların gözlenebilir olabilmesi için içerisine 0,05 µl/ml olacak şekilde RedSafe Nükleik asit boyama solüsyonu (iNtRON Biotechnology-Cat. No:21141) ilave edilmiştir. Tablaya dökülerek tarak yerleştirilen jel donmaya bırakılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin boyutlarının saptanması için Thermo Scientific Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder kullanılmış olup jelin ilk kuyucuğuna yüklenmiştir. 1X TAE Buffer içinde donan %1'lik agaroz jelin kuyucuklarına 4 µl PCR ürünü, 1 µl yükleme boyası (Fermentas 6X Loading Dye Solution) toplam 5 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiştir. Kuyucuklara yükleme işlemi bittikten sonra PCR ürünleri 300 A, 90 V altında 20 dk yürütülmüştür. Yürütme işleminin sonunda jeller UV ışık altında görüntülenmiştir.

2.2.3.3. Dizi analizi

PCR ile DNA'larının 16S rRNA bölgeleri çoğaltılmış olup pozitif sonuç veren örneklerin amplifikasyon ürünleri dizi analizine (BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Sti. (BMLabosis)) gönderilmiştir. Dizi analizi için 1492R primeri kullanılmıştır.

Dizi analizi sonrası elde edilen kromatogramlar incelenerek BioEdit programı ile FASTA formatına dönüştürülmüş, gen analizleri için NCBI 'National Center for Biotechnology Information' (www.ncbi.nlm.nih.gov) gen bankası veritabanında yer alan BLAST arayüzü kullanılmıştır. Dizi analizi sonuçlarına göre filogenetik benzerlikleri tespit edilmiş, çalışılacak türler belirlenmiştir.

2.2.3.4. Mikroorganizmaların epifluoresan mikroskopunda incelenmesi

Çalışmamızda kullanılacak olan türlerin morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla DAPI boyama yapılarak epifluoresan mikroskopunda görüntülenmiştir.

Fiksasyon

Taze bakteri kültüründen alınan 450 µl örneğin üzerine 450 µl steril distile su ilave edilerek örnek seyreltilmiş daha sonra üzerine 100 µl formaldehit (Sigma) eklenerek bir gece +4°C'de fikse edilmiştir. Ertesi gün 500 µl fikse edilen örneği alarak üzerine 500 µl 1X PBS (MULTICELL) solüsyonu eklenerek fiksasyon durdurulmuş ve inceleme için örnek tekrar seyreltilmiştir. 1 ml'lik karışım 0,2 µm por çaplı filtreden (İSOLAB) geçirilmiş ardından 10 ml 1X PBS alınarak filtre yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Filtreler kuruduktan sonra işaretlenmiş boyama işlemine kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) ile boyama

Kurutulan filtrelere DAPI boyama yapılmıştır. İncelenmek üzere filtrelerden küçük parçalar kesilmiş, örneklerin ayırt edilmesi amacıyla filtrelere farklı şekillerde kesikler atılmıştır. Karanlık bir ortamda kesilen parçaların üzerine 25 µl DAPI eklenerek bir süre beklenilmiştir. Bekleme süresinin sonunda sırasıyla önce saf etanol daha sonra MQ (ultra saf su) su ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası havada kurutulan filtreler lam üzerine alınarak üzerine citiflour/gliserol damlatılmış ve lamel ile kapatılarak preparasyonu tamamlanmıştır. Preparat epifluoresan mikroskopta 100X objektifte incelenmiş, mikroorganizmaların morfolojileri tespit edilmiştir.

2.2.4. Mikroorganizmaların ektoin üretim yeteneklerinin belirlenmesi ile ilgili metodlar

2.2.4.1. Biyokütle ve ektoin üretimi

Çalışmada biyokütle üretimi için %8,9 NaCl (w/v) içeren MM63 (Minimal Medium 63) ve MG1 (Monosodyum Glutamat Medium 1) besiyerleri kullanılırken ektoin üretimi için %17,5 NaCl (w/v) içeren MM63 (Minimal Medium 63) ve MG2 (Monosodyum Glutamat Medium 2) besiyerleri kullanılmıştır. MG besiyeri ile yapılmış olan biyokütle ve ektoin üretimi deneme amaçlı olup çalışmaya MM63 besiyeri ile devam edilmiştir.

Seçilen saf bakteri kolonilerinin biyokütle üretimi %8,9 NaCl (w/v) içeren sıvı (broth) MM63 besiyerinde yapılmıştır. Çalışmamızda her biyokütle üretimi öncesi stok kültür ve 24 saatlik ara kültür hazırlanmıştır. Biyokütle üretimi için hazırlanan, taze 24 saatlik ara kültürler kullanılmıştır. Stok kültür için 5 ml %8,9 NaCl (w/v) içeren broth MM63 besiyerine saf tek bir koloni ekimi yapılarak çalkalamalı etüvde 37°C, 150 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün 24 saatlik ara kültür için 20 ml %8,9 NaCl (w/v) içeren MM63 besiyerine %2 (400µl) stok kültürden aşılama yapılmış 37°C, 150 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 150 ml %8,9 NaCl (w/v) içeren MM63 besiyerine ara kültürden %2 (3 ml) aşılama yapılarak çalkalamalı etüvde 37°C, 150 rpm'de 48 saat inkübasyona (OD:1,00 olacak şekilde) bırakılmıştır. 48 saatin sonunda bakteri hücreleri, 20 dakika boyunca 4°C, 7000 rpm'de santrifüj edilerek kültürden ayrılmıştır. Hücreler, %17,5 NaCl (w/v) içeren 150 ml MM63 besiyeri içinde aseptik olarak süspanse edilerek, ektoin üretimi için çalkalamalı etüve 33°C, 150 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Parwata vd., 2018).

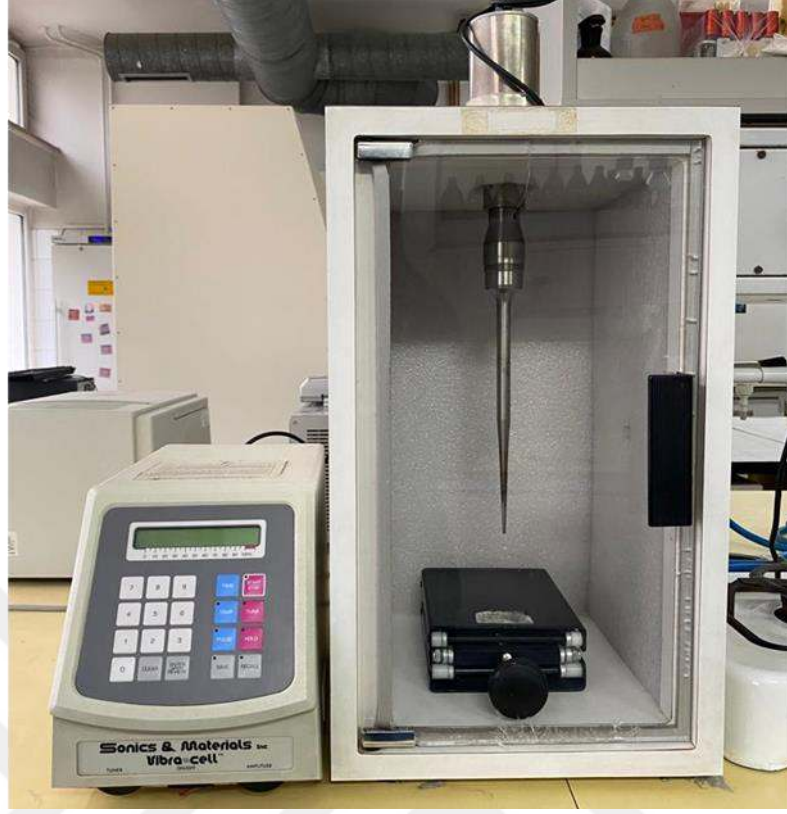
MG besiyeri çalışmasında; biyokütle üretimi için %8,9 NaCl (w/v) içeren MM63 besiyeri yerine MG1 besiyeri, ektoin üretimi için %17,5 NaCl (w/v) içeren MM63 besiyeri yerine MG2 besiyeri kullanılarak yukarıda verilen biyokütle ve ektoin üretimi protokolü uygulanmıştır (Zhang vd., 2009; Lang vd., 2011).

2.2.4.2. Bakteriyel sağıım aşaması

İnkübasyon sonunda bakteri kültürü eşit hacimlerde (50 ml) üç falkona aktarılmıştır. Falconlarda yer alan bakteri kültürleri 20 dk boyunca 4°C, 7000 rpm'de santrifüj edilerek bakteri hücreleri (pelet) toplanmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

Daha sonra peletler 15 ml farklı seviyelerde (%0, %1,5 ve %3) NaCl içeren steril distile su içerisinde süspanse edilerek (hipoozmotik şok) 27°C 200 rpm’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Hücre içerisinde yer alan ektoinlerin salınımı için süspansiyonlar 4°C, 7000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant içeriğindeki ektoinin analizi için steril bir erlene aktarılmıştır. Peletler (bakteri hücreleri) tekrardan %17,5 NaCl (w/v) içeren 50 ml MM63 besiyeri içinde süspanse edilmiş ve farklı steril erlenlere alınmıştır. Erlenlerde bulunan bakteri kültürlerinden alınan 50 µl numunelere seri seyretme yapılarak %8,9 NaCl (w/v) içeren Luria Bertani (agar) besiyerine yayma plak yöntemiyle ekim yapılmış ve 37°C’de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Erlenlerde bulunan bakteri kültürleri ise 150 rpm, 37°C çalkalamalı etüve 24 saatlik inkübasyona alınmıştır. Hiperozmotik şok ve hipoozmotik şoku içeren ektoin üretimi ve bakteriyel sağım üç döngü şeklinde tekrarlanmış olup her bakteriyel sağım sonrası süpernatantlar analiz için ayrılmıştır (Kunte vd., 2014; Parwata vd., 2018). Üçüncü döngü tamamlanıp süpernatant ayrıldıktan sonra hücre peletlerinin üzerine 10 ml %17,5 NaCl (w/v) içeren MM63 besiyeri eklenerek hücreler sonikasyon yöntemiyle, Sonics & Materials Inc. markasının VCX 400 model (400 Watts, 230 Volts) (Şekil 2.2’de gösterilmiştir) sonikatöründe (ultrasonik homojenizatörde) 4°C, 20 dk, %30 genlikte (Amplitude) patlatılmıştır. Patlatılan hücreler 4°C, 7000rpm’de 25 dakika santrifüj edilerek süpernatant ektoin analizi için ayrılmıştır.

