



**MİKROBİYAL METABOLOMİK ÜZERİNE
YAKLAŞIMLAR
Doktora Tezi**

Şenay ESER

Eskişehir 2025

MİKROBİYAL METABOLOMİK ÜZERİNE YAKLAŞIMLAR

Şenay ESER

DOKTORA Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz 2025

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 20DRP224 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Şenay ESER'in MİKROBİYAL METABOLOMİK ÜZERİNE YAKLAŞIMLAR başlıklı çalışması 10/07/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Jüri Üyeleri</u>	<u>Unvan Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye	: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU	
Üye	: Prof. Dr. Yasemin ÇİMEN MUTLU	
Üye	: Prof. Dr. İsmail POYRAZ	
Üye	: Prof. Dr. Volkan KILIÇ	
Üye	: Doç. Dr. Aysel GÜLBANDILAR	

Prof. Dr. Harun BÖCÜK

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

10/07/2025

DANIşMAN ONAYI

Danişmanlığını yürüttüğüm Doktora ğrencisi şenay ESER, MİKROBİYAL METABOLOMİK ÜZERİNE YAKLAşIMLAR başlıklı tez çalışmasını tamamlamıştır. Hazırlamış olduğu tez tarafımca incelenmiş ve öğrencinin tez savunma sınavına alınması bilimsel ve etik açıdan uygun görülmüştür.

Tez Danişmanı

Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

ÖZET

MİKROBİYAL METABOLOMİK ÜZERİNE YAKLAŞIMLAR

Şenay ESER

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2025

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Bu tez çalışması kapsamında, Türkiye'nin deniz kaynaklı en büyük tuzlası olan, İzmir Çamaltı Tuzlasının 6 farklı tuzluluğa sahip havuzlarından alınan tuzlu su örneklerinin fizikokimyasal bileşimleri belirlenmiş, ayrıca mikrobiyal çeşitlilikleri kültür bağımlı ve kültür bağımsız yöntemlerle çalışılmıştır. Çeşitli seçici kültür ortamları hazırlanarak, farklı tuzluluklardaki havuzlarda baskın şekilde görülen ve havuzun metabolik bileşimi açısından önemli rol oynayan ancak zor kültüre edilebilen mikroorganizmalar kültüre edilmeye çalışılmıştır. Yüksek tuzluluklarda *Halorubrum* cinsine ait 14 izolatın 9 farklı türü, ayrıca 3 farklı *Haloarcula*, orta ve düşük tuzluluklarda 15 farklı halofilik bakteri türü belirlenmiştir. Yüksek tuzlulukta ve Basitrasin içeren besi yerlerinde geliştirilerek izole edilen ikinci bir kültür çalışması ile; *Halorubrum* (11 izolat), *Haloarcula* (5 izolat) ve *Haloferax* (3 izolat) cinsi arke üyeleri ve bakteri cinslerinden de *Salicola*, *Halovibrio* ve *Halospina* cinsleri izole edilerek stokları hazırlanmıştır. Değişken tuzlulukta bulunan havuz sularında DAPI ile boyanma sonrası sayılarak belirlenen prokaryotik hücre yoğunluğu; $(0.7-4.1) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ aralığında belirlenmiştir. Aynı zamanda çevresel örneklerden ve kültürlerden Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi ile metabolomik veriler elde edilmiştir. Tuzla havuz sularında bulunan metabolitleri belirlemeye yönelik yapılan analizler sonrasında tüm tuzlulukta bulunan örneklerde gliserol, organik asitler ve yağ asitleri gibi bileşenler değişken oranlarda belirlenebilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Mikrobiyal çeşitlilik, Değişken tuzluluklar, Mikrobiyal metabolik, Halofilik arke, Halofilik bakteri

ABSTRACT

APPROACHES TO MICROBIAL METABOLOMICS

Şenay ESER

Department of Biyoloji

Programme in Fundamental and Industrial Microbiology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, July 2025

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Within the scope of this study, the physicochemical compositions of brine samples taken from six different salinity pools of the Çamaltı Salt Lake in Izmir, Turkey's largest marine salt lake, were determined, and their microbial diversity was studied using culture-dependent and culture-independent methods. Various new selective culture media were prepared to cultivate microorganisms from pools from 6 different salinities, which are predominant in these pools and play an important role in determining the metabolic composition of the pool but are difficult to cultivate. Fourteen isolates belonging to the *Halorubrum* genus, representing nine different species, as well as three different *Haloarcula* species, and 15 different halophilic bacterial species were identified in medium and low salinity pools. In a second culture study developed at high salinity and in media containing Basitrasin, members of the archaeal genera *Halorubrum* (11 isolates), *Haloarcula* (5 isolates), and *Haloferax* (3 isolates), as well as the bacterial genera *Salicola*, *Halovibrio*, and *Halospina*, were isolated and their stocks were prepared. The prokaryotic cell density in pond waters with variable salinity, determined by counting after staining with DAPI was found to be in the range of $(0.7-4.1) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Metabolomic data were obtained from environmental samples and microbial cultures using Gas Chromatography Mass Spectrometry. As a result of the analyses carried out to determine the metabolites present in salt pond waters, components such as glycerol, organic acids and fatty acids were detected in varying proportions in all salinity samples.

Keywords: Microbial diversity, Variable salinities, Microbial metabolomics, Halophilic archaea, Halophilic bacteria.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında kafamda beliren soru işaretlerini ve fikirleri tereddüt etmeden danışabildiğim, beni yapabileceklerim konusunda hep teşvik eden ve destekleyen, bunun yanı sıra uzun süren kesintili çalışma dönemim boyunca, çalışmalar için gerekli en ufak bir malzeme ya da analiz ihtiyacım olduğunda bu imkanları hızla yaratan, doktora sürecimin son döneminde yaşadığım zorluklarda manevi desteği ve çalışmamı sürdürme konusundaki teşvik edici, her zaman çözüm odaklı ve olumlu yaklaşımı için değerli tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya içten teşekkür ederim.

Aynı şekilde manevi desteğinin yanı sıra kromatografik analiz için gerekli şartları her ihtiyaç duyduğumuzda hemen sağlayan, çalışmam süresince desteğini hep hissettiğim Prof. Dr. Yasemin ÇİMEN MUTLU'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca tez izleme komitemde yer alan ancak bu son dönemde ayrılmak durumunda kalan, destekleyici ve yapıcı üslubu ile hep güzel katkılar sağlayan Prof. Dr. Semra İLHAN'a teşekkür ederim.

Çalışmada kullandığımız su örneklerinin alınmasına izin verdikleri için, ayrıca su örneklerin alınması sırasındaki yönlendirmeleri ve destekleri için, Binbir Gıda Çamaltı Tuz İşletmesi Yönetimine teşekkür ederim.

Çalışmalarımı sürdürmem konusundaki sonsuz motivasyonu ve desteği için arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Sibel BÜYÜKTÜRYAKİ'ye, AÜBİBAM'daki tüm çalışma arkadaşlarıma, Ece ŞENEL, Ezgi TOSUN ve Suat SEZEN'e, destekleri ve sevgileri için eşim Ercüment ESER'e ve kızım Seden İzgü ESER'e, abime ve aileme teşekkür ederim.

Şenay ESER

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.

Şenay ESER

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	XIII
GÖRSELLER DİZİNİ	XV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XVIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Halofilik Mikroorganizmalar İçin Muhtelif Habitatlar	2
1.1.1. Soğuk ve hipersalin çevreler	2
1.1.2. Sıcak ve hipersalin çevreler	2
1.1.3. Deniz suları, derin deniz tuzlu suları ve hidrotermal çıkışlar	3
1.1.4. Petrol yatağı tuzlu sularındaki halofilik mikroorganizmalar	3
1.1.5. Tuzlu bataklıklar, hipersalin lagünler ve çeşitli göller	3
1.1.6. Hipersalin su kaynakları.....	4
1.1.7. Hipersalin topraklar	4
1.1.8. Duvar resimleri	4
1.1.9. Çöl bitkileri ve hayvanları	4
1.2. Deniz Tuzlaları ve Tuzla Havuzlarındaki Fizikokimyasal Çevre.....	4
1.3. Tuzla Havuzlarındaki Mikrobiyal Çeşitliğin Dağılımı.....	5
1.4. Tuz Stresi ile Baş Etmek İçin Kullanılan Stratejiler	8
1.4.1. "Salt-in" dengelemek için "Salt-out" stratejisi	9
1.4.2. Uyumlu ozmotik çözünenlerin birikimi stratejisi.....	9

1.5. Mikrobiyal Dünyada Kullanılan Organik Ozmotik Çözünenler	10
1.6. Halofillerde Görülen Metabolik Çeşitlilikler.....	11
1.6.1. Oksijenik ve anoksijenik fototroflar	11
1.6.2. Aerobik heterotroflar	12
1.6.3. Anaerobik solunum	12
1.6.4. Metanojen ve homoasetojenler.....	13
1.6.5. Fermentatif halofiller	13
1.6.6. Kemootroflar ve metanotroflar	14
1.7. Farklı Salinite ve İyonik Bileşimdeki Çevrelerde Bulunan Halofiller	14
1.8. Metabolomik Nedir	15
1.8.1. Metabolomik Analiz	16
1.9. Metabolomik ve Mikrobiyal Ekoloji	16
1.10. Ayrım Teknikleri ve Dedeksiyon Metotları.....	17
1.10.1. Gaz kromatografisi (GC)	17
1.10.2. Sıvı kromatografisi (LC)	17
1.10.2. Kapiler elektroforez (CE)	18
1.10.3. Kütle spektrometrisi (MS)	18
1.10.4. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi	18
1.10.5. Metabolomik analiz tekniklerinin karşılaştırılması	19
1.11. Önceki Çalışmalar.....	19
1.11.1. Dünyada yapılmış çalışmalar	20
1.11.2. Ülkemizde yapılmış çalışmalar	21
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
2.1. Örneklemeye Çalışması.....	29
2.1.1. Örnek sayısının ve tipinin belirlenmesi ve örnek alınması	29
2.2. Örneklerin Özelliklerinin Belirlenmesi.....	31
2.2.1. Farklı tuzluluktaki örneklerin elementel bileşimlerinin belirlenmesi	32
2.2.2. Farklı tuzluluktaki örneklerin iyonik bileşimlerinin belirlenmesi:.....	32
2.2.3. Örneklerin katı madde miktarları ve yoğunluklarının belirlenmesi:.....	32

2.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	33
2.3.1. DNA ekstraksiyon tamponu	33
2.3.2. 5 M NaCl çözeltisi	33
2.3.3. %10 SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltisi	33
2.3.4. Sodyum asetat tamponu (3 M, AcNa pH 4.8).....	33
2.3.5. Lizozim enzim solüsyonu (10 mg/mL)	33
2.3.6. MgCl ₂ tamponu (1M)	34
2.3.7. 50X TAE tamponu.....	34
2.3.8. 1X TAE tamponu.....	34
2.3.9. 5X TBE tamponu	34
2.3.10. 1X TBE tamponu	34
2.4. Total DNA Ekstraksiyonu ve Metagenomik Çalışmalar İçin Örnek	
Hazırlama	34
2.4.1. Total DNA ekstraksiyon prosedürü.....	35
2.5. Kültüre Etme Çalışmaları ve Kültüre Edilenlerin Tanımlanması	36
2.5.1. Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.....	37
2.5.1.1. %12 MGM (<i>modifiye geliştirme medium</i>).....	37
2.5.1.2. %18 MGM (<i>modifiye geliştirme medium</i>).....	37
2.5.1.3. %23 MGM (<i>modifiye geliştirme medium</i>).....	37
2.5.1.4. %25 MGM (<i>modifiye geliştirme medium</i>).....	38
2.5.1.5. %30'luk tuzlu su çözeltisi.....	38
2.5.1.6. <i>Luria Bertani (LB) besiyeri</i>	38
2.5.1.7. %12 R2A sıvı besiyeri.....	39
2.5.1.8. %18 R2A sıvı besiyeri.....	39
2.5.1.9. %15 MM63 (<i>minimal medium 63</i>) (L)	39
2.6. İzolatlardan Elde Edilen 16S rRNA Ürünlerinin Enzimatik Kesimi	
(ARDRA).....	40
2.6.1. Dizi bilgisi elde edilen izolatların stok kültürlerinin	
hazırlanması.....	41
2.7. Cy3 İşaretli Oligonükleotid Problemleri ile Hibridizasyon ve	
Görüntüleme Çalışmaları (FISH)	42
2.8. Örneklerin Total DNA'ları Kullanılarak DGGE PCR Kurulması ve	
Ürünlerin Denatüre Edici Gradyent Jel Elektroforezi	44

2.8.1. 16S rRNA geninin DGGE analizi için amplifikasyonu	44
2.8.2. DGGE-I şartları.....	46
2.8.3. DGGE-II şartları	47
2.8.4. DGGE bantlarının dizi analizi	47
2.9. Metabolomik Analiz için Örnek Hazırlama ve Analizi	48
2.9.1. Gaz kromatografisi (GC) analiz şartları	48
2.9.2. Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) şartları I	48
2.9.3. GC/MS ile ekstraselüler metabolit analizleri:.....	49
2.9.4. Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) şartları II	49
2.9.5. İzolatların hücre dışı, hücre içi çözünen ve hücresele çözünmeyen metabolitlerinin analizi.....	50
2.9.5.1. Metabolit ekstraksiyonu:.....	50
2.9.5.2. Liyofilizasyon ve BSTFA ile türevlendirme:	51
2.9.5.3. Idiomarina sıvı kültürlerinin ekstraselüler ve intraselüler metabolitlerinin analizi.....	51
3. BULGULAR.....	52
3.1. Örneklem Alanı ile İlgili İzlenimler.....	52
3.1.1. Örneklem yapılan havuzlarının koordinatları, tuzluluk ve pH değerleri	52
3.2. Örneklerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	52
3.2.1. Farklı tuzlulukta örneklerin elementel bileşimleri	52
3.2.2. Farklı tuzlulukta örneklerin iyonik bileşimleri	53
3.3. Örneklerden Elde Edilen Katı Madde Miktarları ve Örneklerin Yoğunlukları	53
3.4. Total DNA Ekstraksiyonu ve Metagenomik Çalışmalar İçin Örnek Hazırlama	55
3.5. Kültüre Etme Çalışmaları ve İzolatların Seçimi	56
3.5.1. Çeşitli sıvı ve katı besiyerlerine yapılan ekimler ve izolasyonlar	56
3.5.2. Arke ve bakteri izolatlarından DNA ekstraksiyonu ve 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılması	57
3.6. İzolatlardan PCR Sonrası Elde Edilen 16S rRNA Ürünlerinin Enzimatik Kesimi (ARDRA) Sonuçları.....	57