MG1 besiyeri ile biyokütle üretimi yapılarak mikroorganizmalar toplandıktan ve MG2 besiyerinde ektoin üretimi gerçekleştirildikten sonra bakteriyel sağım aşaması gerçekleştirilmiştir. Yukarıda bahsedilen bakteriyel sağım aşamasından farklı olarak tek bir döngü gerçekleştirilmiştir. Ektoinin hücre dışına salınım miktarını arttırmak amacıyla bu tek döngüde bir hiperozmotik şok ve üç hipoozmotik şok olacak şekilde bakteriyel sağım yapılarak hücre içinde kalan ektoin miktarı en aza indirilmiştir. Üçüncü hipoozmotik şok gerçekleştikten sonra, kültürleri santrifüjlemeden önce 50 µl numune alınarak seri seyreltme yapılmış ve %8,9 NaCl (w/v) içeren Luria Bertani (agar) besiyerine yayma plak yöntemiyle ekim yapılarak 37°C etüvde inkübasyona bırakılmıştır. MG besiyerine uygulanan bir hiperozmotik şok üç hipoozmotik şok olacak şekilde bakteriyel sağım aşamasını içeren döngü karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla MM63 besiyeri için de uygulanmıştır.



Şekil 2.2. Çalışmada kullanılan sonikatör (ultrasonik homojenizatör)

2.2.4.3. Ektoinin HPLC ile belirlenmesi

Hücre dışı ve hücre içi ektoinleri içeren süpernatantlar 4°C, 7000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildikten sonra 0,2 µm porlara sahip selüloz asetat filtrelerden geçirilerek analize hazırlanmıştır. Ektoinin tutulma süresini belirlemek amacıyla BLDpharm’dan ticari ektoin temin edilmiş ve ticari ektoin ile farklı derişimlerde (1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm ve 100 ppm) ektoin çözeltileri hazırlanmıştır. Analizler Agilent 1100 Series Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), GL-Sciences Inc.-Inertsil ODS-3 marka 3 µm, 4,6*150 mm özelliklere sahip C18 kolonu ile gradiyent elüsyon (şartlar Tablo 2.4’te gösterilmiştir) yapılarak analiz edilmiştir. Analiz süresi 12 dakika, akış hızı 0,900 ml/dk olup UV/VIS dedektör kullanılarak 220 nm’de Emilimi ölçülerek izlenmiştir (Onraedt vd., 2005; Guzman vd., 2009; Shivanand ve Mugeraya, 2011; Parwata vd., 2018). Öncelikle farklı derişimlerde hazırlanan ektoin çözeltilerin tutulma süreleri ve alanları belirlenerek bir kalibrasyon grafiğı çizilmiş ve bu kalibrasyon grafiğinin denklemi belirlenmiştir. Daha sonra filtreden geçirilen numunelerin analizi yapılmış,

analiz verilerinde yer alan piklerin alanları belirlenmiştir. Alanları bilinen numunelerin miktarları kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklem yardımıyla hesaplanmıştır.

Tablo 2.4. *Ektoinin tespitinde kullanılan HPLC analizi gradiyent elüsyon şartları*

Zaman (dk)	% A (distile su)	%B (metanol)	Akış Hızı (ml/dk)
0	100	0	0,900
2	100	0	
3	100	0	
4	90	10	
5	20	20	
6	100	0	
7	100	0	
8	100	0	
9	100	0	
12	100	0	

3. BULGULAR

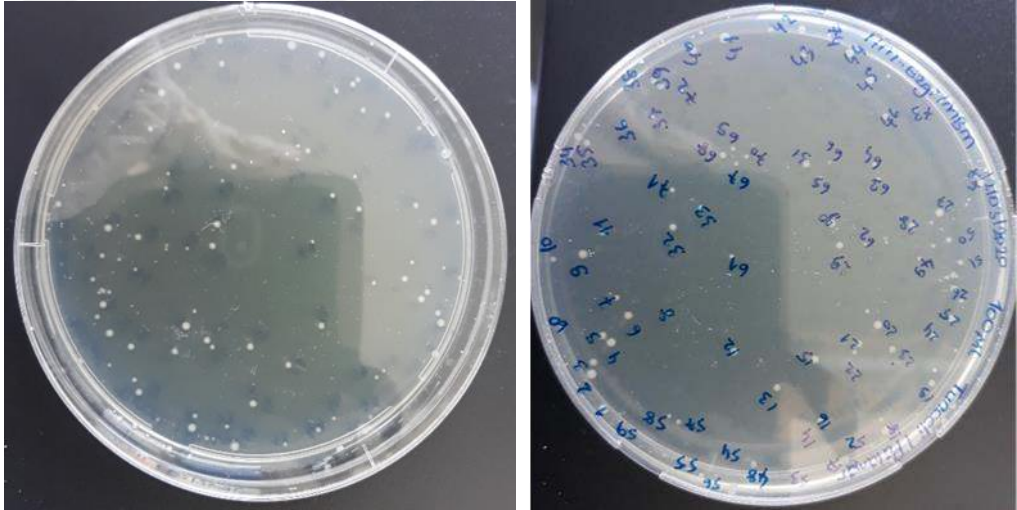
3.1. Su Örneğinin Tuzluluk Oranının Belirlenmesi

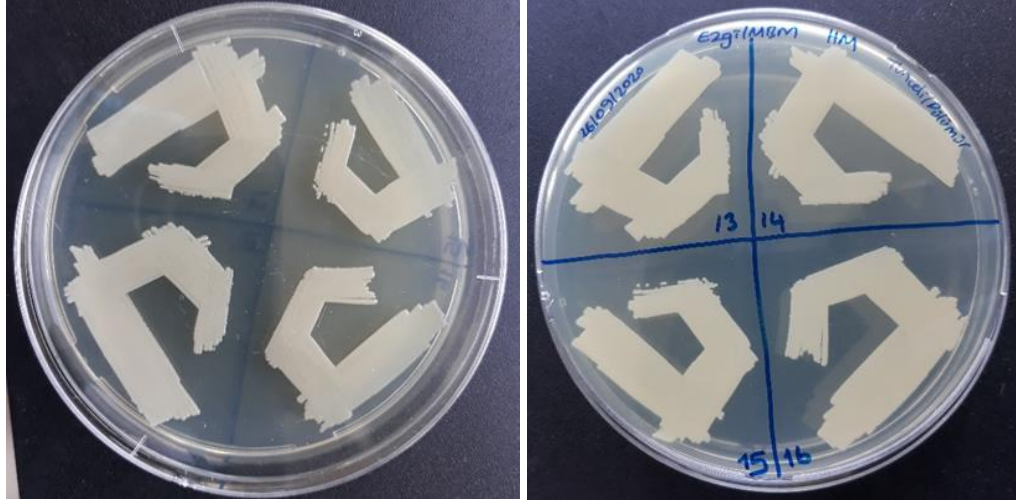
Pülümür (Tunceli) kaynak tuzlularından alınan su örneğinin tuzluluk oranı Refraktometre (Eclipse) ile %18 olarak ölçülmüştür.

3.2. Mikrobiyal Çeşitlilik İle İlgili Bulgular

3.2.1. Kaynak tuzlası su örneklerinin izolasyon ve saflaştırması

Pülümür (Tunceli) kaynak tuzlularından alınan su örneklerinden izolasyon ve saflaştırma yapılmıştır. İzolasyon ve saflaştırma için Halomonas medium (agar) kullanılmıştır. İlk olarak su örneğinden yapılan ekimlerden 74 tane koloni seçilerek Halomonas mediuma inoküle edilerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda seçilen 20 tane izolata saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Aşağıdaki Şekil 3.1’de izolasyon ve saflaştırması yapılan bazı izolatların Halomonas mediumundaki görüntüleri verilmiştir.

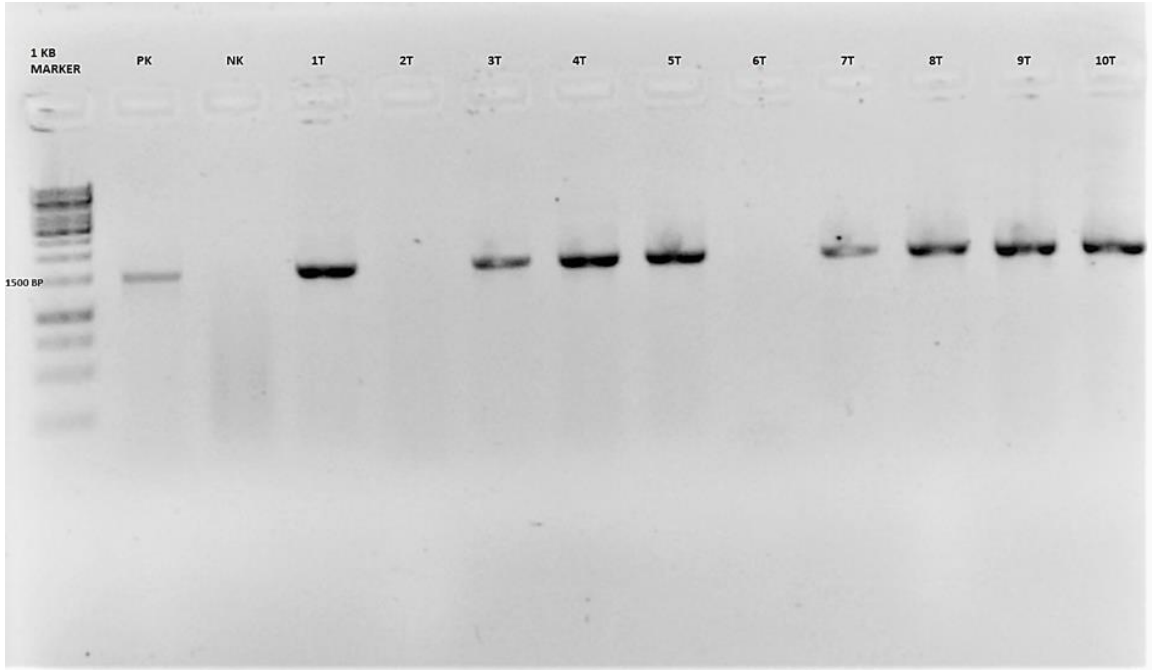


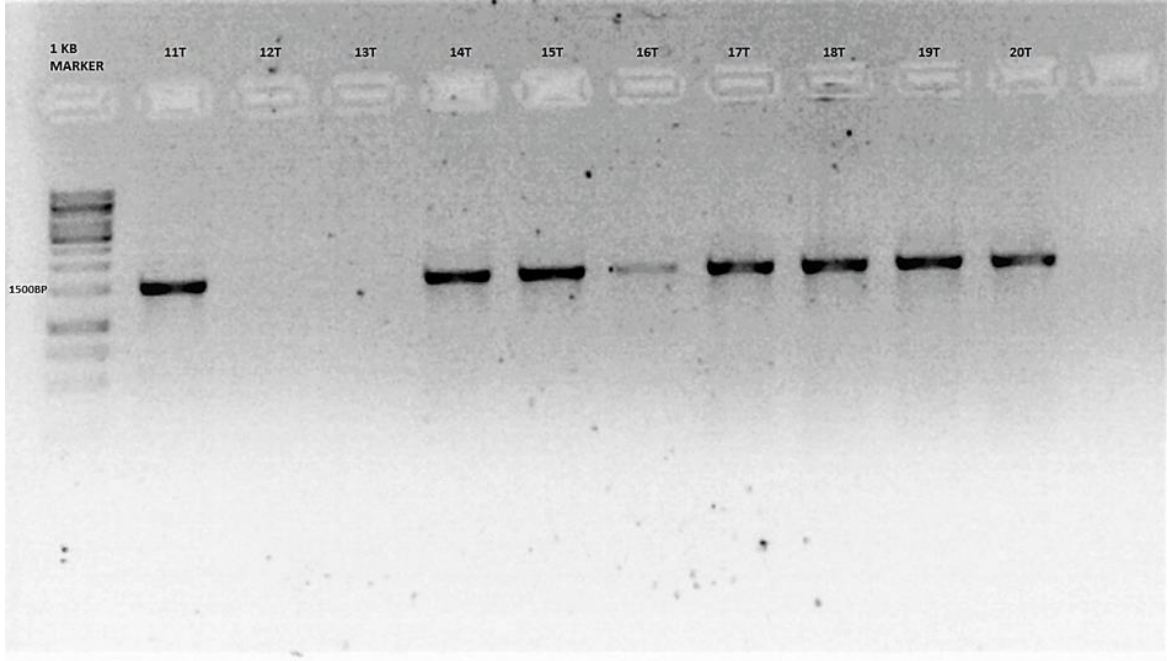


Şekil 3.1. İzolasyon ve saflaştırılması yapılan bazı izolatların *Halomonas medium*(agar) görüntüleri

3.2.2. PCR ile 16S rRNA geninin amplifikasyonu(çoğaltılması)

Çalışmada kullanılacak izolatların seçilmesi ve 16S rRNA geninin amplifikasyonu (çoğaltılması) için koloni PCR yapılmıştır. PCR sonrasında ürünler %1'lik agoroz jelde yürütülmüş ve UV sonuçlar kaydedilmiştir. Koloni PCR kurulan 20 örneğin 15 tanesinden pozitif sonuç elde edilmiş olup, sonuçlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

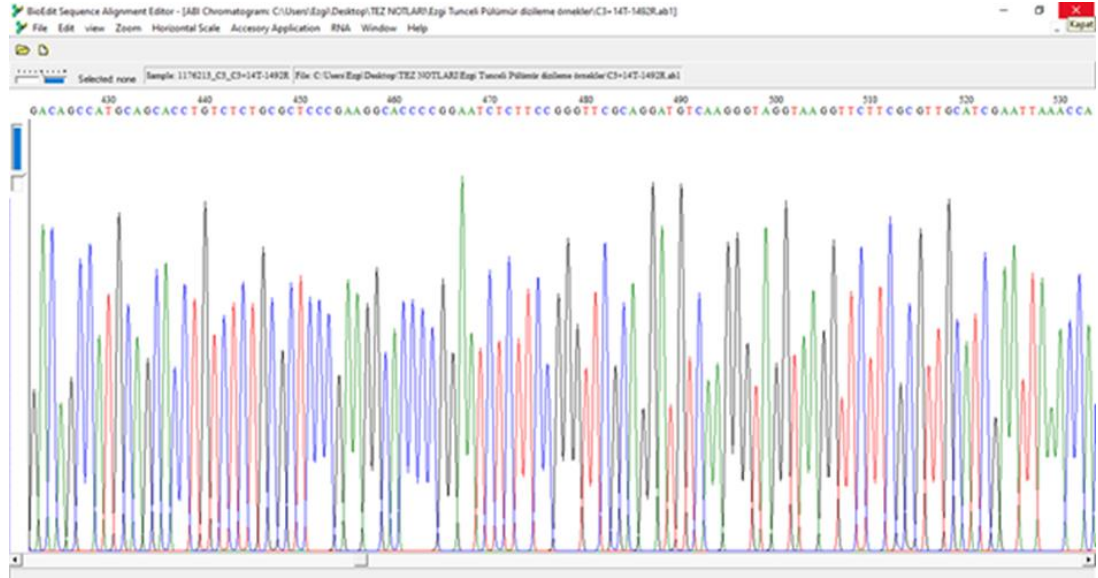




Şekil 3.2. *16S rRNA geninin amplifikasyonunun agaroz jel elektroforezi sonucunda UV görüntüleri*

3.2.3. Dizi analizi sonuçları

Koloni PCR ile 16S rRNA genleri çoğaltılarak pozitif sonuç alınan 15 izolatın DNA analizi için hizmet alımı yapılmıştır. Dizilemede 1492R primeri kullanılmış olup, 14 izolatın dizilemesi yapılabilmektedir. Dizi analizi sonrası elde edilen veriler dizileme programları (BioEdit) yardımıyla gen bankalarının (NCBI) veri tabanlarında analiz edilmiştir. Dizi analizi sonucunda gelen kromatogramlara ait örnekler Şekil 3.3'te, NCBI veritabanında bulunan referans örneklerle benzerlikleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Dizi analizi sonuçlarına ait kromatogramların BioEdit programı görüntüsü (14T isimli örneğe ait)

Tablo 3.1. Dizi analizine gönderilen örneklerin analiz sonrası BLAST sonuçları

Bant Adı	Dizi Analizinde Kullanılan Primer	Accession Numarası	Gen Bankasındaki Karşılığı	Yüzde Benzerlik	Eşlenen Nükleotid Miktarı
1T	1492R	MN043885.1	<i>Halomonas sp. strain P149-L03a</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	778/782
3T	1492R	MT126287.1	<i>Chromohalobacter salexigens strain SYA72</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	842/847
5T	1492R	KF322103.1	<i>Halomonas sp. csb 4</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	868/877
7T	1492R	MN043885.1	<i>Halomonas sp. strain P149-L03a</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	923/925

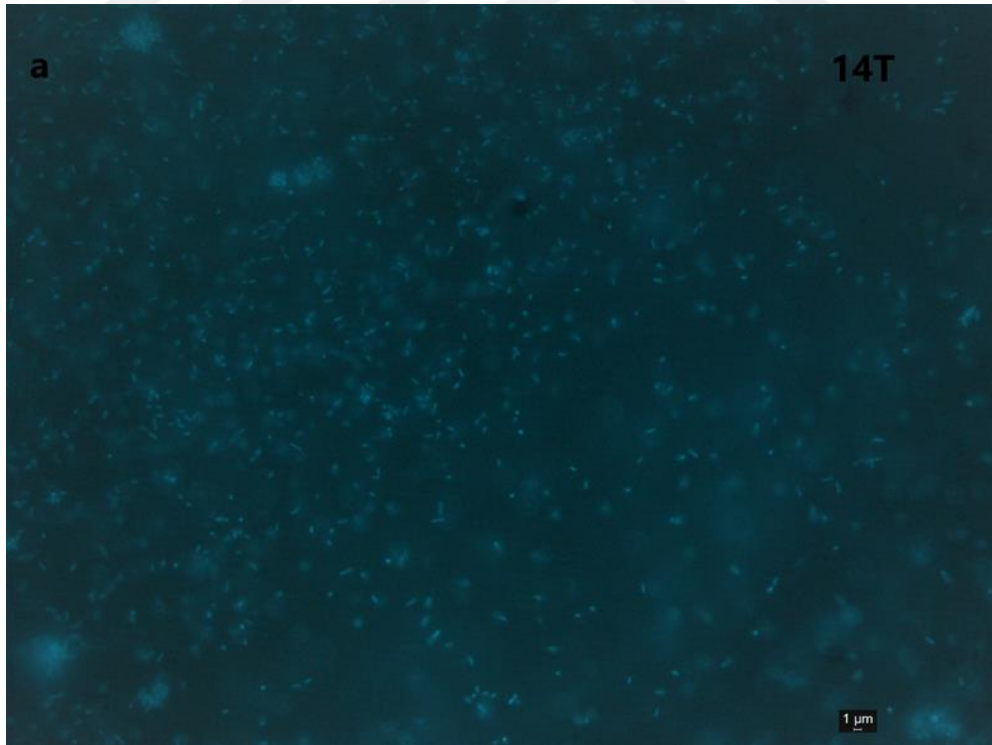
Tablo 3.1. (devam) Dizi analizine gönderilen örneklerin analiz sonrası BLAST sonuçları

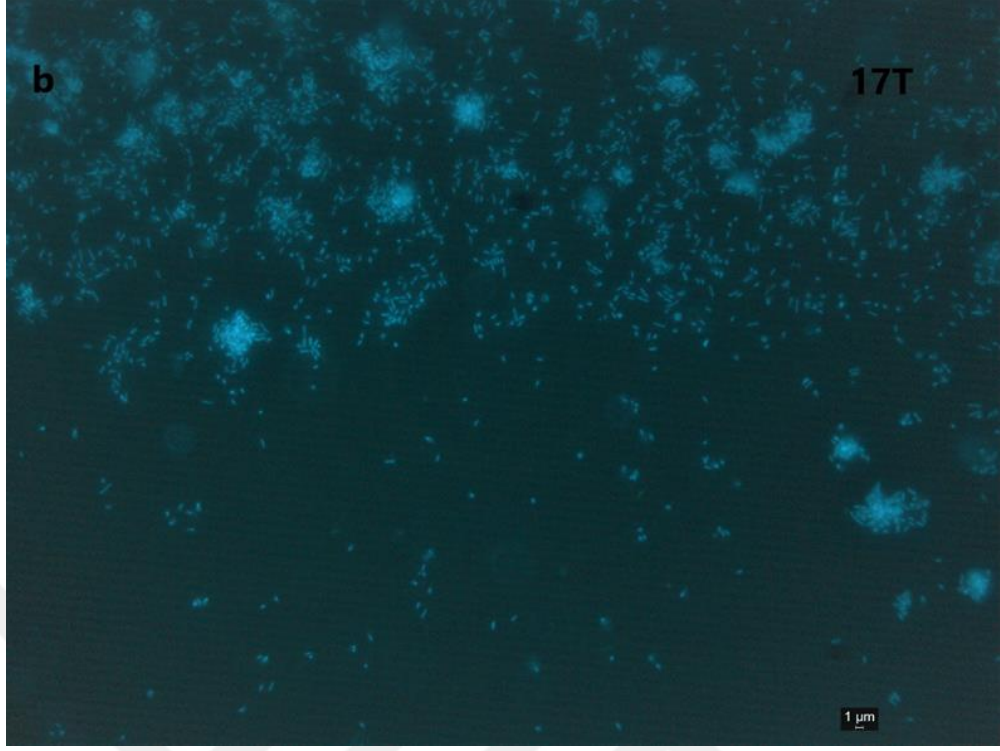
9T	1492R	MT126287.1	<i>Chromohalobacter salexigens</i> strain SYA72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	843/843
10T	1492R	EU868853.1	<i>Halomonas</i> sp. S96-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	847/850
11T	1492R	MT126287.1	<i>Chromohalobacter salexigens</i> strain SYA72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	875/876
14T	1492R	NR_025431.1	<i>Chromohalobacter israelensis</i> strain Ba1 16S ribosomal RNA, partial sequence	99%	851/855
15T	1492R	MT126287.1	<i>Chromohalobacter salexigens</i> strain SYA72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	831/832
16T	1492R	MT126287.1	<i>Chromohalobacter salexigens</i> strain SYA72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	829/832
17T	1492R	KF934471.1	<i>Halomonas</i> sp. P6-8-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	913/913
18T	1492R	KF934471.1	<i>Halomonas</i> sp. P6-8-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	831/833
19T	1492R	MT126287.1	<i>Chromohalobacter salexigens</i> strain SYA72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	954/954
20T	1492R	KF934471.1	<i>Halomonas</i> sp. P6-8-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	845/851

Tablo incelendiğinde dizilemeden gelen sonuçlara göre, 14 örnekten 6 izolatin *Chromohalobacter salexigens* SYA72 suşuna, 3 izolatin *Halomonas* sp. P-6-8-3 suşuna, 2 izolatin *Halomonas* sp. P149-L03a suşuna, 1 izolatin *Halomonas* sp. csb 4 suşuna, 1 izolatin *Halomonas* sp. S96-2 suşuna ve 1 izolatin *Chromohalobacter israelensis* Ba1 suşuna ait olduğu gözlenmiştir.