3.6.1. Tanımlanan bakteri ve arke izolatları	60
3.6.2. Besiyeri ortamına basitrasin ilave edilerek yapılan izolasyon ve tanımlama çalışmaları	65
3.7. Cy3 İşaretli Farklı Oligonükleotid Problemleri ile Hibridizasyon ve Görüntüleme Sonuçları	68
3.7.1. Farklı tuzluluklardaki havuz örneklerinin oligonükleotid problemleri ile hibridizasyon sonrası görüntüleri	69
3.7.2. %33 Tuzluluk havuzu örneğinin EHB412 oligonükleotid probu ile hibridizasyon sonrası görüntüleri.....	71
3.8. Denatüre Edici Gradient Jel Elektrophorezi (DGGE)	72
3.8.1. DGGE_I.....	72
3.8.2. DGGE_II	73
3.8.3. DGGE bantlarının dizi analizi	75
3.9. Metabolit Analizleri	75
3.9.1 İki farklı teknikle kurutma sonrası GC/MS analizleri	75
3.9.1.1. %15 Tuzlulukta örneğe ait kromatogram ve tanımlanan bileşenler	77
3.9.1.2. %33 Tuzlulukta örneğe ait kromatogram ve tanımlanan bileşenler	78
3.9.2. İzolatların ekstraselüler metabolit analizleri	80
3.9.2.1. %25 MGM sıvı besiyerinde geliştirilen <i>Halorubrum lipoliticum</i> hücre dışı metabolitleri	80
3.9.2.2. %33 tuzluluk karışık sıvı kültürü ve steril besiyeri karşılaştırması.	80
3.9.3. <i>Halobacterium salinarum</i> 5. ve 10. saatlik kültürlerinin hücre dışı, hücresel çözünen ve hücresel çözünmeyen fraksiyonlarının metabolitleri.....	81
3.9.4. <i>Idiomarina</i> 16. ve 96. saatlik kültürlerinin hücre dışı ve hücre içi metabolit analizleri.....	87
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	90
KAYNAKÇA.....	96
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Farklı tuzluluklardan alınan örneklerin geliştirildikleri besiyerleri	37
Tablo 2.2. PZR ve Agaroj jel elektroforezi şartlar	40
Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan FISH problemlerinin dizi bilgisi	43
Tablo 2.4. Tuzluluğa karşılık kullanılan floresan işaretli oligonükleotid problemleri	44
Tablo 2.5. DGGE PCR ları için kullanılan primerler.....	44
Tablo 3.1. Örnekleme yapılan havuzların tuzluluk, pH değerleri ve koordinatları	52
Tablo 3.2. Çevresel örneklerin ICP ile belirlenen elementel bileşimleri	53
Tablo 3.3. DNA ekstraksiyonu için santrifüj sonrası süpernatantların ICP ile belirlenen elementel bileşimleri.....	53
Tablo 3.4. Farklı tuzluluktaki örneğin iyon kromatografisi ile belirlenen iyonik bileşimleri	53
Tablo 3.5. Konsantre edilen örneklerin, katı madde miktarları ve yoğunlukları	54
Tablo 3.6. Liyofilize edilen örneklerin, katı madde miktarları ve yoğunlukları.....	54
Tablo 3.7. Kültüre etme sonrası koloni sayımı yapılabilen petriler	56
Tablo 3.8. İzole edilen bakteriler ve literatürde izole edildikleri kaynak	61
Tablo 3.9. İzole edilen arkeler ve literatürde izole edildikleri kaynak.....	61
Tablo 3.10. İzolatların elde edildikleri tuzluluğa göre dağılımı.....	62
Tablo 3.11. İzole edilen arkeler ve geliştirildikleri besiyerleri	63
Tablo 3.12. İzole edilen bakteriler ve geliştirildikleri besiyerleri	64
Tablo 3.13. Tuzluluğa karşılık DAPI prokaryotik hücre sayımları	68

Tablo 3.14. %15 Tuzluluktaki örnekte belirlenen bileşenler ve bağıl yüzdeleri	77
Tablo 3.15. %33 Tuzluluktaki örnekte belirlenen bileşenler ve bağıl yüzdeleri	79
Tablo 3.16. <i>Halobacterium salinarum</i> 5. saat kültürü, hücre dışı metabolitleri	81
Tablo 3.17. <i>Halobacterium salinarum</i> 10. saat kültürü, hücre dışı metabolitleri	84
Tablo 3.18. <i>Halobacterium salinarum</i> 10. saat kültürü, hücresel çözünen metabolitleri	85
Tablo 3.19. <i>Halobacterium salinarum</i> 10. saat kültürü, hücresel çözünmeyen metabolitleri	86



GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. Binbir gıda çamaltı tuz işletmesi	30
Görsel 2.2. %33 ve %25 tuzluluk havuzları.....	30
Görsel 2.3. %19 ve %15 tuzluluk havuzları.....	31
Görsel 2.4. Örnekleme sırasında formaldehit ilavesi	31
Görsel 2.5. Stok hazırlamak için geliştirilen sıvı besiyeri kültürleri.....	41
Görsel 2.6. %23 MGM sıvı besiyerinde geliştirilerek hazırlanan stok kültürleri	42
Görsel 3.1. Çevresel örnek DNA'sı ve jelde görüntülenmesi	55
Görsel 3.2. Değişken tuzluluk havuzlarından elde edilen bakteri ve arke izolatları.....	56
Görsel 3.3. 16S rRNA bölgesinin amplifiye edilen örneklerin jel görüntüleri	57
Görsel 3.4. Arke izolatlarının Hinf I restriksiyon enzimi ile elde edilen kesim profilleri	57
Görsel 3.5. MboI enzimi ile elde edilen kesim profilleri	58
Görsel 3.6. XbaI, SpeI ve MboI enzimleri ile elde edilen kesim profilleri.	59
Görsel 3.7. ARDRA ile bakteri izolatları için belirlenen 11 farklı kesim profili.....	59
Görsel 3.8. ARDRA ile arke izolatları için belirlenen 15 farklı kesim profili.....	60
Görsel 3.9. %33 ve % 25 tuzluluk havuzları örnekleri sıvı karışık kültürleri.....	65
Görsel 3.10. %33 tuzluluk örneği-I.....	67
Görsel 3.11. %33 tuzluluk örneği-II	67
Görsel 3.12. <i>Salinibacter ruber</i>	67
Görsel 3.13. <i>Salinibacter ruber</i>	67

Görsel 3.14. %33 Tuzluluk havuzu örneği-I.....	69
Görsel 3.15. %33 Tuzluluk havuzu örneği (in site formaldehit).....	69
Görsel 3.16. %33 Tuzluluk havuzu örneği-II.....	70
Görsel 3.17. %25 Tuzluluk havuzu örneği.....	70
Görsel 3.18. %16 Tuzluluk havuzu örneği-I.....	70
Görsel 3.19. %16 Tuzluluk havuzu örneği-II.....	71
Görsel 3.20. EHB412 oligonükleotid probu ile hibridize olarak görüntülenen hücreler.....	71
Görsel 3.21. Total DNA’lardan elde edilen DGGE PCR ürünlerinin DGGE Jeli-I	73
Görsel 3.22. Total DNA’lardan elde edilen DGGE PCR ürünlerinin DGGE Jeli-II	74
Görsel 3.23. Jelden kesilen bantlar kalıp olarak kullanılarak elde edilen PCR ürünleri	75
Görsel 3.24. Konsantre örneklerin kromatogramları (tuzluluklar %3; %19; %9)	76
Görsel 3.25. Konsantre örneklerin kromatogramları (tuzluluklar %15; %25; %33)	76
Görsel 3.26. Liyofilize örneklerin kromatogramları (tuzluluklar %3; %15; %9).....	76
Görsel 3.27. Liyofilize örneklerin kromatogramları (tuzluluklar %19; %25; %33).....	77
Görsel 3.28. %15 tuzluluktaki çevresel örneğe ait kromatogram	77
Görsel 3.29. %33 tuzluluktaki çevresel örneğe ait kromatogram	78
Görsel 3.30. Halorubrum lipoliticum kültürü ekstraselluler metabolitleri.....	80
Görsel 3.31. %33 tuzluluk örneği karışık sıvı kültürü ve kontrol olarak steril besiyeri analizleri	81
Görsel 3.32. Halobacterium 5.s. kültürü; hücre dışı, hücrel çözünen ve hücrel çözünmeyen.....	83
Görsel 3.33. Halobacterium salinarum 10. saat kültürü, hücre dışı metabolitleri kromatogramı	84

Görsel 3.34. Halobacterium salinarum 10. saat kültürü, hücresel çözünen metabolitlerinin kromatogramı	85
Görsel 3.35. Halobacterium 10. saat kültürü, hücresel çözünmeyen metabolitlerinin kromatogramı	86
Görsel 3.36. 16. saat inkübasyon sonrası elde edilen hücre dışı metabolitleri.....	87
Görsel 3.37. 96. saat inkübasyon sonrası elde edilen hücre dışı metabolitleri.....	87
Görsel 3.38. 16. (Siyah) ve 96. (Mor) inkübasyon saatlerin karşılaştırılması	88
Görsel 3.39. 16. saat inkübasyon sonrası elde edilen hücre içi metabolitlerinin GC/MS kromatogramı.....	88
Görsel 3.40. 96. saat inkübasyon sonrası elde edilen hücre içi metabolitlerinin GC/MS kromatogramı.....	89

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ARDRA	: Amplifiye edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi
ARUM	: Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi
AÜBİBAM	: Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi
Br ⁻	: Bromür
BSTFA	: N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CaSO ₄	: Kalsiyum sülfat
Cl ⁻¹	: Klorür
CO ₂	: Karbondioksit
DAPI	: 4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur
DGGE	: Denatüre edici gradiyent jel elektroforezi
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
F ⁻¹	: Florür
FISH	: Fluoresan in-situ Hibridizasyon
FTMS	: Fourier Transform Kütle Spektrometresi
g/L	: gram/Litre
GC/MS	: Gaz Kromatografisi Kütle spektrometresi
ICP-OES	: İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi
KCl	: Potasyum klorür
MeOX	: Metilamin hidroklorür
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
mL/dk	: mililitre/dakika
mzXML	: eXtensible Markup Language
NaBr	: Sodyum bromür
NaCl	: Sodyum klorür
NMR	: Nükleomanyetik rezonans
NO ₂ ⁻¹	: Nitrit
NO ₃ ⁻¹	: Nitrat
PBS	: Phosphate-Buffered Saline (Fosfat-Tamponlu Salin)
PCR	: Polimerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)

PO_4^{-3}	: Fosfat
ppm	: Parts per milion (milyonda bir)
rRNA	: ribozomal Ribonükleik asit
R.T.	: Retention time (Alıkonma zamanı)
SO_4^{-2}	: Sülfat
TAE	: Tris-Acetate EDTA
TBE	: Tris-Borate-EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)
TMS	: Trimetilsilil Türevi



1. GİRİŞ

Bir set yapılır ve berrak deniz suyunu çekmek için hendekler açılır. Rengi kırmızı olana kadar uzun süre bekletilir. Yaz ve sonbaharda güney rüzgarı kuvvetli eserse, tuz gece boyunca tane tane olabilir. Güney rüzgârı gelmezse bütün kazanç kaybolur.'

İlk paragraftaki bu ifade, Çin'in Yai-cheau eyaletinde deniz suyundan tuz üretimini anlatmaktadır. Baas-Becking tarafından 1931 yılında yapılan bu çeviri, yaklaşık M.Ö. 2.700 yılına ait olduğu düşünülen, Farmakoloji ve Farmakognozi üzerine eski bir Çin eseri olan Peng-Tzao-Kan-Mu'da yer almaktadır.

1765 yılında Encyclopédie of Diderot and d'Alembert'de, doymuş tuzlu suların kırmızı renginden ise, aşağıdaki şekilde bahsedilmiştir;

'Su kırmızıya döndüğünde tuzun olduğu anlaşılır; bu haliyle güneş ve rüzgar tarafından ısıtıldığında, cam kalınlığında bir yüzey tabakasına sahip olur. Biri onu kırıldığında ise dibe çöker.'

En başta değinilen ilk örnekten sonra, eski Çin literatüründe kırmızı tuzlu sularla ilgili başka raporlar da daha sonra bulunmaktadır. On yedinci yüzyıldan kalma bu tür bir başka kayıta ise şöyle denmektedir;

'İşlemin bu adımı (salamuraya bırakma) ilkbaharda yapılmalıdır. Bir süre sonra tuzlu su kırmızıya dönecektir, ta ki yaz sonu ya da sonbahar başında güney rüzgarı bu bölgede sert esene kadar, böylece tuz gece boyunca kristalleşecektir (Oren Aharon, 2002)

Deniz suyundan tuz doymuşluğuna kadar çok geniş tuz konsantrasyonları aralığı bulunan hipersalin ortamlar olan çok havuzlu tuzlar, mikrobiyal çeşitlilik ve ekoloji çalışması için mükemmel bir model oluşturmaktadır.

Hipersalin habitatlar yaygın bir dağılım gösteren, buradaki başlıca yaşam sınırlayıcı faktörün yüksek tuz konsantrasyonu olduğu ekstrem ortamlardır. Bununla birlikte, diğer diğer başka fiziko-kimyasal özellikler de canlı organizmaların gelişimini azaltabilir. Sıcaklık, pH, güneş radyasyonu, oksijen, besin bulunabilirliği, ağır metaller ve diğer toksik bileşikler (pestisitler, kimyasal maddeler) vb.

Genel olarak, bu faktörler son derece uzmanlaşmış ökaryotlar, prokaryotlar ve fajlarla sınırlı olan hipersalin ortamlarının biyotasını etkileyebilmektedir. Mikrobiyotada ise iyi adapte olmuş halofilik mikroorganizmalar hâkimdir. Bunlar çoğu zaman sadece yüksek tuz konsantrasyonlarında değil, aynı zamanda yüksek veya düşük pH değerleri artı yüksek veya düşük sıcaklıklar ve yukarıda belirtilen diğer özelliklerde büyüme kabiliyeti olan poliektremofillerdir.

1.1. Halofilik Mikroorganizmalar İçin Muhtelif Habitatlar

1.1.1. Soğuk ve hipersalin çevreler

Antarktika kıtası çok sayıda salin ve hipersalin göle ev sahipliği yapmaktadır ve bunlardan birçoğu mikrobiyolojik araştırmalara konu olmuştur. Tuzlu sulardaki yüksek tuz konsantrasyonu, suyun donma noktasını düşürerek göllerin donmasını engellemektedir. Antarktik göllerden bazıları keskin yoğunluk katmanlaşmasının sonucunda heliotermal ısınmaya maruz kalmaktadır. Antarktika'nın en yoğun araştırılan hipersalin gölleri Vestfold Tepelerinde bulunmaktadır. Bu göller yaklaşık 6000 yıl önce yükselme ile denizden ayrılan, deniz suyu havzaları kalıntılarıdır. Organik Göl, sığ meromiktik bir göldür, derinliği 7.5 metredir. Yüzeyi 8 g/l tuzlulukta (-14°C - $+15^{\circ}\text{C}$), dibi ise 210 g/l tuzlulukta ve -7°C sıcaklıktır. Ekho Gölü, meromiktik, heliotermal ısınan bir göldür, 42 metre derinliktedir, 12-20 metre sonrası oksijensizdir, tuzluluk ise 14 g- 160, 180 g/l arasında, derinliğe bağlı olarak değişmektedir. Dip bölgeler yıl boyunca 15°C , 16°C sıcaklığını korur. Derin Göl: monomiktiktir, 36 metre derinliktedir, aerobiktir, 320 g/l tuzlulukta (aralarındaki en tuzlu göl), sıcaklık -18°C ' ye ulaşır.

1.1.2. Sıcak ve hipersalin çevreler

Bilinen tüm halofillerin en termofil olanı, zorunlu anaerobik fermantatif bakterisi olan *Halothermothrix orenii*'dir. Tunus'ta bulunan bir tuz gölü olan Chott El Guettar'ın sedimentinden izole edilmiştir. Organizma, 45°C ve 68°C arasında 40-200 mg/l NaCl konsantrasyonlarında (optimum 100 g/l) gelişmektedir. (Cayol vd., 1994).

Hakkında daha fazla bilginin bulunduğu diğer bir sıcak ve hipersalin ortam ise Akabe Körfezi kıyısında Sina yarımadasında (Mısır) küçük bir hipersalin gölet olan Solar Göl'dür. Solar Göl'ün ilginç bir limnolojik döngüsü vardır. Yaz aylarında havuzun su sütünü, hipersalin (180 g/l toplam çözünmüş tuz) ve dip kısmına kadar aerobiktir (maksimum derinlik 4.5-5 m).