3.2.4. Mikroorganizmaların epifluoresan mikroskopunda incelenmesi

Taze bakteri kültürlerinden yapılan fiksasyon sonrasında DAPI boyama yapılarak epifluoresan mikroskopta incelenmiştir. İncelemeler sonucunda 14T olarak isimlendirilen *Chromohalobacter israelensis* Ba1 suşunun ve 17T olarak isimlendirilen *Halomonas* sp. P-6-8-3 suşunun kısa basil şekilli halofilik bakteriler oldukları gözlenmiştir. *Chromohalobacter israelensis* Ba1 ve *Halomonas* sp. P-6-8-3 suşlarına ait epifluoresan mikroskobu görüntüleri Şekil 3.4 (a ve b)’te gösterilmiştir.



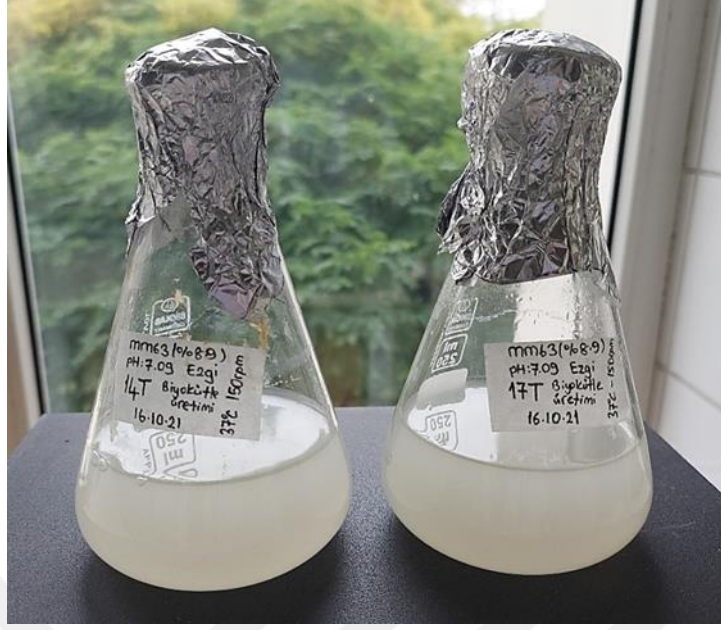


Şekil 3.4. Epifluoresan mikroskobu görüntüleri a) *Chromohalobacter israelensis* Ba1 suşu ve b) *Halomonas* sp. P-6-8-3 (DAPI boyama yapılmıştır)

3.3. Mikroorganizmaların Ektoin Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi İle İlgili Bulgular

3.3.1. Biyokütle ve ektoin üretimi

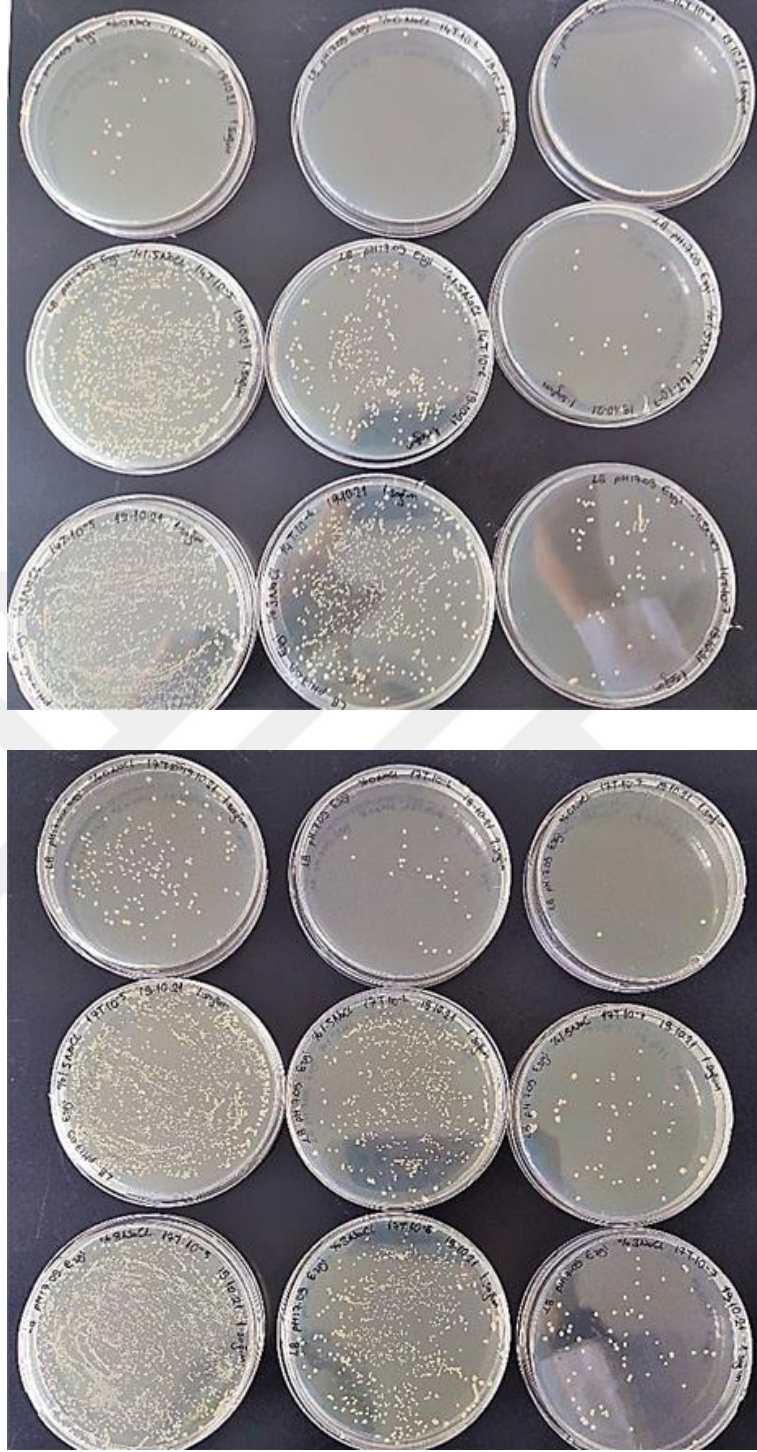
Çalışmada biyokütle üretimi için %8,9 NaCl (w/v) içeren MM63 besiyeri kullanılırken, organizmaların yüksek tuz stresine girerek ektoin üretmelerini sağlamak amacıyla %17,5 NaCl (w/v) içeren MM63 besiyeri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan temel besiyeri MM63 olmakla beraber farklı bir besiyerinde ektoin üretimini gözlemlemek amacıyla biyokütle üretiminde MG1 besiyeri, ektoin üretiminde MG2 besiyeri kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Biyokütle ve ektoin üretimi aşamalarında MM63 besiyeri içerisinde yer alan bakteri kültürleri

3.3.2. Bakteriyel sağım aşaması

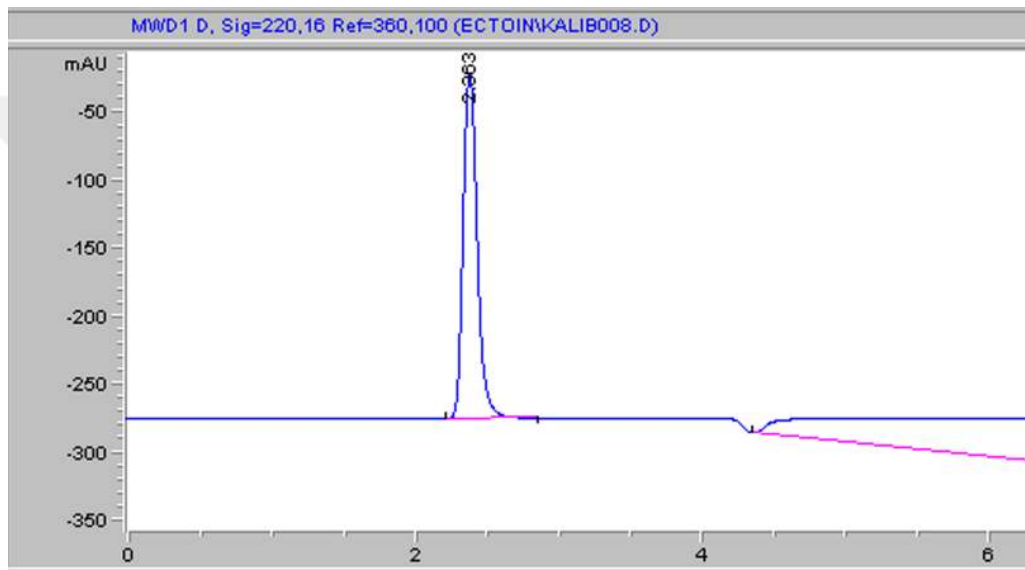
Bakteriyel sağım aşamasında hipoozmotik şok öncesi ve sonrasında %8,9 NaCl (w/v) içeren Luria Bertani besiyerine ekim yapılmıştır. Bu besiyerinde gelişen izolatlar incelenmiştir. Farklı tuzluluklarda yapılan hipoozmotik şok sonrasında bakteri hücrelerinin sırasıyla %3 NaCl, %1,5 NaCl ve %0 NaCl içeren steril distile sularda daha fazla hayatta kaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Farklı tuzluluklarda (yukarıdan aşağıya doğru %0, %1,5 ve %3 tuzluluk) hipoozmotik şoklarda bakteriyel sağım yapılan *Chromohalobacter israelensis* Ba1 ve *Halomonas* sp. P-6-8-3 suşlarına ait görüntüler

3.3.3. Ektoinin HPLC ile belirlenmesi

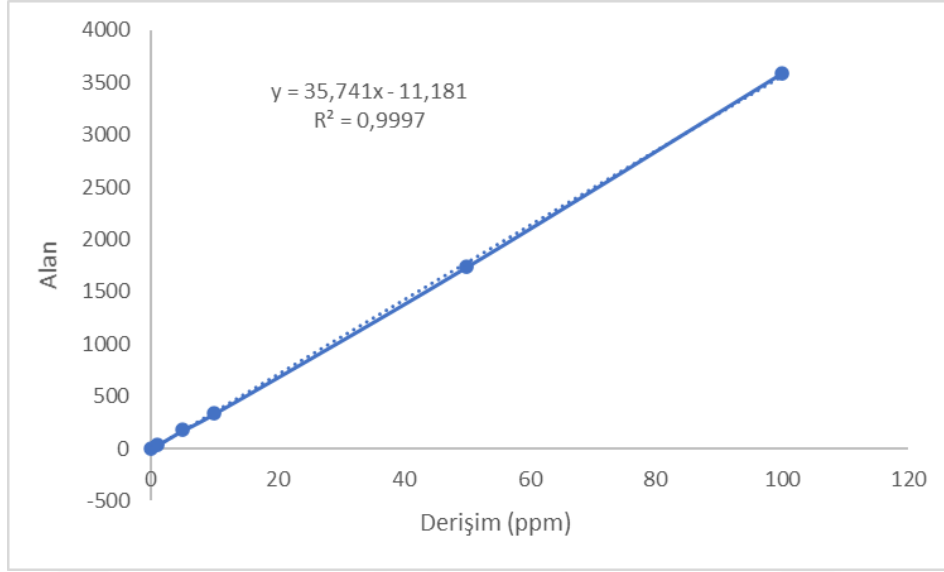
Farklı derişimlerde ticari ekton ile hazırlanan ektoın çözeltilerinin HPLC ile tutulma süreleri ve alanları 220 nm dalga boyunda görüntülenerek belirlenmiştir. Yapılan analizlerde ektoinin tutulma süresi yaklaşık 2.5 dakika olarak gözlenmiş olup ektoine ait standart analize ait örnek kromatogram Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Hazırlanan standart çözeltiler ile tekrarlı ölçümler yapılarak belirlenen kalibrasyon verileri Tablo 3.2’de verilirken, kalibrasyon grafiği ve denklemi Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.7. Standart ektoın çözeltilisine ait kromatogram

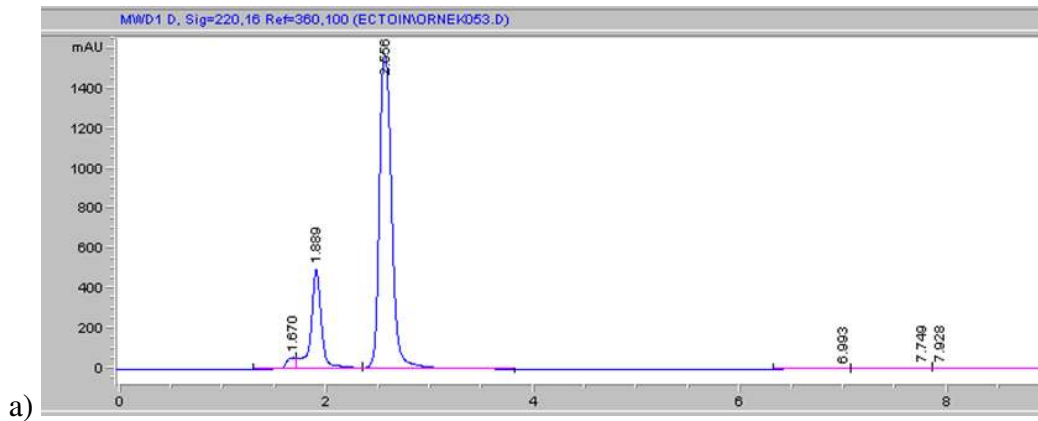
Tablo 3.2. Ticari ektoın ile hazırlanan ektoın çözeltilerine ait kalibrasyon verileri

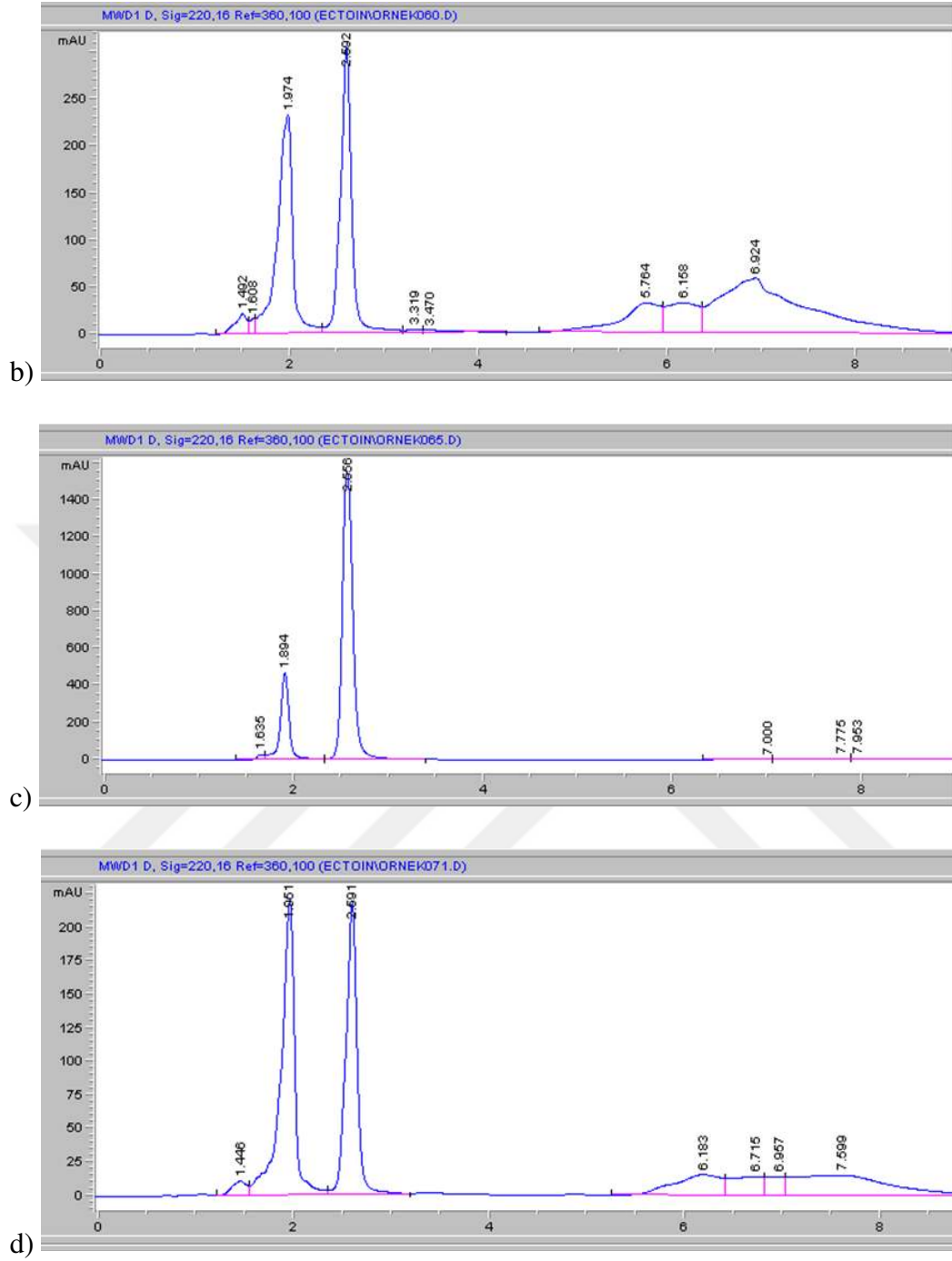
Ektoın Çözeltilisinin Derişimi (ppm)	Alan (Ortalama)
0	0
1	36
5	176
10	335
50	1735
100	3584



Şekil 3.8. Ticari ektoin ile hazırlanan çözeltilere ait kalibrasyon grafiği ve denklemini

Bakteriyel sağım sonrası 0,2 µm porlara sahip selüloz asetat filtrelerden geçirilen numunelerin hücre içi ve hücre dışı ektoin konsantrasyonları HPLC analiziyle tespit edilmiştir. Hücre içi ve hücre dışı ektoin konsantrasyonları ayrı ayrı tespit edilmiş olup, tüm analizler iki tekrarlı olarak yapılmıştır. *Chromohalobacter israelensis* Ba1 ve *Halomonas sp. P-6-8-3* suşlarına ait hücre dışı ve hücre içi ektoinlere ait %3 tuzluluktaki kromatogram örnekleri Şekil 3.9’da verilmiştir. Analizleri yapılan numunelerin kromatogramlarında ektoin dışında yaklaşık 1.9’uncu dakikada hidroksi ektoin olduğu düşünülen pik gözlenmiştir.