Akabe Körfezi'nden sızan deniz suları ve ara sıra yağan yağmur suları, kışın doymuş hale geçmesine neden olur. Doymuşluk Ekim ayında başlar ve Mayıs ayına kadar sürer.

Kış doymuşluğu sırasında daha az tuzlu (60 g/l) bir tabaka daha ağır olan (180-200 g/l tuz içeren) dip sularının üstünde yüzmektedir. Hipolimniyon hızla anaerobik olur ve diplerde meydana gelen, yüksek oranlarda katabolik sülfat indirgenmesi ile sülfite zenginleşir (1 mM ve üstü). Alt su katmanları $55-61^{\circ}\text{C}$ sıcaklığa ve heliotermal ısıtma ile

daha da yüksek sıcaklıklara kadar ısınır. 1-2 m kalınlığındaki daha az tuzlu suyun ve dipteki çok tuzlu suların aralarındaki yoğunluk farkı karışmalarını engellemektedir. Gölün mikrobiyal yapısı yoğun bir şekilde çalışılmıştır.

1.1.3. Deniz suları, derin deniz tuzlu suları ve hidrotermal çıkışlar

Halofilleri aramak için ilginç bölgeler, belli bölgelerde deniz diplerinde bulunan tuzlu su havuzlarıdır. Böyle tuzlu sular Akdeniz, Kızıldeniz, Meksika Körfezi ve başka çeşitli yerlerde tespit edilmiştir. Böyle bölgelerde, özellikle lojistik nedenlerle az sayıda araştırma yapılabilmektedir. Kızıldeniz'in altındaki sıcak tuzlu sular keşfedildiğinden beri mikrobiyologların dikkati çekmiştir. Bunlardan Kebrit'in derinliği 1,549 metre, pH'ı 5.5, sıcaklığı 23.3°C'dir ve anaerobiktir. Maksimum derinlikte tuzlu su katmanı 84 metre kalınlığındadır ve tuzluluk 317 g/l'dir.

Atlantis II 'nin derinliği ise 2,167 metre, pH'ı 5.3, sıcaklığı 56 °C'dir. anoksiktir ve tuzluluk 2.040 m derinlikten itibaren 310 g/l'dir.

Discovery'nin ise derinliği 2,089 metre, pH'ı 6.2, sıcaklığı ise 44.7 °C'dir.

1.1.4. Petrol yatağı tuzlu sularındaki halofilik mikroorganizmalar

Yeraltı çok tuzlu suları genellikle petrol alanları ile birlikte bulunur. Bunların mikrobiyolojileri ile ilgili sistematik bir çalışma henüz yapılmamıştır. Böyle tuzlu sulardan; hem aerobik halofilik Arkeler hem de anaerobik halofilik Bakteriler izole edilmiştir. *Haloferox* benzeri izolatlar, Kazakistan'daki Kalamkass petrol sahasından elde edilmiştir.

1.1.5. Tuzlu bataklıklar, hipersalin lagünler ve çeşitli göller

Hipersalin kıyı lagünleri, farklı fizyolojik gruplara ait çeşitli halofilleri barındırabilmektedir. Özellikle iyi araştırılmış bir bölge, Kereç Yarımadası'nda yer alan Sivash Gölü, Arabat yarığı ve Chokrak Gölü'dür, hepsi Kırım'da (Ukrayna) yer alır.

İlginç ama az çalışılan bir diğer göl Assal Gölü (Cibuti) 'dir. Bu hipersalin göl, Kızıldeniz seviyesinden yaklaşık 156 m yükseklikte yer almaktadır. Deniz suyuna yakın bir tuzluluğa sahip kaynaklarca beslenmektedir. Yüzey suları 1.204 g/cm³ yoğunluktadır ve 280 g/l tuz içermektedir, 20 m derinlikte bu değer 400 g/l 'ye çıkmaktadır. Gölde hem ılımlı halofilik Bakteriler hem de ekstrem halofilik Arkeler (*Halorubrum trapanicum* ve *Halococcus*) izole edilmiştir. Göldeki evaporitik tuz birikintileri, radyal, konsantrik

yapıya sahip tuz ooidlerinden oluşmaktadır. Bu kristal morfolojisinin mikrobiyal destekli kristalizasyon sürecinin bir sonucu olduğu ve bu sürecin seyrini halofilik Arkelerin etkilemiş olabileceği düşünülmektedir.

1.1.6. Hipersalin su kaynakları

Hipersalin kaynaklar mikrobiyolojik çalışmalar için ilginç ortamlar sunmaktadır. La Malá'nın (Granada) iç haznesini besleyen yeraltı salin kuyusu, 180 g /l'lik tuzluluk derecesine sahiptir. Farklı tuz derişimleri içeren agar plakalarına suyun doğrudan kaplanması ile elde edilen kolonilerin karakterizasyonu, izole edilen organizmaların; %70'inin deniz suyu tuzluluğuna adapte olduğunu; %30'unun ise daha yüksek tuz optimumu olan ılımlı halofiller olduğunu göstermiştir

1.1.7. Hipersalin topraklar

Tuzlu topraklar çok sayıda halofilik ve/veya yüksek oranda halotolerant mikroorganizma içerebilir.

1.1.8. Duvar resimleri

Kuru tuzlu toprakların özellikleri ile halofili mikroorganizmalar için bir yaşam alanı olarak kiliselerdeki ve kalelerdeki tarihi duvar resimleri özellikleri arasında yüzeysel benzerlikler vardır.

Bozulan duvar resimlerinin mikrobiyolojik çalışmaları, bozulma sürecinde mikroorganizmaların muhtemel rolünün değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. 13 yy. dan kalma kilise duvarlarındaki boyamalardan heterotrofik bakterileri kültüre alma çalışmaları yapılmış. İzole edilen koloniler arasında endospor oluşturan Gram pozitif aeroblar en bol görülmüştür (Saiz-Jimenez and Laiz, 2000)

1.1.9. Çöl bitkileri ve hayvanları

Kuru çöl alanlarında yaşayan yüksek organizmalar da bazı ilginç halofilleri barındırabilmektedir. (Oren, 2015a; Oren, 2002; Simon vd., 1994).

1.2. Deniz Tuzları ve Tuzla Havuzlarındaki Fizikokimyasal Çevre

Deniz tuzları, farklı tuz konsantrasyonlarında mikrobiyal çeşitlilik ve mikroorganizmaların ekolojisinin incelenmesi için mükemmel modeller oluşturmaktadır.

Çok havuzlu tuz üretim sistemine sahip olduklarından, deniz suyundan tuz doygunluğuna kadar çok çeşitli tuzluluk seçenekleri sunarlar. Suyun periyodik olarak alt tuzluluk havuzlarından (yoğunlaştırıcılar) tuzların çöktüğü havuzlara (kristalleştiriciler) aktarıldığı bir dizi sıg havuzdan oluşurlar. Farklı tuzların suyun buharlaştırılmasıyla doyması, bu tuzların sıralı olarak çökmesine neden olur: karbonat, alçıtaşı (gypsum) ve halit (halite). Böylece, üç ana alan tanınmaktadır: karbonat alanı ($70\text{--}140\text{ g l}^{-1}$), alçı alanı ($220\text{--}290\text{ g l}^{-1}$) ve halit alanı (290 g l^{-1}).

Tuzların çökeldiği havuzlar hariç, diğer havuzlarda tuz oranı deniz suyu ile benzerlik göstermektedir. Ancak, farklı tuz konsantrasyonlarına sahip havuzlarda çevresel koşullar önemli ölçüde dalgalanmalar göstermektedir.

Daha yüksek tuzluluk oranına sahip havuzlar daha düşük pH değerlerine ve daha yüksek maksimum sıcaklıklara sahiptir. Doymun NaCl'li havuzlar ile %15'ten daha az tuz konsantrasyonuna sahip havuzlar arasında bir pH birimi kadar ve 10°C kadar sıcaklık farkı vardır.

Düşük tuzluluk oranına sahip havuzlarda ise, CO_2 kısmi basıncında bir azalmaya neden olan ve bu havuzlarda pH artışına izin veren yüksek bir fotosentetik aktivite vardır. Toplam azot ve fosfor konsantrasyonları daha yüksek tuz konsantrasyonlarında artarken, oksijenin doygunluk konsantrasyonu artan tuzlulukla birlikte azaldığından, oksijen içeriği de artan tuzlulukla birlikte azalmaktadır.

1.3. Tuzla Havuzlarındaki Mikrobiyal Çeşitliğin Dağılımı

Tuzlular, doğal ve insan yapımı hipersalin ortamlardır. Tuz gölleri ve deniz suyundan tuz üretimi için kullanılan buharlaşma havuzları, dünyaya tüm kıtalarda bulunmaktadır.

Bu ortamlarda, yüksek tuz konsantrasyonlarına uyum sağlamış çok çeşitli mikroorganizmalar bulunabilmektedir. Arcaea, Bacteria ve Eukarya olmak üzere yaşamın üç alanının temsilcilerinin büyümesi, NaCl ile doymun tuzlu sularda bile mümkündür.(Oren, 2015b).

Santa Pola tuzlasında (Alicante, İspanya) 35 yıldır yapılan çalışmalar ara tuzluluktan (%10) tuz doygunluğuna kadar olan havuzların mikrobiyal çeşitliliğini derinlemesine incelemeye izin vermiş ve haloarkaea ve bakteriler iki ana baskın grup olarak gözlenmiştir.

En yoğun NaCl'ce doymuş havuzlarda (%37) Euryarchaeota (başlıca kare haloarchaeon *Haloquadratum walsbyi*) ve nanohaloarkea hâkimdir; ek olarak, daha düşük bir oranda *Salinibacter ruber* bakterisi görülmektedir.

Ara tuzluluk oranı olan havuzlarda (%13-19) prokaryotik çeşitlilik yüksektir ve yedi yaygın taksonla temsil edilirler. Kristallendirme havuzlarının aksine, bu ara havuzlarda cins ve tür sayısı daha fazladır. Bu ara tuzluluk havuzlarında bol miktarda bulunan bir takson, yakın zamanda izole edilmiş ve karakterize edilmiş olan *Spiribacter salinus* türüdür (Gammaproteobacteria), ancak belki de bu tek bulunan tür değildir, Ectothiorhodospiraceae familyasına ait başka ilişkili tür veya cinsler de bulunması mümkündür. Ayrıca, ara tuzluluk havuzlarında Euryarchaeota da bol miktarda bulunur,

Kristalleştirici ve konsantratör havuzlarındaki baskın türler farklıdır, sırasıyla *Haloquadratum* ve *Halorubrum* en bol bulunan türlerdir.

Ayrıca ara tuzluluk havuzlarında henüz izole edilmemiş veya tanımlanmamış yeni halofilik arkeal gruplar da gözlemlenmektedir.

Santa Pola tuzlası, bilim insanlarına kırmızı pigmentli son derece halofilik bakteri *Salinibacter ruber* ve kare şekilli haloarke olan *Haloquadratum walsbyi* gibi yeni ve ilginç mikroorganizmaların keşfini mümkün kılmıştır.

Bir gammaproteobacterium olan *Spiribacter salinus*'un izolasyonu, orta derecede halofilik bakteriler üzerinde çalışmalar için yeni olanaklar sunmaktadır. Bu bakteri ile yapılacak çalışmalar, mikroorganizmaların doğal ortamlarındaki adaptasyon mekanizmaları ve mikrobiyal ekolojisi hakkında daha iyi bilgiler edinmemize izin verebilir.

Daha önce orta derecede halofilik bakteriler üzerine yapılan çalışmalar, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Halobacillus* veya *Salinivibrio* cinslerinin temsilcileri gibi, karmaşık laboratuvar ortamlarında kolayca izole edilen ancak mikrobiyotanın büyük bir bölümünü oluşturmayan model organizmalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gelecekteki çalışmalar hipersalin habitatlarındaki yaygın popülasyonları oluşturan *S. salinus* gibi organizmalara yapılabileceği gibi, daha az yaygın olan mikroorganizmalar da ekosistem üzerinde önemli bir rol oynayabilmekte ve böyle mikrobiyal habitatların ekolojisini anlamaya yönelik ayrıntılı bir çalışmayı onlar da hak etmektedir (Ventosa vd., 2014).

Dünyadaki farklı kıta ve ülkelerde bulunan tuzlalardan kütür bağımlı yaklaşımla, yüksek tuzluluklardan izole edilen halofiller;

İspanya

-Santa Pola, Alicante: *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Halobacterium* (Rodriguez-Valera vd., 1985)

Halorubrum, *Haloarcula* (Benlloch vd., 2001).

Halorubrum, *Haloterrigena*, *Halolamina*, *Haloplanus*, *Natronomonas*, *Halorientalis* (Viver vd., 2015).

-La Trinitat, Ebro Deltası, Taragona: *Halorubrum*, *Halolamina*, *Haloplanus*, *Haloferax*, *Natronomonas*, *Halomicrobium*, *Halobellus* (Viver vd., 2015).

Mallorca adası: *Halorubrum*, *Haloterrigena*, *Halolamina*, *Haloplanus*, *Haloferax*, *Halovivax*, *Halomicrobium*, *Halobellus*; Fromantera: *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Haloterrigena*, *Natronomonas*

Janubio, Fuerteventura ve Kanarya Adaları: *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Halolamina*, *Haloplanus*, *Haloferax*, *Halonotius* (Viver vd., 2015).

Slovenya

-Secovlje *Haloferax*, *Haloarcula*, *Haloterrigena*, *Halorubrum*, *Natrinema*

Hırvatistan

-Ston: *Haloferax*, *Haloarcula*, *Haloterrigena*, *Halobacterium*

Yunanistan

-Messolongi (Batı Yunanistan): *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halorubrum*, *Haloterrigena* (Pašić vd., 2007).

Türkiye

-Kaldırım ve Kayacık, İç Anadolu İç Tuzlaları *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halorubrum* (Birbir vd., 2007).

-İç tuzlalar, Bingöl, Fadlum, Kemah, Tuzlagözü, Doğu Anadolu İç tuzlaları *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Salinibacter* (Çınar ve Mutlu, 2016).

Hindistan

-Kelambakkam, Marakanam ve Vedaranyam, Tamil Nadu: *Haloferax*, *Halorubrum*,

Haloarcula, *Halobacterium*, *Halogeometricum*, *Salinibacter* (Manikandan vd., 2009).

-Ribandar ve Goa: *Halococcus*, *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Haloferax* (Mani vd., 2012).

Avustralya

Geelong Viktoria: *Halorubrum*, *Haloferax*, *Halonotius* (Burns vd., 2004).

Afrika

Botswana: *Natrialba*, *Natronococcus*, *Natronorubrum* (Gareeb and Setati, 2009).

Amerika

Chula Vista, San Diego: *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halorubrum* (Bidle vd., 2005).

Meksika

Baja Kaliforniya: *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halococcus* (o zaman için *Halobacteria* ya ait belirlenen tek cins) (Javor, 1984).

Halorubrum, *Haloarcula*, *Salinibacter* (Sabet vd., 2009).

Peru

Maras (deniz seviyesinden 3380m yüksekte bulunan iç tuzla): *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halorubrum*, *Halogeometricum*, *Salinibacter* (Maturrano vd., 2006).

Şili

Lo Valdivia, Curico': *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Haloterrigena*, *Halonotius*, *Halolamina*, *Haloferax*, *Haloplanus*, *Halogeometricum*, *Natronoarchaeum*, *Halobacterium*, *Halovivax* (Viver vd., 2015).