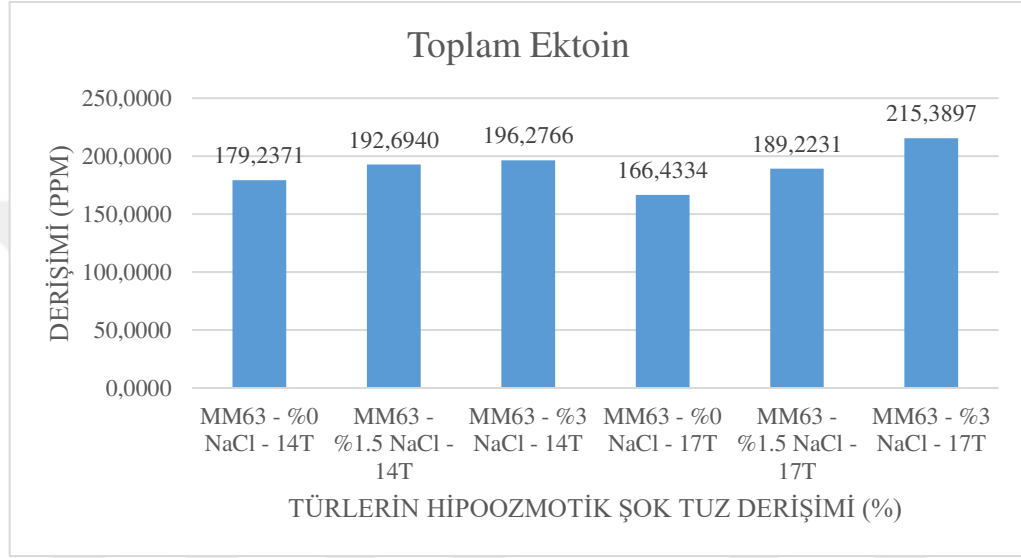




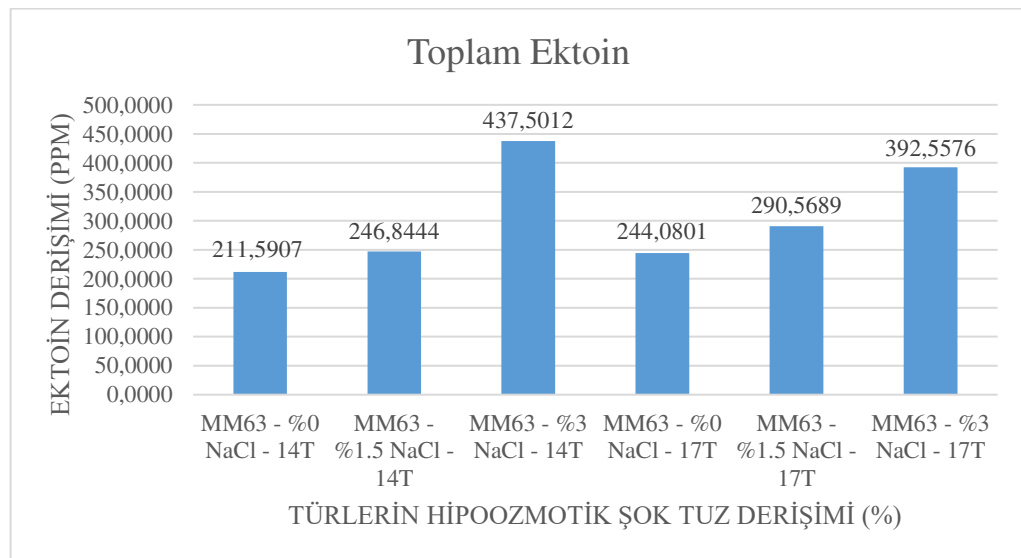
Şekil 3.9. Numunelere ait kromatogram örnekleri. a) *Chromohalobacter israelensis* Ba1 suşu hücre dışı ektoin numunesi kromatogramı. b) *Chromohalobacter israelensis* Ba1 suşu hücre içi ektoin numunesi kromatogramı c) *Halomonas* sp. P-6-8-3 suşu hücre dışı ektoin numunesi kromatogramı. d) *Halomonas* sp. P-6-8-3 suşu hücre içi ektoin numunesi kromatogramı

Toplam ektoin konsantrasyonu, hücre içi ve hücre dışı ektoin konsantrasyonlarının toplamı olup elde edilen verilen Şekil 3.10, Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de gösterilmiştir.

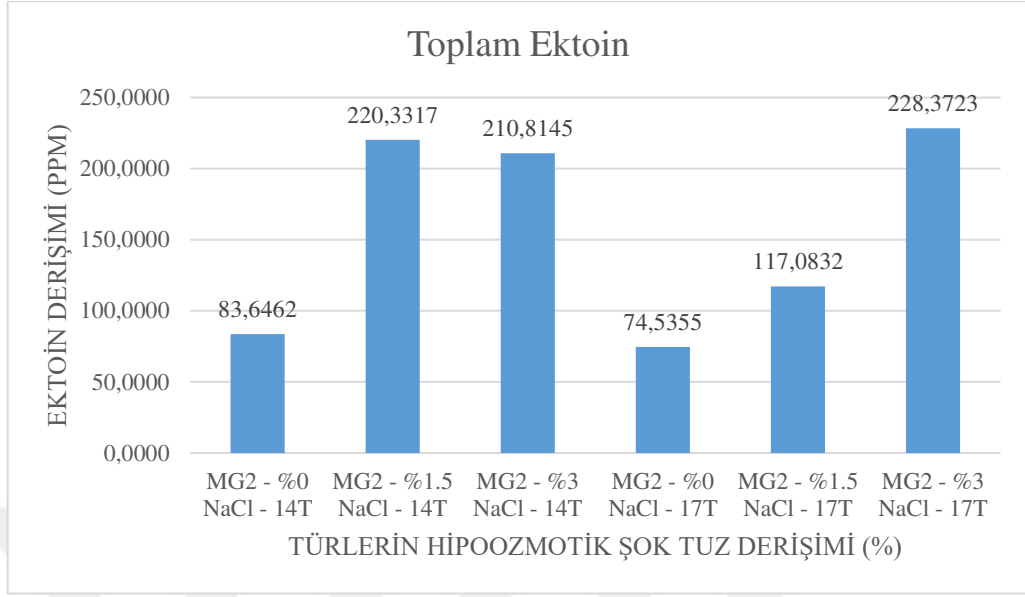
Elde edilen verilere göre; MM63 besiyerinde yapılan üretim ve bakteriyel sağım işlemleri sonucunda en iyi salınımın ve toplam ektoin eldesindeki maksimum verimin her iki suş için %3 NaCl içeren steril distile suda olduğu gözlemlenirken, MG besiyerinde maksimum verimin *Chromohalobacter israelensis* Ba1 suşu için %1,5 NaCl içeren steril distile suda olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.10. MM63 besiyerinde tek döngü (bir hiperozmotik şok, üç hipoozmotik şok) sonucu elde edilen toplam ektoin konsantrasyonları grafiği



Şekil 3.11. MM63 besiyerinde 3 döngü (tek döngüsünde bir hiperozmotik şok, bir hipoozmotik şok) sonucu elde edilen toplam ektoin konsantrasyonları grafiği



Şekil 3.12. *MG besiyerinde tek döngü (bir hiperozmotik şok, üç hipoozmotik şok) sonucu elde edilen toplam ektoin konsantrasyonları grafiği*

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Tuz üretilen ve çıkarılan kaynaklar tuzla olarak tanımlanır. Türkiye İç Anadolu Bölgesi'nde Çankırı'dan başlayarak Yozgat, Sivas, Erzincan, Erzurum, Kağızman ve Tuzluca üzerinden İran'a kadar uzanan tuz yataklarına sahip olmakla birlikte bu yataklarda çok sayıda (30'dan fazla) kaya ve kaynak tuzlası bulunmaktadır (Doğanay, 2006; Güngörmez, 2015). Bu çalışmada Tunceli'nin Pülümür ilçesinde bulunan kaynak tuzlarından alınan su örnekleri kullanılmıştır.

Birçok ekstremofilik mikroorganizma çevrelerine adaptasyonlarının bir sonucu olarak biyoteknolojik ve ticari öneme sahip birçok madde üretmektedir. Halofilik *Archaea*'lar (arkeler) hipersalin ortamlarda yüksek miktarlarda tuz biriktirerek, sitoplazmalarının osmotik dengesini korurken (ki bu osmoregülasyon mekanizması; tuz varlığında hücre içi enzimlerin özel uyarımlarını gerektirir); halofilik ve halotolerant *Eubacteria* (öbakteriler) hücre içinde çeşitli ozmotik çözünenleri yüksek konsantrasyonlarda biriktirerek dış ortam ile sitoplazmalarının osmotik dengesini korurlar (burada hücre içi enzimlerin özel bir tuz toleransı yoktur). Bu ozmotik çözünenlerin başında ektoin ve hidroksi ektoin gelmektedir (Margesin ve Schinner, 2001). Ektoin, betain tipi uyumlu çözünen maddelerin aksine güçlü bir UV emicidir ve cilt bakımından göz damlalarına, burun spreylерinden, inflamasyon üzerindeki hafifletici etkisi olan kremlere kadar birçok sağlık ve bakım ürünlerinde başarıyla tanımlanan tek uyumlu çözünen maddedir (Kunte vd., 2014). Bu çalışmada Pülümür (Tunceli) kaynak tuzlarından yapılan izolasyon ve tür tayini sonucu seçilen *Halomonas sp. P-6-8-3* ve *Chromohalobacter israelensis Ba1* suşlarının ektoin üretim yetenekleri araştırılmıştır.

2005 yılında Onraedt ve arkadaşlarının *Brevibacterium epidermis* DSM 20659 suşunda yüksek hücre yoğunluğuna sahip kesikli beslemeli fermantasyon ile yapmış oldukları çalışmalarda; ektoin konsantrasyonundaki bir artışın hücre yoğunluğundaki bir artışa bağlı olduğunu bildirmişlerdir. 100 saatlik fermantasyon sonunda 1 mol/L NaCl içeren ortamda 49 g/L hücre yoğunluğu ve 8 g/L ektoin konsantrasyonu elde etmişlerdir. Ektoin üretkenliği ve verimini hesapladıklarında sırasıyla 1,92 g/L/gün ve 0,05 g/g bulmuşlardır.

Zhang ve arkadaşları (2009), *Halomonas salina* DSM 5928 suşunda karbon kaynağı olarak monosodyum glutamat içeren ortam kullanarak ektoin üretimini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmalarda *Halomonas salina* DSM 5928 suşu tarafından ektoin üretildiğini,

ektoinin kısmen hücreler tarafından ortama atıldığını ve ortamda biriktirildiğini doğrulayarak, bu suştan en yüksek ektoin üretkenliği düzeyi olan 7.9 g/L/d ektoin elde etmişlerdir.

Guzman ve arkadaşları (2009), iki beslemeli kesikli kültür içeren bir süreç kullanarak, ektoin ve PHB (3-hidroksibütirat)'ın birlikte üretimi için orta düzey halofilik bir tür olan *Halomonas boliviensis* ile çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmalar *Halomonas boliviensis*'in ektoin üretimi için potansiyel aday olduğunu ayrıca ektoin üretimiyle beraber PHB ürünlerinin üretiminin birleştirilme olasılığının olduğunu göstermiştir. Elde edilen 11.7 g/L hücre kuru ağırlığının; ağırlıkça %8.9'u PHB, %8.4'ü ektoin olarak biriktirildiğini tespit etmişlerdir.

Parwata ve arkadaşları (2018); çalışmalarında *Halomonas elongata* BK-AG25 suşunun ektoin üretimi üzerindeki üretkenliğini hücre kuru ağırlığının her bir gramı için yaklaşık olarak 206.4 mg olarak belirlemiştir. Bakteriyel sağım tekniği; bakteriler tarafından üretilen ektoinin çıkarılmasının etkili bir yolu olup, ektoinin çoğu hiperozmotik ve hipoozmotik şokun çoklu döngülerinden sonra hücrelerden salınabilir. Üretilen toplam ektoin, iki günlük kültivasyondan sonra yaklaşık 1.11 g/L iken bakteriyel sağım işleminin dört döngüsünden sonra yaklaşık 2.26 g/L ektoin elde etmişlerdir. Yaptıkları çalışmalarda *Halomonas elongata* BK-AG25 suşunun ektoin üretkenliğinin *Halomonas elongata* DSM 142^T suşundan oldukça yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Sauer ve Galinski (1998), *Halomonas elongata* DSM 142^T suşunda ektoin üretkenliğinin hücre kuru ağırlığının her gramı için 155 mg olduğunu tespit etmişlerdir.