1.4. Tuz Stresi ile Baş Etmek İçin Kullanılan Stratejiler

Bir mikroorganizmanın yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayabilmesi için, sitoplazmik içerikler osmotik olarak dış ortam ile en azından eşdeğer olmalıdır. Çevresindeki tuz çözeltisinden daha düşük bir iç ozmotik basıncı olan bir hücre sügeçirgen olan hücre zarından hızla su kaybedecektir.

Turgorun sağlanabilmesi için hücrenin içindeki ozmotik basınç dış ortamını aşmalıdır (*Halobacteriaceae* familyasının ekstrem halofil Arkeleri dışında). Doğa, halofilik mikroorganizmaların ozmotik stabilizasyonunu sağlamak için çeşitli yollar geliştirmiştir.

Tüm halofillerin ortak olan özelliği; Sodyum her zaman sitoplazmadan güçlü enerji gerektiren sodyum pompalarıyla, mümkün olduğunca fazla atılmalıdır (prokaryotlarda – genellikle Na^+/H^+ antiporter sistemlerine dayalı). Ancak ozmotik dengeyi sağlamak için NaCl 'ün yerini neyin aldığı farklı tipte mikroorganizmalar arasında değişkenlik göstermektedir. Stratejilerden biri ortamdaki iyonik konsantrasyonlara benzer, potasyum ve klorür iyonları konsantrasyonları biriktirmektir. Daha yaygın olan ikinci strateji ise,

iyonları büyük ölçüde dışarı vermek ve hücreden ozmoz yoluyla su kaybedilmesini önlemek için küçük elektriksel olarak nötr organik eriyikler biriktirmektir. ("Compatible solutes"),

1.4.1. "Salt-in" dengelemek için "Salt-out" stratejisi

Sitoplazmadaki tüm enzim ve fonksiyonların KCl'nin belli molar konsantrasyonlarında işlevsel olması gerektiğinden, tüm hücre içi sistemlerin geniş kapsamlı, uyarlamalarını gerektirir. Halofilik olmayan organizmalardaki enzimlerin çoğu doymuş tuz konsantrasyonlarında bulunduklarında zayıf fonksiyon göstermektedir. Dahası enzimlerin ve diğer proteinlerin çözünürlüğü sıklıkla yüksek tuz derişimlerinde düşmektedir. Bu nedenle proteomun tamamının değıştirilmesi gerekmektedir.

KCl'ü ozmotik denge için biriken mikroorganizmalardaki halofilik proteinlerin karakteristik bir özelliğı, asidik olmalarıdır. Bu tür proteinler, halofilik olmayan eşdeğerlerine kıyasla oldukça negatif yüklüdür, ek olarak, halofilik proteinlerin genel olarak hidrofobik amino asit içeriğı düşüktür. Bu proteinlerin doğal ve aktif formda muhafaza edilmesi için tuzların molar konsantrasyonlarının sürekli sabit kalmalıdır; tuzun seyreltilmesi açılmaya ve denatürasyona neden olur. Dolayısıyla, salt-in stratejisini kullanan mikroorganizmalar genellikle gelişebildikleri tuz konsantrasyon aralığı açısından az esnekliğe sahip zorunlu halofillerdir ve bu nedenle yaşam için olabildiğince sabit ve son derece yüksek seviyede tuzluluğa adapte olmuşlardır.

Osmotik adaptasyon için "salt-in" stratejisini kullanmanın avantajı, organik ozmotik çözeltilerin molar konsantrasyonlarının biyosentezinden enerjetik olarak daha ucuz olması ve ikinci stratejiyi kullanan mikroorganizmaların da sodyum iyonlarını pompaladığına dikkat çekmesidir.

"Salt in" stratejisinin şu anda sadece üç grup prokaryotta kullanıldığı bilinmektedir: Halobacteriaceae ailesindeki halofilik Arkeler, Bacteroidetes'in son derece halofil kırmızı aerobik temsilcisi *S. ruber* ve çoğı anaerobik, fermentatif bakteriler olan, Halanaerobiales takımı üyeleri.

1.4.2. Uyumlu ozmotik çözünenlerin birikimi stratejisi

Osmotik uyarlamanın ikinci stratejisi, yani organik ozmotik çözünenlerin birikimi, mikrobiyal dünyada çok daha yaygındır. Bacteria'nın çoğı halofil ve halotolerant

üyelerinde, ökaryot alglerde, mantarlarda ve ayrıca metanojenik Archaea da bu stratejiyi kullanmaktadır.

Stratejinin dezavantajı, çözünen maddelerin üretiminin yüksek enerjik maliyetidir. Avantajı ise, geniş bir yelpazede tuz konsantrasyonlarına esneklik ve uyurlanabilirlik derecesidir.

Çözünenler genellikle protein yapısını ve enzimatik aktiviteyi büyük ölçüde etkilemediğinden, hücre, hücre içi çözünen konsantrasyonunu, ortamın tuzluluğuna göre basitçe ayarlayabilir. Ortamda uygun çözünen maddeler bulunursa, bunlar çoğunlukla dışardan alınabilir, böylece yeniden biyosentez için gerekli enerjiden tasarruf sağlanabilmektedir.

1.5. Mikrobiyal Dünyada Kullanılan Organik Ozmotik Çözünenler

Mikrobiyal dünyada tanımlanan organik ozmotik çözünenler oldukça çeşitlidir. Bunlar arasında gliserol ve diğer polioller, sükroz ve trehaloz gibi basit şekerler, glisin betain ve ektoin gibi farklı amino asit türevleri bulunur. Bunların çoğu fizyolojik pH'da yüksüz veya çift kutupludur. Gliserol, tek hücreli algler *Dunaliella* ve bazı mayalar ve mantarlar tarafından kullanılır. Ozmotik çözünen olarak gliserol kullanımı için bir ön koşul, bileşik için çok düşük geçirgenlik gösteren sitoplazmik zardır. Membranların çoğu gliserol için oldukça geçirgendir ve bu yüzden asla prokaryot dünyasında ozmotik bir çözünen olarak bulunmamıştır.

Prokaryotik oksijenli fototroflar-siyanobakteriler-gliserol yerine şekerler (sükroz, trehaloz), glukozilgliserol veya glisin betain kullanırlar; Glisin betain çoğu halotolerant tür tarafından tercih edilmektedir. Glisin betain, besiyerinden geniş bir bakteri yelpazesi tarafından biriktirilebilir ve ozmotik stabilizasyon için kullanılabilir, ancak sadece birkaç prokaryot bu bileşiği sentezlemektedir. Daha yaygın olarak karşılaşılan uyumlu çözgenler ektoin (1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-pirimidin karboksilik asit) ve onun hidroksi türevidir (amino asit metabolizmasının bir ara maddesi olan aspartat- β -semialdehitten sentezlenir).

Genellikle tek bir organizmada ozmotik çözünen kokteyller bulunur; bu nedenle *Halorhodospira* (Gammaproteobacteria) hücreleri, glisin betain, ektoin ve trehaloz içerebilir.

Yukarıda da açıklandığı gibi, Arke olan Halobacteriaceae familyası ozmotik dengeleme için KCl kullanır. Ancak bununla birlikte, birkaç haloalkalifilik Arke'de KCl ile birlikte ozmotik dengeyi sağlamak için fonksiyon gösteren, 2-sülfotrehaloz da tespit

edilmiştir. Metanojenik Arkelerin, ozmotik çözünenler olarak glisin betain, β -glutamin, β -glutamat ve Ne-asetil- β -lisin'i kullandığı görülmektedir.

1.6. Halofillerde Görülen Metabolik Çeşitlilikler

Gelişmek için enerji ve karbon elde etmek için gerçekleştirilen işlemlerle bakıldığında, halofiller, geniş filogenetik çeşitlilikleri ile paralel olarak, değişken metabolik çeşitlilik de göstermektedir. Ancak düşük tuzlu ortamlarda bilinen ototrofik nitrifikasyon, hidrojen ve karbon dioksit veya asetattan metanojenez ve metanın aerobik oksidasyonu gibi bazı prosesler 100-150 g/l'nin üstündeki tuz konsantrasyonlarında işlev görememektedir.

1.6.1. Oksijenik ve anoksijenik fototroflar

Oksijenik fotosentez tuz doyumuna kadar gerçekleşmektedir ancak yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişen fototrof çeşitliliği oldukça düşüktür. Deniz suyunda yaygın olan fitoplankton gruplarının çoğu konsantre tuzlu suda yaşama uyum sağlamaz. Diatomeler nispeten daha iyi adapte olmuştur ve bazı türleri 100-150 g/l derişimdeki tuzlu suda bulunur, ancak sadece iki büyük fototrof grubu, en yüksek tuz konsantrasyonunda fonksiyon gösterebilir: Bunlar siyanobakteriler ve *Dunaliella* cinsi yeşil tek hücreli algleridir.

Siyanobakteriler yaygın olarak hem planktonda hem de tuz gölü ve tuzla buharlaştırma havuzları gibi sığ bentik mikrobiyal halılarda bulunur. Bunlar, tek hücreli (*Aphanothece halophytica* ve ilişkili formlar) ve iplikli formları (örn. *Microcoleus chthonoplastes*, *Halospirulina tapeticola*, *Phormidium* spp.) içerebilir. Tuz konsantrasyonu 200-250 g/l'nin üzerine çıktığında, siyanobakteriler de kaybolur ve geride kalan tek oksijenik fototrof organizma tek hücreli ökaryotik olan *Dunaliella*'ya ait türlerdir.

Anoksijenik fotosentez de yüksek tuz konsantrasyonlarına kadar işlev görebilir. Üst aerobik tabakalarda siyanobakterilerin baskın olduğu hipersalin mikrobiyal tabakalarda, anoksijenik fototrofların mor katmanları yaygın olarak bulunur.

En yüksek tuzluluklarda işlev gören, tamamen farklı bir anoksijenik fototrofik yaşam tipi, retinal bazlı pigmentlerin emdiği ışık enerjisinin kullanımına dayanır: bakteriorodopsin ve ksantorodopsin gibi. Halobakteri ve bazı ilgili halofilik Arkea'nın majör retinal pigmenti olan bakteriorodopsin, *Halobacterium salinarum*'un anaerobik

gelişimini ışık altında harekete geçirir. Karbon kaynağı olarak organik substratlar kullanılır ve bu grupta fotototrofi görülmez. Ayrıca, filogenetik olarak ilgisiz fakat fizyolojik olarak oldukça benzer olan *Salinibacter*'de de ışığın yardımcı enerji kaynağı olarak kullanılması mümkündür.

1.6.2. Aerobik heterotroflar

Tanımlanan çoğu halofilik ve halotolerant mikroorganizma aerobik heterotroftur ve biz bunları üç yaşam domaininde de görmekteyiz. Tuz konsantrasyonları 200-250 g/l'ye kadar olan ortamlarda, Bacteria temsilcileri heterotrofik aktivitelerin çoğundan sorumludur ve bazı grupları, hem tolere edilen tuz konsantrasyonlarının aralığı hem de kullanılan substratların sayısı bakımından çok yönlüdür.

Yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişmeyi destekleyen organik substratlar, tatlı su ortamları için bilinenlerden daha azdır, ancak bir dizi hidrokarbon ve aromatik bileşiği içermektedir. En yüksek tuzluluklarda, Halomonadaceae gibi gruplar artık fonksiyon gösteremez; organik bileşiklerin aerobik bozunması iki grup prokaryot tarafından devralınmıştır: Halobacteriaceae (Archaea) ve *Salinibacter* (Bacteria).

Halofilik Archaea, doymuş tuz konsantrasyonlarına kadar gelişebilir, ancak okside edilen substratların aralığı oldukça sınırlıdır: başlıca substratlar amino asitler ve basit şekerlerdir. Hidrokarbonlar ve aromatik bileşikler, çok az kullanılırlar. Yakın zamana kadar, Halobacteriaceae'nin 200-250 g/l tuz üzerinde fonksiyon gösterebilen tek aerobik heterotrof olduğuna inanılıyordu, ancak *Salinibacter*'in tuz kristallendirme havuzları biota'sının başlıca bileşeni olarak keşfedilmesi bu görüşü değiştirmiştir.

1.6.3. Anaerobik solunum

Kullanılan elektron alıcıları sadece nitrat ve sülfat'ı kapsamaz, aynı zamanda arsenat ve selenat gibi alışılmadık bileşikler de içerir ve bunların indirgenmesi, bazı hipersalin ortamlarda ekolojik önem taşımaktadır. Halomonadaceae'nin birçok orta derecede halofil üyesi, nitratı nitrite indirgemektedir ve nitratın gaz haldeki azota denitrifikasyonu bazı halofilik bakterilerde de görülebilir.

Bazı halofilik Arkeler (örn. *Haloarcula marismortius*, *Haloarcula vallismortis*, *Haloferax mediterranei*), nitrat, elektron alıcı olarak mevcut olduğunda anaerobik olarak gelişebilir ve gaz halde azot ve/veya azot oksit oluştururlar. Bazı türler ayrıca

dimetilsülfoksit, trimetil-N-oksit veya fumarat'ın redüksiyonu ile anaerobik olarak gelişir.

Deniz suyu sülfat bakımından zengindir ve bu nedenle, anaerobik deniz ve hipersalin (deniz suyu kaynaklı) ortamlarda, katabolik sülfat indirgenmesinin, organik bileşiklerin degradasyonundaki son süreç olması şaşırtıcı değildir. Bununla birlikte, tatlısu ve deniz sistemleri ile karşılaştırıldığında, yüksek tuzlu ortamlarda belirli tipte sülfat indirgeyici bakterilerin kayıp olduğu görülmektedir.

Şu ana kadar tanımlanan tüm halofilik ve yüksek halotolerant katabolik sülfat indirgeyicileri, substratları karbon dioksit'e kadar okside etmek yerine laktat, piruvat ve etanol gibi substratları okside eden ve asetat salan "tamamlanmamış oksitleyiciler" tipine aittir.

Asetat gibi substratları karbon dioksit'e okside eden "Tam oksitleyiciler", hipersalin ortamlarda bulunmamaktadır.

Arsenat ve selenat mikrobiyal büyüme için daha az yaygın elektron alıcılardır, ancak bunlar halofilik/haloalkalifilik bakterilerin anaerobik büyümesini de destekleyebilir.

1.6.4. Metanojen ve homoasetojenler

Düşük tuzluluk içeren ortamlarda, üretilen metanın büyük kısmı iki reaksiyondan türetilir; karbon dioksitin hidrojen ile indirgenmesi ve asetatın, metan ve karbon dioksit üretmek üzere parçalanması. Bu reaksiyonların hiçbirinin yüksek tuz konsantrasyonlarında meydana geldiği gösterilmemiştir. Buna rağmen, hipersalin göllerin anaerobik çökeltileri, neredeyse doymuş tuz konsantrasyonlarında bile zengin metan kaynaklarıdır. Bu tür tuzlalarda yetişen metanojenler izole edilerek karakterize edilmiştir. Bunlar yukarıda bahsedilen iki reaksiyonu da kullanmazlar, bunun yerine substratları trimetilamin gibi metillenmiş aminler ve bazen de dimetilsülfürdür. *M. evestigatum* ve *Methanohalophilus portucalensis* gibi türler, bu tür substratlarda 240-250 g/l tuzda bile gelişebilirler.

1.6.5. Fermentatif halofiller

Fermentasyon, yani bir harici elektron alıcısı olmadan organik bileşiklerin dönüştürülmesiyle anaerobik büyüme, en yüksek tuz konsantrasyonlarına kadar mümkündür.

Filogenetik olarak, apayrı gruplarda fermentatif halofilleri görebiliriz.

Halobacteriaceae ailesi esasen, elektron alıcısı olarak oksijen kullanan aeroblardır. Ama bazı türler, anaerobik olarak denitrifikasyon ile bazıları da bakteriyodopsin tarafından soğurulan ışık enerjisi kullanılarak gelişebilir ve *Halobacterium* cinine ait türler, argininin fermentasyonu ile enerji elde ederken, ornitin, amonyak ve karbon dioksit üreterek karanlıkta anaerobik olarak gelişebilirler.

1.6.6. Kemootroflar ve metanotroflar

Bazı aerobik kemoototrofik süreçler çok yüksek tuz konsantrasyonlarına kadar işlev gösterirken bazıları ise düşük seviyedeki tuzluluk dereceleri ile sınırlandırılmıştır. Tatlı su ve deniz sistemlerinde sıkça bulunan, ancak hipersalin ortamlarda bulunmayan bir prosese örnek: amonyağın nitrit yoluyla nitrata oksitlendiği ototrofik nitrifikasyondur.

Ototrofik amonyak oksidasyonu, 80-90 g/l arasındaki toplam tuz konsantrasyonlarında *Nitrosomonas europaea* ile ilişkili olarak görülmekte is de 150 g/l tuzun üzerinde ototrofik amonyak oksidasyonu kayıtları mevcut değildir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, nitritin nitrat'a ototrofik oksidasyonu hakkında bilgi eksiktir.

İndirgenmiş kükürt bileşiklerinin kemoototrofik oksidasyonu, daha yüksek tuz konsantrasyonlarında meydana gelebilmektedir. Batı Avustralya'daki bir tuz gölünden izole edilen *Halothiobacillus halophilus*, tiosülfat, elementel kükürt ve tetrasyonat'ı 240 g/l tuzluluğa kadar okside edebilmektedir (opt.50-60 g/l).

Metan, anaerobik sedimentlerde çok yüksek tuz konsantrasyonlarına kadar üretilmesine rağmen hipersalin ekosistemlerde aerobik metan oksidasyonunu göstermeye yönelik girişimler ya negatif sonuçlar vermiştir veya düşük tuzluluklara kıyasla çok düşük aktivite oranları göstermiştir. Tuz göllerinden, ılımlı tuz toleransı gösteren (ancak opt. 20 g/l olan) ancak birkaç metan oksitleyen bakteri (örn: *Methylobaculum modestohalophilum*) izole edilebilmiştir.

1.7. Farklı Salinite ve İyonik Bileşimdeki Çevrelerde Bulunan Halofiller

Birçok halofilik mikroorganizma, geniş bir yelpazede tuz konsantrasyonlarında gelişebilmektedir. Örneğin; Halomonadaceae'nin çoğu üyesi, tatlı su ya yaklaşan tuzluluktan doygunluğa yakın NaCl konsantrasyonlarına kadar gelişme yetenekleriyle dikkat çekmektedir.

Diğer gruplar tuz aralıkları bakımından çok daha kısıtlıdırlar. Kırmızı halofilik Arke'nin (Halobacteriaceae familyası) birçoğu, tuz konsantrasyonu 100-150 g/l 'nin altına düştüğünde parçalanır. Bu nedenle Halobacteriaceae familyası, genellikle, yalnızca gelişim için değil, aynı zamanda yapısal kararlılık ve bütünlük için son derece yüksek düzeyde tuzluluğa ihtiyaç duyan organizmalardan oluşur. Ancak, son yıllarda, Halobacteriaceae'nin en azından bazı üyelerinin uzun süre düşük tuza maruz kaldıklarında hayatta kaldıkları ve deniz suyuna benzer tuzluluk oranlarına veya daha düşük tuzluluğa sahip ortamlardan da izole edilebileceği görülmüştür.

Halofiller arasında gelişmeyi destekleyen ortamın iyonik bileşimi bakımından, önemli derecede çeşitlilik vardır. NaCl deniz suyunda egemen tuzdur ve buharlaşmış deniz suyundan (talassohalin ortamları) türevlenen hipersalin ortamlar NaCl egemendir ve nötr ile hafif baziktir. Bazı ortamlar, iki değerlikli katyonlarca magnezyum ve kalsiyum bakımından oldukça zengindir. Bu iyonlar, yüksek konsantrasyonlarda toksiktir çünkü bunlar, biyolojik yapıları istikrarsızlaştıran "kaotropik" iyonlardır ve sodyum gibi dengeleyici bir işlevi olan iyonlar ise "kosmotropik iyonlar"dır. Magnezyumun kaotropik etkisi ve yeterince yüksek konsantrasyonlarda kosmotropik iyonların varlığı veya yokluğu, yüksek magnezyum içeren tuzlu suların yaşam limitini belirlemektedir (Oren, 2011).

1.8. Metabolomik Nedir

Genomik, genlerin bütünü ve proteomik, tüm protein setinin analizi ile ilgili olmakla birlikte, metabolomik, belirli bir örnek, hücre veya dokudaki tüm düşük moleküler ağırlıklı metabolitlerin kantitatif ölçümü ve gen fonksiyon analizi bağlamında verilerin entegrasyonu olarak tanımlanmıştır. "Post-genomik era" ya girerken, transkriptom, proteom ve metabolom düzeyinde "genom çapında" ifade profili oluşturma yöntemleri ön plana çıkmıştır. Bunlar gelecek araştırma hedefleri için gen fonksiyonu, fizyoloji ve metabolizmanın bilinmeyen yönlerini araştırmak için hücre tipleri, dokular, organlar ve tüm organizmalar (bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar) arasındaki farkların tam ve küresel bir karşılaştırmasını sağlayacaktır. Son yıllarda, 'transkriptomik' ve 'proteomik' için analitik teknoloji ve veri tabanları geliştirmek için muazzam bir çaba vardır, ancak 'metabolomikler' için tutarlı bir strateji henüz ortaya çıkmamıştır. Omiks teknolojilerini, bir bulmacanın ayrı parçaları olarak hayal edersek, onları bir araya getirerek hücrenin çalışma parçalarının tam bir resmini elde ederiz.

1.8.1. Metabolomik Analiz

Metabolomik analiz dört genel alana ayrılabilir:

- Hedef bileşik analizi:.....Belirli metabolitlerin miktar tayini
- Metabolik profil oluşturma:..Belirli metabolik yolların üyeleri olan bir grup ilgili bileşiğin kantitatif veya kalitatif tayini
- Metabolomik:.....Tüm metabolitlerin kalitatif ve kantitatif analizi
- Metabolik Parmak İzi:.....Kapsamlı bileşik tanımlaması olmadan hızlı, global analizle örnek sınıflandırma.(<http://www.metabolomics.bbsrc.ac.uk/background.htm>) (Erişim tarihi:16.09.2024.)

Metabolomik çalışmalar için kullanılan bazı terimler:

- Ekzometabolom: Hücre dışına verilen toplam metabolitler
- Endometabolom: Hücre içinde bulunan toplam metabolitler
- Ayak izi analizi: Ekzometabolomun niteliksel analizi
- Parmak izi analizi: Endometabolomun niteliksel analizi
- Hedefli analizi: Önceden tanımlanmış bilinen metabolitlerin konsantrasyonlarının nicel analizi
- Söndürme (Quenching): Endojen metabolik aktivitenin anlık olarak durdurulması
- Metabolit dönüşüm oranı: Metabolit havuzunun büyüklüğünün metabolit akışına oranı (Mashego vd., 2007).

1.9. Metabolomik ve Mikrobiyal Ekoloji

Metabolomik, doğal olarak oluşan hücresel metabolizmanın ürünleri olan şekerler, organik asitler, amino asitler ve nükleotitler binlerce küçük molekülün (metabolitler) analizi olarak tanımlanabilir. Bu nedenle, esasen herhangi bir biyolojik sıvı, hücre doku ya da organizmanın biyokimyasal fenotipinin (veya metabotipinin) kalitatif ve kantitatif düzeyde incelenmesidir. Bir organizmanın 'metabolom'u metabolitlerinin bütünüdür (genom ve proteomda da olduğu gibi). Farklı organizmalar arasında hem yapısı hem de işlevi değişebilen genlerin aksine, metabolitlerin çoğu (örn. laktat veya alanin) aynı bileşiklerle şeklinde türler arasında korunurlar, bir farede bir bitkide ya da bir insanda da olsalar çoğunlukla bir aynı işi yaparlar. Bu, onları bir organizmada tespit etmek için kullanılan analitik araçların hemen hemen tüm diğer organizmalar için kolayca uygulanabilir olduğu anlamına gelir.

Metabolik profiller ortama bağılıdır ve çevresel koşullara tepki olarak değişecektir. Bu nedenle, teknik biyomedikal araştırmalarda bugüne kadar başlıca biyomedikal araştırmalar için kullanılmış olsa da, ekolojik araştırmalara da uygulanabilir ve iklim değişikliği, hastalık, gıda kısıtlaması, enfeksiyon ve parazit gibi faktörlerin etkisinin ölçülmesine kullanılabilecektir (Jones vd., 2013).

1.10. Ayrım Teknikleri ve Dedeksiyon Metotları

Metabolomik çalışmalar; metabolitlerin ayrımını sağlayan Gaz Kromatografisi, Sıvı Kromatografisi ve Kapiler Elektroforez gibi ayrım teknikleri ile metabolitlerin analizini sağlayan dedeksiyon teknikleri olan Kütle Spektroskopisi ve Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi gibi dedeksiyon teknikleri ayrıca metabolitlerin teşhisi ve tanımlanmasını sağlayan yazılım-veribankası kullanımı ve istatistiksel değerlendirme yöntemlerinden oluşmaktadır.

1.10.1. Gaz kromatografisi (GC)

Gaz Kromatografisi metabolomik çalışmalarda en sık kullanılan tekniklerden biridir. Bu kromatografik tekniğin kromatografik ayrım kapasitesi yüksektir ancak sınırlayıcılığı sadece uçucu metabolitlerin ayrımı için kullanılabilmektedir. Uçucu olmayan birçok biyomolekülün analiz öncesinde türevlendirilmesi gerekmektedir. Kütle spektrometresi ile kombine olarak kullanılmaktadır. Gaz Kromatografisinin en önemli avantajı, bu kromatografi tekniği ile kromatografik ayrımlarda tekrarlanabilirliğin yüksek olmasıdır. Bu sebeple GC-MS uygulamaları için hâlihazırda alıkonma zamanı indekslerini de içeren birçok veribankası bulunmaktadır.

1.10.2. Sıvı kromatografisi (LC)

Sıvı Kromatografi tekniğinin, son yıllarda ön plana çıkan UPLC (Ultra performanslı sıvı kromatografisi) cihazları ile kromatografik ayrım gücü artırılmış olsa da Gaz Kromatografisi ile kıyaslandığında daha düşük kromatografik ayrım kapasitesi bulunmaktadır. Ancak yine Gaz Kromatografisine göre en büyük avantajı, uçuculuk sınırlaması olmadığı için Gaz Kromatografisine oranla daha çok sayıda metabolitin ayrımına izin vermesidir.

1.10.2. Kapiler elektroforez (CE)

Sıvı Kromatografisi ile karşılaştırıldığında yapısı gereği Kapiler Elektroforez tekniklerinde daha fazla teorik tabaka sayısı oluşmakta ve bu sebeple daha iyi bir ayırım gerçekleştirilebilmektedir. Kapiler Elektroforez tekniği, özellikle yüklü moleküllerin ayırımına olanak tanıyarak Sıvı Kromatografisi ve Gaz Kromatografisi'ne göre daha fazla sayıda metabolitin analizine imkân sağlamaktadır. Ancak bütün bu avantajlara rağmen Kapiler Elektroforez kullanımındaki en büyük problem tekrarlanabilirlik, duyarlılık ve sağlamlığın düşük olmasıdır. Metabolit profillemeye için kullanılabilmesine rağmen kompleks biyolojik sıvılardan ayırım için iyi bir seçenek değildir ve gelişmeye açıktır.

1.10.3. Kütle spektrometrisi (MS)

Kütle Spektrometrisi, Gaz Kromatografisi, Sıvı Kromatografisi veya Kapiler Elektroforez ile birbirinden ayrılmış olan metabolitlerin analizinde kullanılmaktadır. Ayrılan ve kütle spektrometrisine giden metabolitler, oluşturulan kütle spektrumlarını içeren veribankaları sayesinde tanımlanarak, metabolit profillemeye gerçekleştirilmiş olur. MS/MS uygulamaları içinse fragment iyonları hakkında bilgi içeren ve hali hazırda kullanımı bulunan veribankaları bulunmaktadır. Hassas olması ve özgün sonuçlar alınabilmesi bakımından Kütle Spektrometrisi, metabolomik çalışmalarda vazgeçilmez bir kullanım alanına sahiptir. Bu spektrometrinin kullanımında başka bir yaklaşım ise numunede bulunan metabolitlerin tamamının ayrılmadan kütle spektrometrisine verilmesidir. Özellikle yüksek ayırım gücüne ($>1,000,000$) ve kesinliğe (<1 ppm) sahip Fourier Transform Kütle Spektrometrisi (FTMS) cihazları bu iş için kullanıldığında tatmin edici sonuçlar alınabilmektedir. Ancak FTMS'nin yüksek maliyeti sebebiyle, metabolomik çalışmalarda rutin kullanımı çok mümkün olamamaktadır.

1.10.4. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi

NMR, günümüzde metabolomik çalışmaların, metabolitlerin ayırımına gerek olmadan yapılabilmesini mümkün kılan, kendisine yaygın kullanım alanı edinmiş yöntemlerdendir. Çok sayıda metaboliti eş zamanlı olarak analiz edebilme özelliği ve metabolomik çalışmalar için geliştirilmiş onlarca veribankası sayesinde evrensel bir metabolit dedektörü olma yolunda ilerlemektedir. Metabolitlerin ayırımına gerek duyulmadığı için basit ve yaygın kullanılan protokollerin kullanımı ile numune hazırlama süreci kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir. Bütün bu avantajlarının yanısıra, Nükleer

Manyetik Rezonans Spektroskopisi ile ilgili en büyük sınırlama, şu an için duyarlılığının düşük olması ve dolayısıyla kütle spektrometresi kullanılan diğer tekniklerle karşılaştırıldığında derişimleri düşük olan metabolitlerin teşhisinde yaşanan sıkıntılardır (Çelebier, vd.,2014).

LC-MS (sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi) ve NMR (nükleer manyetik rezonans spektroskopisi) gibi teknikler, mikrobiyal metabolitlerin analizinde her biri farklı avantajlar ve sınırlamalar sunar.

1.10.5. Metabolomik analiz tekniklerinin karşılaştırılması

LC-MS, özellikle elektrosprey iyonizasyon (LC-ESI-MS) ile, yüksek hassasiyet ve çok düşük konsantrasyonlarda (pikomol düzeylerinde) geniş bir metabolit yelpazesini tespit etme yeteneği sağlar. Özellikle tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) ile birleştirildiğinde, özgüllüğü ve yapısal aydınlatmayı artıran bilinen metabolitleri ölçmek için oldukça etkilidir. Ancak LC-MS, iyonizasyon verimliliğini baskılayabilen tuzlar ve ortam bileşenlerinden kaynaklanan zorluklarla sıklıkla karşılaşır.