MM63 ve MG besiyerleri kullanılarak 48. saat (OD:1,00) üslü büyüme fazında hücreler santrifüjlenerek toplanmış ve ektoin üretimi için yüksek konsantrasyonda tuz içeren MM63 ve MG besiyerlerine aktarılmıştır. Ektoin üretimi yapan hücreler hipoozmotik şok sonrası ektoinin büyük bir kısmını hücre dışına salgımlarken (ekstrasellüler ektoin); bir kısım ektoin hücre içinde (intraseellüler ektoin) kalmıştır. Toplam ektoin konsantrasyonu; hücre içi ve hücre dışı ektoin konsantrasyonlarının toplamıdır. Ektoin tayini HPLC cihazı ile yapılmıştır. Ticari bir ektoinle; ektoinin alıkonma süresi tespit edilerek numuneler için kalibrasyon grafiği çizilip denklem belirlenmiştir. Süpernatantlar 0.2µm filtrelerden geçirilmiş, filtratların ektoin konsantrasyonu C18 kolonda, 0,900 ml/dk akış hızında, gradiyent elüsyon yapılarak ve 220 nm'de görüntülenerek belirlenmiştir.

Halomonas sp. P-6-8-3 ve *Chromohalobacter israelensis Ba1* suşuna ait hücre içi ve hücre dışı ektoin konsantrasyonları MM63 ve MG besiyerleri için ayrı ayrı belirlenmiştir. Her iki tür için MM63 besiyeri kullanılarak bir hiperozmotik şok ve üç hipoozmotik şok olarak bakteriyel sağımı içeren tek döngü ve tek döngüsü bir hiperozmotik şok ve bir hipoozmotik şok olacak şekilde bakteriyel sağımı içeren üç döngü; MG besiyeri kullanılarak bir hiperozmotik şok ve üç hipoozmotik şok olarak bakteriyel sağımı içeren tek döngü, farklı tuzluluklarda hipoozmotik şoka maruz bırakılarak uygulanmıştır. Elde edilen hücre içi ve hücre dışı ektoin konsantrasyonları Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te verilmiştir. Her iki suşa ait en yüksek toplam ektoin konsantrasyonu MM63 besiyerinde %3 tuzlulukta uygulanan hipoozmotik şokta gözlemlenirken; MG besiyerinde *Halomonas sp. P-6-8-3* suşunda %3 tuzlulukta ve *Chromohalobacter israelensis Ba1* suşunda ise %1,5 tuzlulukta gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda hücre canlılığını kontrol etmek amacıyla LB besiyerine yapılan ekimlerde farklı tuzluluklarda yapılan hipoozmotik şok sonrasında hücre canlılığının sırasıyla %3 NaCl, %1,5 NaCl ve %0 NaCl içeren steril distile sularda daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.1. MM63 besiyeri tek döngü (bir hiperozmotik şok, üç hipoozmotik şok) ektoin konsantrasyonları

Örnek	Hücre Dışı (ppm)	Hücre İçi (ppm)	Toplam (ppm)
MM63 - %0 NaCl - 14T	178,2338	1,0033	179,2371
MM63 - %1.5 NaCl - 14T	182,5439	10,1501	192,6940
MM63 - %3 NaCl - 14T	160,4092	35,8674	196,2766
MM63 - %0 NaCl - 17T	165,2333	1,2001	166,4334
MM63 - %1.5 NaCl - 17T	180,1741	9,0490	189,2231
MM63 - %3 NaCl - 17T	156,4640	58,9257	215,3897

Tablo 4.1 incelendiğinde tek döngü olarak MM63 besiyeri ile yapılan çalışmalarda *Halomonas sp. P-6-8-3* ve *Chromohalobacter israelensis Ba1* suşuna ait en yüksek hücre dışı ektoin konsantrasyonunun %1,5 tuzlulukta olduğu görülürken, *Halomonas sp. P-6-8-3* ve *Chromohalobacter israelensis Ba1* suşuna ait en yüksek hücre içi ektoin konsantrasyonunun ise %3 tuzlulukta olduğu görülmüştür.

Tablo 4.2. MM63 besiyeri üç döngü (tek döngüsünde bir hiperozmotik şok, bir hipoozmotik şok) ektoin konsantrasyonları

Örnek	Hücre Dışı (ppm)	Hücre İçi (ppm)	Toplam (ppm)
MM63 - %0 NaCl - 14T	200,4672	11,1235	211,5907
MM63 - %1.5 NaCl - 14T	226,6526	20,1917	246,8444
MM63 - %3 NaCl - 14T	369,6016	67,8996	437,5012
MM63 - %0 NaCl - 17T	233,9497	10,1304	244,0801
MM63 - %1.5 NaCl - 17T	279,2359	11,3330	290,5689
MM63 - %3 NaCl - 17T	342,6662	49,8914	392,5576

Tablo 4.2 incelendiğinde üç döngü olarak MM63 besiyeri ile yapılan çalışmalarda *Halomonas sp. P-6-8-3* ve *Chromahalobacter israelensis Ba1* suşuna ait en yüksek hücre dışı ektoin konsantrasyonunun %3 tuzlulukta olduğu gözlenirken, en yüksek hücre içi ektoin konsantrasyonun yine %3 tuzlulukta olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.3. MG besiyeri tek döngü (bir hiperozmotik şok, üç hipoozmotik şok) ektoin konsantrasyonları

Örnek	Hücre Dışı (ppm)	Hücre İçi (ppm)	Toplam (ppm)
MG2 - %0 NaCl - 14T	76,1027	7,5435	83,6462
MG2 - %1.5 NaCl - 14T	72,0347	148,2970	220,3317
MG2 - %3 NaCl - 14T	41,8422	168,9723	210,8145
MG2 - %0 NaCl - 17T	70,1070	4,4285	74,5355
MG2 - %1.5 NaCl - 17T	76,7951	40,2881	117,0832
MG2 - %3 NaCl - 17T	44,8582	183,5142	228,3723

Tablo 4.3 incelendiğinde tek döngü olarak MG besiyeri ile yapılan çalışmalarda ise MM63 besiyerinden farklı olarak hücre içindeki ektoin konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu görülmekte ve bu farklılığın kullanılan besiyerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. *Halomonas sp. P-6-8-3* ve *Chromahalobacter israelensis Ba1* suşuna ait en yüksek hücre içi ektoin konsantrasyonunun %3 tuzlulukta olduğu tespit edilirken, en yüksek hücre dışı ektoin konsantrasyonu *Halomonas sp. P-6-8-3* suşu için %1,5 tuzlulukta iken *Chromahalobacter israelensis Ba1* suşu için %0 tuzlulukta olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak;

1. Pülümür (Tunceli) kaynak tuzlarından kültür bağımlı yöntemlerle izolasyon ve saflaştırma yapılmış; mikroorganizmaların 16S rRNA geninin analizine dayalı filogenetik identifikasyonları gerçekleştirilmiştir.
2. Epifluoresan Mikroskopi ile yapılan incelemeler sonucunda çalışılan mikroorganizmaların kısa basil morfolojiye sahip oldukları gözlenmiştir.
3. Yüksek tuz stresine sokuldukları zaman *Halomonas sp. P-6-8-3* ve *Chromohalobacter israelensis Ba1* suşlarının ektoin sentezledikleri ve biriktirdikleri tespit edilmiştir.
4. *Halomonas sp. P-6-8-3* ve *Chromohalobacter israelensis Ba1* suşlarının ektoin konsantrasyonları HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemiyle belirlenmiştir.
5. Çalışılan suşların farklı besiyerlerinde, farklı tuzluluklarda hipoozmotik şoka maruz bırakıldıklarında ektoin konsantrasyonlarında farklılıklar meydana geldiği tespit edilmiştir. Ayrıca uygulanan bakteriyel sağım prosesindeki döngü sayısının toplam ektoin konsantrasyonu ve canlı hücre sayısı üzerine önemli ölçüde etki ettiği belirlenmiştir.

Bu çalışmanın devamında;

1. *Halomonas sp. P-6-8-3* ve *Chromohalobacter israelensis Ba1* suşlarının şişe kültüründe yapılan çalışmaları biyoreaktörlere aktararak, optimal koşullar biyoreaktörde tespit edilmeli ve bu koşullar sağlanarak ektoinin büyük ölçekli biyoteknolojik üretimi yapılmalıdır.
2. Üretilen ektoinler saflaştırılarak NMR (Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi) ve LC-MS (Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometresi) analizleri yapılmalıdır.

KAYNAKÇA

- Aksöz, N. (1985). Halofilik Bakteriler. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 19: 161-167.
- Atlas, R. M. (2004). *Handbook of microbiological media* (3rd. ed). CRC press.
- Barth, S., Huhn, M., Matthey B, Klimka, A., Galinski, E. A., & Engert, A. (2000). Compatible solute supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66(4), 1572– 1579.
- Bass-Becking, L. G. M. (1931). Historical notes on salt and salt-manufacture. *The Scientific Monthly*, 32(5), 434-446.
- Baumgartner, J. G. (1937). The salt limits and thermal stability of a new species of anaerobic halophile. *Journal of Food Science*, 2(4), 321-329.
- Becker, J., Schäfer, R., Kohlstedt, M., Harder, B. J., Borchert, N. S., Stöveken, N., Bremer, E., & Wittmann, C. (2013). Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine. *Microbial Cell Factories*, 12, 110.
- Bownik, A., & Stępniewska, Z. (2016). Ectoine as a promising protective agent in humans and animals. *Arh Hig Rada Toksikol*, 67(4), 260-265.
- Buenger, J., Degwert, J., & Driller, H. (2001). The protective function of compatible solute ectoine on skin cells and its biomolecules with respect to UV-radiation, immunosuppression and membrane damage. *IFSCC Magazine*, 4, 1-6.
- Cowan, D. A., Ramond, J. B., Makhalanyane, T. P., & De Maayer, P. (2015) Metagenomics of extreme environments. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 25, 97–102.
- Chen, J., Liu, P., Chu, X., Chen, J., Zhang, H., Rowley, D. C., & Wang, H. (2020). Metabolic pathway construction and optimization of *Escherichia coli* for high-level ectoine production. *Current Microbiology*, Vol. 77, 1412-1418.
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., & Bork, P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 311(5765), 1283-1287.