Buna karşılık, NMR spektroskopisi tahribatsızdır, yüksek oranda tekrarlanabilir ve minimum numune hazırlığı gerektirmektedir. Kapsamlı ayırma veya iyonizasyon işlemlerine gerek kalmadan metabolitleri tanımlama ve niceleme konusunda mükemmeldir. Bununla birlikte, NMR genellikle LC-MS'ye kıyasla daha düşük hassasiyete sahiptir ve çok düşük miktarda bulunan metabolitleri tespit etmek için daha az uygun olabilir. Gücü, daha yüksek konsantrasyonlarda bulunan metabolitler için yapısal bilgi ve nicel veriler sağlamasında yatmaktadır.

Özetle, LC-MS, özellikle karmaşık ortamlarda metabolitlerin hassas ve hedefli kantifikasyonu için tercih edilirken, NMR, bol miktarda bulunan metabolitlerin yapısal analizi ve profillemesi için uygun, sağlam ve tahribatsız bir yöntem sunar. Bunlar arasında seçim, spesifik araştırma sorusu, numune karmaşıklığı ve metabolit konsantrasyonlarına bağlıdır (Mashego vd., 2007).

1.11. Önceki Çalışmalar

Solar tuzlarda su buharlaşması, mikrobiyal türlerin farklı tuzluluklara adaptasyonunu sağlayan tuzluluk dereceleri oluşturur. Bu rekabetçi habitat, mikroorganizmaların metabolik yeteneklerini zorlamakta ve ürettikleri sekonder metabolitlerde birtakım değişikliklerin olmasını teşvik etmektedir. Bu nedenle, solar

tuzlalar potansiyel olarak önemli bir yeni doğal ürün kaynağıdır (Conde-Martínez vd., 2017).

1.11.1. Dünyada yapılmış çalışmalar

Kolombiyanın en önemli solar tuzlası olan, Kolombiya'nın kuzeyindeki Manaure'de (La Guajira) tuzlasından alınan örneklerden yapılan bir çalışmada, ayrı ayrı çevresel isolatlar yerine karışık mikrobiyal kültürlerden biyoaktif bileşik üreticileri olarak halofilik bakterileri seçmek için alternatif bir tarama stratejisi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Farklı tuzluluk derecelerindeki havuzlardan alınan tuzlu su ve sediment örnekleri, bakteri ve arkeleri geliştirmek üzere yedi farklı kültür ortamına ekilmiştir (toplam 40 farklı karma kültür olacak şekilde). Her karma kültürden organik bir ekstre elde edilerek çoklu ilaca karşı dirençli gibi patojenlere karşı test edilmiştir (*Klebsiella pneumoniae*, vankomisine dirençli *Enterococcus faecium*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* gibi). Bu karma kültürlerden elde edilen 9 izolat da aynı patojenlere karşı test edilerek bunların içinden karışık kültür için gözlemlenene benzer antimikrobiyal aktiviteye sahip *Vibrio* sp. A1SM3-36-8, halofilik bir tür olarak tespit edilmiştir. (Conde-Martínez vd., 2017).

Bakterilerde stres yanıtlarını incelemek için metabolik tabanlı yaklaşımlara son yıllarda oldukça ilgi gösterilmeye başlanmıştır. Diğer bir çalışmada, Hindistan'da bir tuzla bölgesinden halofilik bakteri izolatlarının (*Halomonas hydrothermalis* VITP9, *Bacillus aquimaris* VITP4, *Planococcus maritimus* VITP21 ve *Virgibacillus dokdonensis* VITP14), nükleer manyetik rezonans spektroskopisi kullanılarak metabolomik analizleri yapılmış. ¹H NMR spektrumunun kemometrik analizi, glikolitik yoldan, pentoz fosfat yolundan ve sitrik asit döngüsünden yönlendirilen, başlıca aspartat ve glutamat ailesinden metabolit seviyelerinde tuza bağlı bir artış olduğunu ortaya koymuştur. NMR verilerinin analizi, ektoin, prolin, glutamat ve glisin betain gibi iyi bilinen diğer çözücüler dışında iki nadir diaminoasit, sırasıyla Nε-asetil-a-lisin ve Nδ-asetlornitini (sırasıyla VITP21 ve VITP4 suşları), birikimini ortaya koymuştur. (Joghee and Jayaraman, 2014).

Salinibacter ruber dünya çapında tuz kristallenme havuzlarında gelişebilen Bacteroidetes'in oldukça halofilik bir üyesidir. İspanya'da bulunan, birbirinden 350 km mesafede, biri kıyı şeridinde, biri içte bulunan iki kristalleştirici havuzdan gelen 100 mikrolitre su örneğinden iki set (22 ve 35) birlikte bulunan *S. ruber* suşu analiz edilmiş. Suşların genomik ve taksonomik ilişkileri sırasıyla PFGE ve MALDI-TOF ile analiz

edilirken, metabolomik potansiyelleri yüksek çözünürlüklü iyon siklotron rezonans Fourier dönüşümü kütle spektrometresi (ICR-FT / MS) ile araştırılmıştır. Sonuçlar genel olarak filogenetik olarak çok homojen türlerin oldukça farklı metabolomik havuzlar ifade ettiklerini göstermektedir. Özellikle lipid ve antibiyotik metabolizması ile ilişkili bileşiklerle ilgili bazı metabolomik farklılıklar, birlikte bulunan suşlar içindeki farklı kümeleri tarif etmek için yeterli bir spesifikite sağlamıştır (Antón vd., 2013).

Diğer bir çalışmada ilk kez, fenotipik biyocoğrafik farklılığı ortaya çıkarmak için ultra yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisine dayanan bir metabolik yaklaşım sunulmuştur. Dünyadaki farklı bölgelerden izole edilen kozmopolit ekstremofilik bakteri *Salinibacter ruber* suşlarının karakteristik metabolitler vasıtasıyla ayırt edilebildiğini ve bu farklılıkların coğrafi izolasyon bölgeleri uzaklıkları ile ilişkilendirilebileceğini göstermişlerdir. Bu yaklaşım, farklı coğrafi ölçeklerdeki izolatların belirgin derecelerde ayırımına izin vermektedir. Her durumda, ayırt edici metabolit modellerinin kalitatiften ziyade daha çok kantitatif olduğu görülmüştür, bunun da coğrafi olarak farklı transkripsiyonel veya post transkripsiyonel düzenlemelerin bir göstergesi olabileceği düşünülmüştür. Çalışmada High-field ion cyclotron resonance Fourier transform ICR-FT/MS kullanılarak elde edilen kütleler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Rosselló-Mora vd., 2008).

1.11.2. Ülkemizde yapılmış çalışmalar

Çamaltı Tuzlasından su ve toprak örnekleri ile yapılan ülkemizdeki bir çalışmada, Farklı besiyerlerinde geliştirilerek tanımlanan 34 farklı aerobik halofilik organizma izole edilerek tanımlanmıştır.

Farklı koloni morfolojisine sahip 34 adet izolatın 19 adedinin Arke 15 adedinin ise Bakteri domainine ait olduğu belirlenmiş ve bunların bazı biyokimyasal testler ve antibiyotiklere duyarlılık testleri yapılmıştır.

Kommünite analizine yönelik, kültür bağımsız yöntem olan FISH yöntemi uygulanarak Bakteri/Arke sayıları ve DAPI boyamaları ile örneklerdeki Arke, Bakteri ve toplam hücre sayıları belirlenmiştir. Ayrıca FISH yöntemi kullanılarak Bakteri üyelerinden *Salinibacter*'in Çamaltı Tuzlası'ndaki varlığı ilk olarak ortaya konmuştur (Çetinkuş vd., 2007).

Yine Çamaltı Tuzlası'ndan alınan örneklerden halofilik mikroorganizmaların izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bunlar biyoteknolojik öneme sahip bazı enzimler

açısından taranmış ve biyokimyasal testleri yapılmış ve moleküler karakterizasyonları yapılmaya çalışılmıştır.

İki farklı noktadan alınan toprak örneklerinden saflaştırılan 14 izolatın; %48,2'sinin esteraz, %28,5'nin proteaz, %100'ünün DNaz aktivitesine sahip oldukları; lipaz, amilaz, jelatinaz ve selüloz aktivitesi göstermedikleri görülmüştür. İzolatların 16S rDNA moleküler tanıları sonucu izolatların yedisi %99 oranında *Haloferax alexandrinus*, Kalan yedi izolat ise sırası ile; %98 oranında *Haloferax alexandrinus*, %96 benzerlik oranıyla *Haloferax alexandrinus*, diğer bir izolat ise %99 *Haloferax sp. HSC4*, %97 *Haloferax YT 228*, %99 *Halobacterium salinarum R1 strain*, ve %97 *Halobacterium salinarum* olarak tanılanmıştır (Kahraman, 2008).

İzmirdeki yine aynı lokaliteden PHB üretici halofilik mikroorganizmaların (ekstrem halofilik Arke) varlığı, identifikasyonu ve PHB verimleri araştırılmış, topraktan izole edilen 14 izolatın fenotipik ve genotipik analizleri yapılmış ve biyoteknolojik potansiyele sahip PHB üretici izolatların araştırılması için PHB'ye spesifik fluoresans boya olan Nile Blue A ile boyanmıştır. Kontrol grubu olarak *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 tip suşu kullanılarak PHB verimleri üç değişik ortam kullanılarak araştırılmıştır. 14 izolatın 16 S rRNA genlerinin dizi analizleri ve NCBI Blast programı ile 7 adet izolatın *Haloferax alexandrinus*'a %99 benzer bulunmuş. Kalan 7 izolat ise sırası ile; %99 oranında *Halobacterium salinarum R1*, %99 oranında *Haloferax sp. HSC4*, %98 oranında *H. alexandrinus*, %97 oranında *Halobacterium salinarum*, %96 oranında *H. alexandrinus*'a benzer bulunmuştur (Ekin, 2008).

Yine aynı lokaliteden izole edilmiş ılımlı halofilik bir suş olan *Halomonas sp. AAD12*'nin tuz adaptasyonu mekanizması, birleştirilmiş deneysel ve hesapsal yöntemle araştırılmış, prolin, ektoin ve hidroksi ektoin gibi temel ozmolitleri belirlemek ve miktarlarını tespit etmek için NMR spektroskopisi kullanılmıştır.

%5 ve %20 NaCl varlığında, farklı büyüme evrelerinde ozmolitlerin miktarlarındaki değişim belirlenmiştir. %5 NaCl varlığında Ektoin havuzu ekspanensiyel fazın ikinci yarısında artarken %20 NaCl varlığında, ekspanensiyel fazın ikinci yarısındaki büyüme sırasında toplam ozmolit miktarı azalmıştır. Yüksek tuzlulukta en önemli ozmolit, prolin olarak belirlenmiş, tuzluluğun artmasıyla, ektoin havuzundaki hidroksi ektoin yüzdesi de artmıştır.

NMR analizinden elde edilen sonuçlar, Akı Denge Analizi (FBA) gerçekleştirilirken kısıtlayıcı olarak kullanılmıştır. Temel karbon metabolizması ve

ozmolitlere bağılı olan yolakları içeren küçük bir sistem kurularak, büyüme reaksiyonu halofilik organizmaların kompozisyonu ve tuz etkisi göz önüne alınarak belirlenmiştir. Biyokütlenin maksimizasyonu amaç fonksiyonu olarak belirlenerek model organizma sisteminin akı dağılımları ozmoadaptasyonu anlamak için incelenmiştir.

Sitrat karbon kaynağı olarak kullanıldığında, modeldeki reaksiyonlar glukoneojenezi aktifleştirerek ters yönde gerçekleşmiştir. Ozmolit sentezine yönelen sitrat miktarının yüksek tuzlulukta daha belirgin olduğu görülmüştür. Bu akı dağılımları, daha sonra her bir akıyı minimize ve maksimize ederek bir aralık tanımlamayı sağlayan Akı Değişkenlik Analizi (FVA) yöntemiyle daraltılmıştır. Bu yöntemle düşük tuzlulukta akıların değişim aralıklarında önemli farklar olduğu görülmüştür (Yılan, 2011).

Yine Çamaltı Tuzlası'ndan halofilik ve karotenoid üreten 10 bakteri suşu selektif Marin agar ortamı kullanılarak izole edilmiş ve 16S rDNA gen dizi analizine göre, suşların *Bacillus safensis* (SC4), *Marinobacter aquaticus* (SC2), *Halomonas fontilapidosi* (SC1, SC5), *Halobacillus locisalis* (SC7, SC8, SC9), *Salicola salis* (SC6), *Halobacillus halophilus* (SC10) türlerine ait olduğu belirlenmiştir. İzole edilen suşlardan, karotenoidler metanol/aseton yöntemi ile ekstrakte edilmiş ve ekstraksiyondan sonra elde edilen karotenoidler ince tabaka kromatografisi ile belirlendikten sonra ayrıca spektrofotometrik olarak 300nm-800nm dalga boylarında taranmıştır. Bu ön tarama sonucunda 6 izolatın belirgin karotenoid pikleri verdiği görülerek karotenoidlerin detaylı analizleri ve belirlenmesi için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Yapılan HPLC analizi sonucunda likopen, β -karoten, all-trans-lutein, 13-cis- β -karoten, 9-cis- β -karoten, apo-8-likopen moleküllerinin izolatlar tarafından üretildiği saptanmış, ancak bunların yanısıra standartlarla ve literatür verileriyle eşleşmeyen karotenoid pikleri de elde edilmiştir (Hassanzadehiznabi, 2019).

Yine ülkemizde yapılan *Escherichia coli*'de in vivo kinetik modelleme araçları geliştirmeye odaklanan bir çalışmada, flaksom ile metabolom arasındaki ilişkiler incelenmiş, ayrıca hücresel sistemleri kavramakta temel olan stokiyometrik ve termodinamik analizler amaçlanmıştır. Hücre dışı metabolitleri ayırmak için en sık uygulanan yöntem varyasyonları olan dört farklı dindirme protokolü, araştırılmış. Soğuk metanolle dindirme sırasındaki metabolit kaçağı merkez metabolitlerin, amino asitlerin ve adenin nükleotidlerin LC-ESI-ID-MS/MS veya GC-MS ölçümlerinden titiz bir denge yaklaşımı kullanılarak hesaplanmış ve broth örneklerinin kemostattan hızlıca, bu iş için özel tasarlanmış hızlı bir örnekleme cihazı ile çekilip, anlık olarak durdurulup (<180

milisaniye), kültür süzüntüsünün doğrudan filtrasyon ile elde edildiği diferansiyel bir yöntem geliştirilmiştir.

Glukoz sınırlı yetiştirilen *E. coli* kültürüne doğrudan biyoreaktörde uygulanan glukoz-puls sırasında akı ve metabolit yanıtının nicel analizi sunulmuş. *E. coli* pertürbasyon deneyleri için tasarlanan yeni bir BioScope II cihazının karakterizasyonu ve uygulaması açıklanmış. Glukoz-sınırlı kemostatta yetiştirilen *E. coli*'nin glikolitik (glukoz) ve glikoneojenik (pirüvat, süksinat) substratlara gösterdiği *in vivo* dinamik tepki her iki platformda da araştırılmıştır. Yüksek miktarda süksinat üreten *E. coli* mutantının kararlı ve dinamik durumlarda lokalize pulslara gösterdiği metabolit ve akı yanıtlarının karşılaştırmalı bir çalışması yapılmıştır (Nikerel, 2010).

Yapılan bir diğer çalışmada *S. cerevisiae* hücrelerinin çevresel ve genetik değişikliklere verdiği transkripsiyon tepkisi ve metabolik tepkileri çalışılmıştır. Örnekler üç alıkonma zamanı sonrasında toplanarak, biyokütle, mRNA ve metabolit konsantrasyonu analizlerine tabi tutulmuştur.

Maya hücrelerinin gen delesyonlarına ve büyüme koşullarına verdiği transkripsiyon tepkisi, merkezi karbon metabolizmasının transkripsiyon regülasyonunun incelenmesini mümkün kılmıştır. Metabolit ve transkripsiyon verileri kısmı en küçük kareler (PLS) metodu kullanılarak bütünleştirilmiştir, böylece transkripsiyon verileri kullanarak metabolit miktarlarının modellenebilmiştir. PLS verileri, büyüme koşullarında yapılan değişiklikler sonrasında metabolit miktarlarının değişmesine sebep olan genlerin belirlenmesini mümkün kılmıştır. Transkripsiyonu korelasyon gösteren genler arasında bir ağ oluşturulmuş ve bu ağın var olan fonksiyon atamalarını tahmin edebilme gücü test edilmiştir. Ağın zenginleştirilmesi ve tahmin gücünün artırılması amacı ile diğer veri kaynaklarından alınan bilgiler (aminoasit dizilimi benzerliği, protein-protein etkileşimi, paylaşılan transkripsiyon faktörleri) transkripsiyon verileriyle bütünleştirilmiştir. Daha önce bilinmeyen regülasyon ilişkilerinin ortaya çıkarılmasını, birçok bilinmeyen gene fonksiyon atanmasını ve metabolitler ile transkripsiyon profilleri arasında bir ilişki kurulmasını sağlamıştır (Pir, 2005).

Yapılan bir diğer çalışma kapsamında, kolorektal kanseri in-vitro modeli olan insan kolon adenokarsinom hücre hatlarına (Caco-2) ve kontrol olan insan fetal kolon hücre hatlarının (FHC) kemotöratpotiklere karşı gözlenen direnç gelişimine bağlı olarak fenotipde gözlenen değişimler metabolomik, lipidomik ve fluksomik analizler ile incelenmiştir. Fluksomik analizlerde kararlı ¹⁸O izotopı işaretleme ajanı olarak

kullanılmıştır. Metabolomik, lipidomik ve fluksomik analizlerin gerçekleştirilmesinde GC-MS ve LC-qTOF-MS analitik cihazları kullanılmış. Bu analizler sonucunda 300'ün üzerinde metabolit/lipit ve 38 metabolitin ^{18}O işaretlenme yüzdeleri hesaplanmıştır. Tez kapsamında ilk kez ^{18}O kararlı izotopu ile Krebs döngüsü metabolitleri, aminoasitler, yağ asitleri ve oligofosfonükleotitlerin işaretlenme yüzdeleri belirlenmiştir. İstatiksel olarak anlamlı bulunan metabolitler ile gerçekleştirilen yolak analizlerinde malat-aspartat mekiği, aminoasit, amonyak metabolizmaları ile glikoz-alanin ve üre döngülerine ait yolakların dirence bağlı olarak değiştiği gözlemlenmiştir. Elde edilen kapsamlı omiks (metabolomiks, lipidomiks ve fluksomiks) verileri, kemoterapötiklere karşı izlenen direncin hücre dinamiklerindeki farklılıklarını göstermiştir (Özen, 2019).

Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesi'nde meme kanseri tanısı ile takipli ve uzak organ metastazı olan 88 hasta dahil edilerek yapılan bir çalışmada, beyin metastazı bulunan meme kanseri hastalarında metabolomik yöntemle metastazın erken tespiti için belirteç bulunması amaçlanmıştır. Metabolomik analizler LC-qTOF-MS ve GC-MS sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm analizlerde gruplar arası fark için istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. GC-MS analiz yöntemi kullanılarak 79 adet metabolit tanımlanmıştır. Bu metabolitlerden 11 tanesinin (alanin, sfingozin, früktoz, fumarik asit, glisin, laktik asit, fenilalanin, piroglutamik asit, serin, treonin, valin) beyin metastazı bulunan grupta istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). LC-qTOF-MS yöntemi ile de iki grup arasında istatistiksel anlamlılık gösteren 47 metabolit belirlenmiştir (Özer, 2018).

Diğer bir çalışmada ise Marmara Deniz'nin hidrokabonlarla kirlenmiş iki bölgesi çalışılmıştır. Hidrokarbon degrade etme yeteneği ve sülfür ile organik madde giderim yeteneği olan mikroorganizmaların varlığı kültürden-bağımsız tekniklerle incelenmiştir. İki bölgeden biri olan Tuzla anoksik sediment numunelerinde, Moda'dan elde edilenden daha yüksek bir mikrobiyal çeşitlilik olduğu, klon kütüphanelerinin dizi analizi sonucunda ortaya konmuştur.

Tuzla'daki baskın prosesler, Arkeal ve bakteriyel türlerin klon kütüphanelerindeki görülme sıklığına dayanarak, metilotrofik metanojenez ve denitrifikasyon olarak bulunmuşken, Moda'da baskın olan potansiyel prosesler ise hidrogenotrofik metanojenez ve fermentasyon olarak görülmüştür. DGGE datası, Tuzla sedimentlerinin mikrobiyal çeşitliliğinde daha kayda değer bir mevsimsel değişim ortaya koymuştur (Sezgin, 2005).

Çamaltı Tuzlasının tuzluluk derecesi farklı 6 havuzundan alınan su örneklerinden bakteriyel izolasyonlar gerçekleştirilen bir çalışmada, rastgele seçilen 12 izolatın bazı fenotipik özellikleri incelenmiş. İzolatların fenotipik ve 7 enzim için belirlenen özellikleri bunların büyük olasılıkla Bacteria veya Arkea domainine ait farklı cins ve türlerin temsilcileri olabileceğini göstermiştir. Gıdalarda ve deri endüstrisinde ham tuz içinde zararlı etkisi olan Jelatinaz, DNaz, Twen-80 ve sellülaz hidrolitik enzimleri bazı izolatlarda gözlenmiştir. Bacteria domainine ait 6 izolatın yağ asidi metil ester profilleri farklı olduğu, farklı cins ve türleri temsil ettiği görülmüştür (Güven vd., 2010).

Çamaltı tuzlasından alınan örneklerle yapılan bir çalışmada, yeni izole edilmiş, on adet orta derecede halofilik mikroorganizmanın *Halomonas salina* DSMZ 5928 ve *Halomonas halophila* DSMZ 4770 ile ilişkisini ortaya koymak için elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi kullanılmıştır. Metot, kültür ortamındaki metabolitlerin global analizine dayanmakta ve metabolik ayak izi olarak adlandırılmaktadır. Sadece kromatogramların görsel incelemesine dayanarak benzerlikler hakkında fikir edinmek mümkün olmadığından, verilere temel bileşen (PC) (Principal Component) analizi uygulanmışlardır. Üç temel bileşen analizi ile veri setindeki bilgilerin %99'unu açıklanabilmiştir. Skor grafikleri, yeni izolatların iki tip soy ile ilişkisini ortaya çıkarırken, yükleme grafikleri, gözlenen kümelenmeden sorumlu önemli iyonlar üzerinde önemli ipuçları vermiştir. Yükleme grafikleri ayrıca, farklı metabolik yollar hakkında ipuçları veren ters orantılı iyonları da belirtmiştir. Bu çalışma, yeni ve yakın ilişkili izolatların ön hızlı fenotipik karakterizasyonu için potansiyel olarak yararlı bir yol ve farklı ve değerli sekonder metabolitler için, benzer mikroorganizmaların taranması için bir yöntem ortaya koymuştur (Akbulut vd., 2008).

Çamaltı Tuzlasının bakteriyel çeşitliliğini belirlemek için kültür bağımlı ve kültür bağımsız yaklaşımlar kombinasyonu kullanılmıştır. Tuzlanın bakteriyel toplulukları, alınan su örneklerinden ekstre edilen DNA'dan polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgelerinin, denatüre edici jel elektroforezi ve 16S rRNA gen kütüphanesi analizi gibi moleküler tekniklerle analiz edilmesi ile belirlenmiştir. Cins / tür düzeyinde tanımlanan toplam 42 izolattan 17'sinin Bakteri domainine ait olduğu tespit edilmiştir.

Tüm bakteri izolatları filogenetik olarak *Halobacillus*, *Virgibacillus* ve *Halomonas* cinsleri ile ilişkili bulunmuştur. 16S rRNA gen kütüphanesinden toplam 50 klon ARDRA ile analiz edilmiş ve bunların 16S rRNA dizi analizi sonucunda, bakteriyel klonların

çoğunun (%85), *Salinibacter* cinsi üyeleri ile ilişkili olduğu görülmüştür. DGGE bantlarının dizileri, kültür edilmemiş *Salinibacter*, kültür edilmemiş halofilik bir bakteri ve *Halomonas* sp. ile ilişkili bulunmuştur (Mutlu ve Güven 2015).

Yapılan bu çalışma ile;

Denizel ortamdan hareketle, artan tuzluluklardaki ortamlarda, giderek sınırlanan mikrobiyal çeşitliliği belirleyerek, bu süreçte gözlenen metabolomik değişimlerin tespit edilmesi;

Yılda yaklaşık 550 000 ton tuz üretilen, Türkiye toplam tuz üretiminin %25 ini karşılayan Çamaltı Tuzlasının, ürün üretimi süresince değişken tuzluluktaki havuzlar gibi ortamlarda gelişebilen mikroorganizmalar ile ilgili dinamiklerin belirlenerek, kültüre edilebilen izolatların bir kısmı için metabolitlerin belirlenmesi;

Doğrudan çevresel örneklerden, sıvı kültürde geliştirilen izolatlardan, ekstraksiyon ve türevlendirme basamakları uygulandıktan sonra, Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi analizleri ile metabolomik veri setlerinin elde edilmesi.

Metabolomik veri setlerinin değerlendirilerek, bu süreç içine üretimi tespit edilen biyoteknolojik öneme sahip metabolitler ile ilgili çıktılar elde edilmesi amaçlanmıştır.

Son yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesi ile birlikte böyle ortamların mikrobiyal çeşitliliği hem bireysel araştırmalar hem de özellikle deniz ortamları için, küresel sayılabilecek çapta büyük ölçekli çalışmalarla da tanımlanmıştır ancak mikrobiyal ekolojide metabolomik çalışmalar henüz moleküler teknikler kadar çok yaygınlaşmamıştır.

Moleküler tekniklerin gelişmesi ile böyle ortamların mikrobiyal çeşitliliği hem bireysel araştırmalar hem de özellikle deniz ortamları için, küresel sayılabilecek çapta büyük ölçekli çalışmalarla tanımlanmıştır ancak mikrobiyal ekolojide metabolomik çalışmalar henüz yaygınlaşmamıştır.

Son yıllarda dizileme teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte mikrobiyal çeşitlilik çalışmaları ivme kazanmıştır ve giderek daha fazla mikroorganizmaya ait 16S rRNA ve tüm genom dizileri ortaya konabilmektedir. Son 20 yılda birden fazla küresel çapta okyanus keşif genom projeleri ile elde edilen veriler de eklendiğinde genomik veriler logaritmik bir artış göstermiştir. Bu çalışmalardan bir kısmında mekânsal ekosistem modelleri oluşturmak için evrimsel, metabolik ve etkileşimli veriler elde etmeye yönelik çalışmalar yapılmış olsa da büyük genomik veri havuzu ile kıyaslandığında mikroorganizmalara ait metabolomik veriler henüz genomları kadar yaygın

alışılmamıştır. Yapılan metabolomik çalışmalar ise ağırlıklı olarak belli bir grup maddeyi hedefleyen ve kültür ortamlarından yapılanlardır. Ülkemizde ise bu kapsamda yapılan in-situ metabolomik çalışmaya rastlanmamıştır.

Mikrobiyal ve metabolik eşitliliğın ortaya çıkarılması ile ilgili bir çalışmanın literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.

Kullanılacak teknikler ile bu konuyla ilgili kişilere temel bir kaynak sağlanacaktır.

Yoğun bir şehirleşme bölgesinin oldukça yakınında yer alan konumundan dolayı muhtemel deniz kirliliğı bakımından bizi hidrokarbon degradasyonu yapabilen mikroorganizmalar açısından çıktılara götürebilecektir.

İzmir Çamaltı Tuzlası gibi büyük çapta tuz üretiminin yapıldığı bir alandan büyük çaplı biyoteknolojik çalışmalara (rn. karotenoid, enzim üretimi) kaynak sağlayacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Örnekleme Çalışması

Çamaltı Tuzlası, ülkemizdeki önemli tuz üretim yerlerinden biridir. Konum olarak İzmir iline 28 km uzaklıkta, Gediz Nehri havzasına kurulmuştur ve Türkiye'nin deniz kaynaklı en büyük tuzlasıdır. Coğrafik olarak 38° 30 dk, 18 sn. Kuzey, 26° 54 dk. 55 sn. Doğu koordinatlarında, İzmir ili Sasalı Beldesi, Çiğli ilçesindedir.

Çamaltı Tuzlası 24.161.000 m² alana yayılmış buharlaştırma havuzları ve 3.158.000 m² alanı kaplayan kristalizasyon havuzlarıyla önemli bir sulak alandır. Genel olarak I. ve II. tuzla, su depolama alanları, kristalizasyon havuzları olarak 4 ana kısma ayrılır. Su depolama havuzları %35–50, buharlaştırma havuzları %50–150, kristalizasyon havuzları %150–300 tuzluluktadır. Tuz üretim parsellerinin ortalama derinliği 0,5–1,0 m olmakla beraber, 1,5 m derinlikteki tuz havuzlarıyla, su iletim kanalları da mevcuttur. Tuz parsellerinin zemini sıkıştırılmış olup, topraktır. Tuzlanın denizle bağlantısını, ana kanal üzerine kurulmuş olan pompalar sağlamaktadır. Böylece değişik boyutlardaki havuzlara verilen deniz suyu, kademeli olarak tuz kristalizasyon havuzlarına ve tüm alana dağıtılabilmektedir (Koru, 2004).

2.1.1. Örnek sayısının ve tipinin belirlenmesi ve örnek alınması

Örnekleme, refraktometre ile tuzlulukları yerinde ölçülen 6 farklı tuzlulukta bulunan havuzdan, havuzun içine girilerek (derinlik ve zeminin yapısının izin verdiği yerlerde) kenardan birkaç adım içerideki kısımdan yapılmıştır.

Her bir örnekleme alanından planlandığı gibi; Metabolomik Çalışmalar, FISH ve Metagenomik Çalışmalar ve Kültür Çalışmaları için kullanılmak üzere 3 ayrı set örnek alınmıştır.

Metabolomik çalışmalar için kullanılacak örnekler -80°C de azot tankına konarak ve 20°C de kuru buz konan kap içerisinde getirilmiştir.

FISH, Metagenomik ve Kültür çalışmaları için yetecek kadar örnek yine -20°C de kuru buz konan bir kap içerisinde getirilmiştir.



Görsel 2.1. Binbir gıda çamaltı tuz işletmesi

Fotoğrafta, örnek alınan havuzlar, üzerine tuzluluk oranları yazılarak gösterilmiştir.

Azalan tuzluluk oranlarına göre örnek alınan havuzların fotoğrafları aşağıda verilmiştir.



Görsel 2.2. %33 ve %25 tuzluluk havuzları



Görsel 2.3. %19 ve %15 tuzluluk havuzları



Görsel 2.4. Örnekleme sırasında formaldehit ilavesi

Nisan ayında yapılması planlanan örnekleme; seyahat yasaklarının kalkması sonrası, yağmurlu dönemin geçmesi bir hafta beklendikten sonra 15 Haziran 2020’de yapılmıştır.

2.2. Örneklerin Özelliklerinin Belirlenmesi

Örneklerin tuzlulukları örnek alma bölgesinde, öncesinde refraktometre ile, pH değerleri ise geldikten hemen sonra ölçülmüştür.