- Czech, L., Hermann, L., Stöveken, N., Richter, A. A., Höppner, A., Smits, S. H. J., Heider, J., & Bremer, E. (2018). Role of the extremolytes ectoine and hydroxyectoine as stress protectants and nutrients: genetics, phylogenomics, biochemistry, and structural analysis. *Genes*, 9(4), 177.
- Da Costa, M. S., Santos, H., Galinski, E. A., & Antranikian, G. (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Advances Biochemical Engineering/Biotechnology*, 61: 117–53.
- Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., & Vermelho, A. B. (2015). Marine extremophiles : a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine Drugs*, Vol. 13, 1925-1965.
- DasSharma, P., Coker J., Valeria, H., & DasSharma, S. (2010). Halophiles, industrial applications. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, 1-9.
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2017). Halophiles. *John Wiley & Sons.*, 1-13.
- Delgado, Garcia, M., Urdiales, B. V., Gonzalez, C. N. A., Esquivel, J. C. C., & Herrera, R. R. (2012). Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2575-2580.
- Doğanay, S. (2006). Kaynak tuzlarına bir örnek: Aşkale Tuzlası. *Doğu Coğrafya Dergisi*, 11(15), 155-174.
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 135.
- Ergin, Z. (1988). Tuzun üretim teknoloji ve insan sağlığındaki yeri. *Madencilik*, XXVII (1), 9-30.
- Eser, B., & Dinçel, A. S. (2018). Kromatografiye giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Journal of Health Services and Education*, 2(2), 55-57.
- Galinski, E. A., Pfeiffer, H. P., & Truper, H. G. (1985). 1,4,5,6-Tetrahydro-2methyl-4-pyrimidine-carboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic

- phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *European Journal of Biochemistry*, 149(1), 135-139.
- Graf, R., Anzali, S., Buenger, J., Pfluecker, F., & Driller, H. (2008). The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clinics in Dermatology*, 26, 326-333.
- Guo, J., Zhou, J., Wang, D., Tian, C., Wang, P., & Salah Uddin, M. (2008). A novel moderately halophilic bacterium for decolorizing azo dye under high salt condition. *Biodegradation* 19(1), 15–19.
- Guzmán, H., Van-Thuoe, D., & Martín, J. (2009). A process for the production of ectoine and poly (3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6), 1069-1077.
- Güngörmez, H. (2015). İktisadi açıdan bir faaliyet: Tuzluca Kaya Tuzlası. *Coğrafya Dergisi*, 30, 26-37.
- He, Y. Z., Gong, J., Yu, H. Y., Tao, Y., Zhang, S., & Dong, Z. Y. (2015). High production of ectoine from aspartate and glycerol by use of whole-cell biocatalysis in recombinant *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 14, 55.
- Hof, T. (1935). Investigations concerning bacterial life in strong brines. *Recueil des travaux botaniques néerlandais*, 32(1), 92-173.
- Kahyaoğlu, M. (2008). Biyosüpfektanların antimikrobiyal aktiviteleri ve uygulama alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24(1-2), 39-51.
- Kanapathipillai, M., Lentzen, G., Sierks, M., & Park, C. B. (2005). Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *Federation of European Biochemical Sociests, Letters* 579, 4775-4780.
- Karan, R., Kumar, S., Sinha, R., & Khare, S. K. (2012). Halophilic mikroorganisms as sources of novel enzymes. *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*, 555-579.
- Kunte, H. J., Lentzen, G., & Galinski, E. A. (2014). Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products. *Current Biotechnology*, 3, 10-25.

- Kushner, D. (1985). The Halobacteriaceae. *The bacteria En C. Woese and Wolfe*, S (ed.), Vol 8, 171-214, Academic Press, London.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
- Lang, Y. J., Bai, L., & Ren, Y. N. (2011). Production of ectoine through a combined process that uses both growing and resting cells of *Halomonas salina* DSM 5928^T. *Extremophiles*, Vol.15, 303-310.
- Lentzen G, Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 623–34.
- Lippert, K. & Galinski, E. A. (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 61-65.
- Liu, M., Liu, H., Shi, M., Jiang, M., Li, L., & Zheng, Y. (2021). Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals. *Microbial Cell Factories*, 20:76.
- Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11th edn. (Çeviri: Çökmüş, C.), Ankara, Palme Yayıncılık, 2012.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potantial of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83.
- Marini, A., Reinelt, K., Krutmann, J., & Bilstein, A. (2014). Ectoine-containing cream in the treatment of mild to modarate atopic dermatitis: a randomised, comporator-controlled, intra-individual double blind, multi-center trial. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27, 57-65.
- Mohr, V. & Larsen, H. (1963). On the scructural transformations and lysis of *Halobacterium salinarum* in hypotonic and isotonic solutions. *Journal of General Microbiology*, 31, 267-280.
- Mutlu, M. B. (2006). Tuz Gölü bakterilerinin karakterizasyonu ve mevsimsel dağılımı. Doktora Tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Ng, H. S., Wan, P. K., Ng, T. C., & Lan, C. W. (2020). Primary purification of intracellular *Halomonas salina* ectoine using ionic liquids-based aqueous biphasic system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 130, No. 2, 200-204.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., & Swartzell, S. (2000). Genome sequence of *Halobacterium species NRC-1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12176-12181.
- Onraedt, A. E., Walcorius, B. A., Soetaert, W. K. & Vandamme, E. J. (2005). Optimization of ectoine synthesis through fed-batch fermentation of *Brevibacterium epidermis*. *Biotechnol. Prog.*, Vol. 21(4), 1206-1212.
- Oren, A., & Gurevich, P. (1995). Dynamics of a bloom of halophilic archaea in the Dead Sea. *Hydrobiologia*, 315(2), 149-158.
- Oren, A., & Litchfield, C. D. (1998). Early salt production at the Dead Sea and the Mediterranean coast of the Holy Land. *Journal of salt history*, 6, 7-18.
- Oren, A. (2014). Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles*, 18(5), 825-834.
- Oren, A. (2015). Halophilic microbial communities and their environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 33:119–124.
- Parwata, I. P., Wahyuningrum, D., Suhandono, S., & Hertadi, R. (2018). Production of ectoine by *Halomonas elongata* BK-AG25 using osmotic shock technique. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 209, 12017.
- Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., Iborra, J. L., Vargas, C., Nieto, J. J., & Cánovas, M. (2010). Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances*, 28, 782-801.
- Pierce, G. J. (1914). The behavior of certain microorganisms in brine. *Carnegie Inst Washington Publ.*, 193, 49-69.

- Polat, S., & Güney, Y. (2018). Karasu Irmağı (Fırat) Yukarı Havza Kesiminde Tuzlu-Acı Su Kaynakları ve Tuzlalar. *Gaziantep University Journal of Social Sciences*, 17(3), 774-795.
- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifor, M., & Fava, F. (2015). Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 99, 7907-7913.
- Richter, A.A., Nils-Mains, C., Czech, L., Geyer, K., Hoepfner, A., Smits, S.H.J., Erb, T.J., Bange, G., & Bremer, E. (2019). Biosynthesis of the stress-protectant and chemical chaperon ectoine: biochemistry of the transaminase EctB. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 10, Article 2811.
- Roberts, M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, Vol. 1(1), 1-30.
- 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.
- Sauer, T. & Galinski, E. A. (1998). Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *John Wiley & Sons, Inc., Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 57, No:3, 306-313
- Schröter, M. A., Meyer, S., Hahn, M. B., Solomun, T., Sturm, H., & Kunte, H. J. (2017). Ectoine protects DNA from damage by ionizing radiation. *Scientific reports*, 7(1), 15272.
- Shakuri, S., Latifi, A. M., Mirzaei, M., & Khodi, S. (2016). Isolating two native extrem halophilic bacterial strains producing bacteriorhodopsin protein from Aran-Bidgol Lake. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 3(3), 447-451.
- Shivanand, P., & Mugeraya, G. (2011). Halophilic bacteria and their compatible salutes, osmoregulation and potential applications. *Current Science*, Vol. 100(10), 1516-1521.
- Sing, R. (2013). HPLC method development and validation- an overview. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, Vol. 4(1), 26-33.

- Strong, P. J., Kalyuzhnaya, M., Silverman, J., & Clarke W.P. (2016). A methanotroph-based biorefinery: potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation. *Bioresource Technology*, 215, 314–23.
- Uchida, M, Miyoshi, T, Yoshida, G, Niwa, K, Mori, M., & Wakabayashi, H. (2014). Isolation and characterization of halophilic lactic acid bacteria acting as a starter culture for sauce fermentation of the red alga Nori (*Porphyra yezoensis*). *Journal of Applied Microbiology*, 116, 1506 -1520.
- Van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 6, 213–218.
- Ventosa, A., & Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 85-94.
- Ventosa, A., Nieto, J. J., & Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 504-544.
- Ventosa, A., de la Haba, R. R., Sanchez-Porro, C., & Papke, R. T. (2015). Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology*, Vol.25, 80–87.
- Volcani, B. E. (1944). The microorganisms of the Dead Sea. Papers collected to commemorate the 70th anniversary of Dr. Chaim Weizmann, 71, 85.
- Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., & Takabe, T. (2016). Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. *AIMS Microbiol*, 2(1), 42-54.
- Yang, C., Wang, Z., Li, Y., Niu, Y., Du, M., He, X., Ma, C., Tang, H., & Xu, P. (2010). Metabolic versatility of halotolerant and alkaliphilic strains of *Halomonas* isolated from alkaline black liquor. *Bioresource technology*, 101(17), 6778-6784.
- Yaşar, M., & Uygün, A. (1979). Maden Tetkik ve Arama Enstitüsü Genel Direktörlüğü, Endüstriyel Hammaddeler Dair, Tuz, Ankara
- Yazıcı, H., & Başbüyük, A. (1998). Kemah (Erzincan) Tuzlaları. *Türk Coğrafya Dergisi*, 33, 53-78.

- Yıldız, A., Genç, Ö., & Bektaş, S. (1997). Enstrümental analiz yöntemleri. *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*. Ankara.
- Yüce, S., Tahtacı, S., & Kılıç, G. B. (2017). Halofilik laktik asit bakterilerinin ürettiği hidrolitik enzimler. *GIDA*, 42(3), 242-251.
- Zhang, L. H., Lang, Y. H., & Nagata, S. (2009). Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain. *Extremophiles*, 13(4), 714-724.
- Zhao, B., Lu, W., Yang, L., Zhang, B., Wang, L., & Yang, S.S. (2006). Cloning and characterization of the genes for biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T. *Current Biotechnology*, Vol. 53, 183–188.
- Zhao, Q., Li, S., Lv, P., Sun, S., Ma, C., Xu, P., Su, H., & Yang, C. (2019). High ectoine production by an engineered *Halomonas hydrothermalis* Y2 in a reduced salinity medium. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 184.
- <https://www.bitop.de/en/products> (Erişim: 18 Kasım 2021) (http-1).
- http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Biyoteknoloji/Kromatografi.html (Erişim: 13 Mayıs 2021) Fidancı, U. R. (2009). Kromatografi ders notları, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı (http-2).
- <https://www.agri.edu.tr/detail.aspx?id=1451&bid=262&tid=6&dil=tr-TR> (Erişim: 21 Mayıs 2021) Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, HPLC (http-3).
- <https://www.bilimvetekno.com/hpcl-nedir-nasil-yapilir/> (Erişim: 4 Haziran 2021) (http-4).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ezgi TOSUN

Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim Geçmişi

- Yüksek Lisans-2022, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalı
- Lisans-2016, Marmara Üniversitesi, Atatürk Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü

Yayımları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

- 2021, Sözlü Sunum (Halofilik Mikroorganizma İzolatlarının Ektoin Üretim Yeteneklerinin Araştırılması) 4. Ulusal Uygulamalı Biyolojik Bilimler Kongresi, Online