6 farklı tuzluluktaki havuzdan, havuzun içine girilerek, kenardan birkaç adım içerideki kısmından örnek alınmıştır. Her bir örnekleme alanından planlandığı gibi: 3 ayrı set örnek alınmıştır. (1. Metabolomik Çalışmalar, 2. FISH ve Metagenomik Çalışmalar 3. Kültür Çalışmaları)

Metabolomik çalışmalar için kullanılacak örnekler -80°C de azot tankına konarak ve -20°C de kuru buz konan kap içerisinde getirilirken. FISH, Metagenomik ve Kültür çalışmaları için yetecek kadar örnek yine -20°C de kuru buz konan kap içerisinde taşınarak donmuş halde getirilmiştir. Örneklerin tuzlulukları örnek alma bölgesinde el refraktometresi ile ölçülürken, pH değerleri ise getirdikten hemen sonra belirlenmiştir.

2.2.1. Farklı tuzluluktaki örneklerin elementel bileşimlerinin belirlenmesi

Anadolu Üniv. BİBAM'da ve Osmangazi Üniv. ARUM'da, su örneklerinde bulunan Na, Mg, Ca ve K elementlerinin miktarları ICP OES'ile ölçülmüştür.

Her bir elementin okunabildiği doğru seyreltmeye ulaşabilmek için, her bir tuzluluk için 3 farklı seyreltme yapılarak örnek hazırlanmış, böylece ilgili elementin sağlıklı okunabilmesi sağlanmıştır. (Tüm elementler için standartlar 1-100 ppm aralığında hazırlanmış. NŞ: Normal şartlarda, yani oda sıcaklığında saklanan örnekleri belirtmek için kullanılmıştır.

2.2.2. Farklı tuzluluktaki örneklerin iyonik bileşimlerinin belirlenmesi:

Yine BİBAM'da bulunan İyon Kromatografi Cihazı ile ICP ile belirlenmesi mümkün olmayan iyon olan (Cl^-) iyonunu da belirlemek üzere; Klorür (Cl^-), Nitrit (NO_2^-), Nitrat (NO_3^-), Fosfat (PO_4^{3-}) Sülfat (SO_4^{2-}) Florür (F^-), Bromür (Br^-) iyonlarını içeren standart seti kullanılmıştır. (Standartlar 1-100 ppm aralığında hazırlanmıştır.)

ICP ile belirlenen Sodyum miktarı ve standart çözeltideki bilinen Cl^- iyonu derişimi düşünülerek tüm örnekler 10^{-3} oranında seyreltilerek analiz edilmiştir.

Önceki ölçümlerden elde edilen sonuçlara göre, %3 ve %9 tuzluluktaki örnekler için, seyreltmeler 10^{-2} oranında da yapılarak, bu tuzluluğa sahip örnekler analiz edilmiştir.

2.2.3. Örneklerin katı madde miktarları ve yoğunluklarının belirlenmesi:

Katı madde miktarı, iki farklı yöntemle elde edilmiştir. Metabolit analizi için örnek hazırlama aşamalarından biri olan su örneğini konsantre etme işlemi, hem konsantratör hem de liyofilizatör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. (Sogin, vd., 2019).

Liyofilizasyon işlemi sırasında seçilen tüplerin boyutu uygun olmadığı için örneklerin bir kısmında işlem sırasında kayıp yaşanmış, işlem daha büyük örnek kabı kullanılarak tekrar edilmiştir.

2.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

2.3.1. DNA ekstraksiyon tamponu

Tris-HCl (Sigma).....1.57g/100mL

EDTA (Merck).....2.92g/100mL

pH 8.0'e ayarlanır, hacim Milli-Q su ile tamamlanır, 0,2 µm filtreden geçirildikten sonra otoklavlanarak steril edilir.

2.3.2. 5 M NaCl çözeltisi

NaCl.....29,22 g/100mL

Milli-Q su ile hacim tamamlanır ve otoklavlanarak steril edilir.

2.3.3. %10 SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltisi

SDS (Merck)..... 10 g/100mL

Hacim Milli-Q su ile tamamlanır, 0,2 µm filtreden geçirildikten sonra otoklavlanarak steril edilir.

2.3.4. Sodyum asetat tamponu (3 M, AcNa pH 4.8)

Sodyum asetat (Sigma).....40,82 g/100mL

pH 4.8' e ayarlanır. Hacim Milli-Q su ile tamamlanır, 0,2 µm filtre ile filtre edildikten sonra otoklavlanarak steril edilir.

2.3.5. Lizozim enzim solüsyonu (10 mg/mL)

Lizozim (Sigma).....100 mg

0.5 M EDTA pH 8.0 (Thermo Fisher).....1 mL

1M Tris-HCl pH 8.0 (Thermo Fisher).....1 mL

Milli-Q su.....8 mL

0,2 µm filtreden geçirildikten sonra otoklavlanarak steril edilir ve -20 °C'de muhafaza edilir.

2.3.6. MgCl₂ tamponu (1M)

Magnezyum klorür (Fluka)..... 20,33 g

MgCl₂ (MA: 95,21 g/mol)..... 9,52 g

Hacim Milli-Q su ile tamamlanır, 0,2 µm filtre ile filtre edildikten sonra otoklavlanarak steril edilir.

2.3.7. 50X TAE tamponu

Trisbase 242 g

Asetikasit 57,1 mL

EDTA (0,5 M; pH 8,0) 100 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 8,0'a ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır.

2.3.8. 1X TAE tamponu

50X TAE 20 mL

Distile su 980 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, oda sıcaklığında saklanır.

2.3.9. 5X TBE tamponu

Tris Base (Sigma).....54 g

Borik asit (PanReac AppliChem) 27.5 g

0.5 M EDTA, pH 8.0.....20 mL

pH 8.0'e ayarlanır, distile su ile 1 litreye tamamlanır. 0,2 µm filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklanır.

2.3.10. 1X TBE tamponu

5X TBE 20 mL

Distile su 980 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, oda sıcaklığında saklanır

2.4. Total DNA Ekstraksiyonu ve Metagenomik Çalışmalar İçin Örnek Hazırlama

Yüksek 3 tuzluluktaki (%33 %25 ve %19) örneklerden santrifüj ile pellet eldesi işlemi:

108 mL ((18x3) x 2 mL) su örneğinden santifüj ile pellet elde edilmiştir. (13 200 rpm'de 10 dk)

Düşük 3 tuzluluktaki (%3 %9 ve %15) tuzluluktaki örneklerden santrifüjle pellet elde işlemi:

Düşük 3 tuzluluk için de aynı şartlar denenmiş ancak özellikle oda şartlarında iki ay kadar beklemiş olan, %3 ve %9 tuzluluk örneklerinden yeterli miktarda pellet elde edilememesi üzerine, kuru buz ile donmuş olarak getirilen ve -20°C'de donmuş olarak saklanan örnekler, oda sıcaklığına alınıp, sıvı hale geçer geçmez pipetlenerek santrifüj edilmiştir. Bu şekilde -20°C'de muhafaza edilen örneklerden DNA ekstraksiyonu için yeterli pellet elde edilebilmiştir.

Aynı hacimde su örnekleri ile çalışılarak, bu düşük 3 tuzluluk için de, 108 mL ((18x4) x 1,5 mL) 'den santifüj ile DNA ekstraksiyonu için pellet elde edilmiştir. (13 200 rpm'de 10 dk.).

Ekstre edilen DNA'lar jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

Jeller %0.8 agaroz içerecek şekilde hazırlanarak ve 90 volt'ta 40 dk yürütüldükten sonra görüntülenmiştir.

Yüksek tuzluluktaki %33 %25 ve %19 tuzluluktaki örneklerden ikişer set 24 x 2 mL den santifüj ile pellet elde edilmiştir.

Santifüj süperntanlarından 50 mL matabolomik analizler, 50 mL ICP ölçümleri için ayrılmıştır.

FISH için örneklerinin Filtrasyon aşamaları yapılarak filtreler -20°C'ye kaldırılmıştır.

Ayrıca 45 mL havuz örmğine 5 mL gliserol eklenerek, -80°C'ye kaldırılmıştır.

2.4.1. Total DNA ekstraksiyon prosedürü

Ekstraksiyon işlemi yeterli miktarda pellet elde edilebilen tüm tuzluluklar için uygulanmıştır.

Elde edilen hücre pelletlerinden total DNA'nın ekstre edilmesi için uygulanan ekstraksiyon basamakları aşağıdaki şekildedir;

-Değişken tuzluluk havuzlarından elde edilen Eppendorf tüp içinde bulunun pelletler üzerine:

-1mL Saline EDTA,

-3.3 µl (300mg/mL) lizozim ve

-10 µl proteinaz K (10µg/mL) eklendikten sonra 15-30 dakika 37 °C’de çalkalamalı etüvde bekletilir.

-Daha sonra 80 µl %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenip, 65 C’de su banyosunda 10 dakika bekletilir.

-250 µl 5 M NaCl eklenerek tüp ters düz edilerek karıştırılır.

-Örnek iki eşit hacme ayrılır (yaklaşık 671 µl).

-Yine 671 µl hacimde Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (25:24:1) eklenerek tüpler birçok kez ters düz edilir.

-6 dakika 4 °C’de 13.000 rpm de santrifüj edilir.

-Üstteki sıvı faz dikkatlice alınır (çözücü fazından almamaya çalışılarak).

-Alınan üst faz hacmi 550 µl den az ise işleme iki tüp birleştirilerek devam edilir.

-Elde edilen hacim 600 µl olduğu için iki ayrı tüp ile devam edilir

DNA’yı çöktürmek için;

-600 µl hacmin 1/9 u olan µl hacmin 67 µl AcNa (3M, pH 7) ve

-600 µl hacmin %60’ı olan 360 µl İsopropil alkol, (-20 °C) eklenir.

-Çökmesi için an az 15 dk. -20 °C’de bekletilir.

-30 dakika 13.000 rpm’de 4 °C’de santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır.

-500 µl %70 lik Etanol (-20 °C’den) eklenir.

-Tekrar 10 dakika 13.000 rpm’de 4°C’de santrifüj edilir. Etanol dekante edilerek uzaklaştırıldıktan sonra, pelet 30°C’de konsantratörde etanolü tamamen uçana dek bekletilerek kurutulur.

-Daha sonra 50 µl mQ 'su ile resüspanse edilerek, -20°C’de muhafaza edilir.

2.5. Kültüre Etme Çalışmaları ve Kültüre Edilenlerin Tanımlanması

Örnekleme yapıldıktan sonra 24 ve 96 saat içinde hazırlanan sıvı ve katı kültür ortamlarına çevresel örneklerden ekimler yapılmıştır.

16.06.2020 tarihinde MGM ve Salinibacter (30°C ve 37°C),

19.06.2020 ‘de ise R2A ve Haloquadratum besiyerlerine ekimler yapılmıştır (30°C).

Tablo 2.1. Farklı tuzluluklardan alınan örneklerin geliştirildikleri besiyerleri

Tuzluluk	Geliştirildiği Katı Besiyeri	Geliştirildiği Sıvı Besiyeri
9	%12 MGM	
15	%12 MGM, %18 MGM	
19	%18 MGM, %18 R2A	
25	%23 MGM, %25 MGM, %23 R2A	% 25 MGM, Salinibacter Broth
33	%25 MGM, %23 MGM, Salinibacter DBC6, Haloquadratum walsby DSMZ, %23 R2A	% 25 MGM, Salinibacter Broth

2.5.1. Kullanılan besiyerleri ve içerikleri

2.5.1.1. %12 MGM (modifiye geliştirme medium)

%30'luk tuzlu su çözeltisi	400 mL
Distile su	567 mL
Pepton	1 g
Maya Özü	1 g

Yukarıdakiler, manyetik karıştırıcı kullanılarak, distile suda çözülür. pH, 1M Tris-Base kullanılarak 7,5'e ayarlanır. Hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra steril edilir (Dyall-Smith, 2009).

2.5.1.2. %18 MGM (modifiye geliştirme medium)

%30'luk tuzlu su çözeltisi...	600 mL
Distile su.....	367 mL
Pepton	1 g
Maya Özü.....	1 g

Yukarıdakiler, manyetik karıştırıcı kullanılarak, distile suda çözülür. pH, 1M Tris-Base kullanılarak 7,5'e ayarlanır. Hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra steril edilir dakika steril edilir (Dyall-Smith, 2009).

2.5.1.3. %23 MGM (modifiye geliştirme medium)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....	767 mL
Distile su.....	200 mL
Pepton.....	5 g
Yeast Ekstrakt.....	1 g

Yukarıdakiler manyetik karıştırıcı kullanılarak distile suda çözülür, pH'ı 1M Tris-Base ile 7,5'e ayarlanır. Katı besiyeri için 1 L ye 15 gr Bacteriologic Agar eklenir. Hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra steril edilir (Dyall-Smith, 2009).

2.5.1.4. %25 MGM (modifiye geliştirme medium)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....	833 mL
Distile su.....	134 mL
Pepton.....	5 g
Yeast Ekstrakt.....	1 g

Yukarıdakiler, manyetik karıştırıcı kullanılarak, distile suda çözülür. pH, 1M Tris-Base ile 7,5'e ayarlanır. Katı besiyeri için 1 L ye 15 gr Bacteriologic Agar eklenir. Hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra steril edilir (Dyall-Smith, 2009).

2.5.1.5. %30'luk tuzlu su çözeltisi

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

Yukarıdaki tüm bileşenler, manyetik karıştırıcı kullanılarak, çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base kullanılarak pH 7.5'e ayarlanır. Hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanır ve steril edilir (Dyall-Smith, 2009).

2.5.1.6. Luria Bertani (LB) besiyeri

NaCl.....	10 g
Yeast Extract.....	5 g
Trypton.....	10 g

Yukarıdakiler, manyetik karıştırıcı kullanılarak, distile suda çözülür, pH'ı 1M Tris-Base kullanılarak 7,5'e ayarlanır. Hacim, distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra steril edilir (Dyall-Smith, 2009).

2.5.1.7. %12 R2A sıvı besiyeri

Kazein asit hidrolizat	0.5 g
Maya özütü	0.5 g
Proteoz pepton.....	0.5 g
Üzüm şekeri	0.5 g
Nişasta	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
MgSO ₄	0.024 g
C ₃ H ₃ NaO ₃	0.3 g
NaCl.....	120 g

Yukarıdakiler, manyetik karıştırıcı kullanılarak, distile suda çözülür, pH'ı 1M Tris-Base kullanılarak 7,5'e ayarlanır. Hacim, distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra steril edilir (Reasoner and Geldreich 1985).

2.5.1.8. %18 R2A sıvı besiyeri

Kazein asit hidrolizat	0.5 g
Maya özütü	0.5 g
Proteoz pepton.....	0.5 g
Üzüm şekeri	0.5 g
Nişasta	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
MgSO ₄	0.024 g
C ₃ H ₃ NaO ₃	0.3 g
NaCl.....	180 g

Yukarıdakiler, manyetik karıştırıcı kullanılarak, distile suda çözülür, pH'ı 1M Tris-Base kullanılarak 7,5'e ayarlanır. Hacim, distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra steril edilir. (Reasoner and Geldreich, 1985).

2.5.1.9. %15 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).....	5 g
NaCl (Tekkim)	175 g

Ayrıca tüm tuzluluklardan alınan örnekler kendi tuzluluklarına yakın çeşitli tuzluluklardaki katı ve sıvı MGM besiyerlerine, ayrıca farklı katı ve sıvı seçici özellikte besiyerlerine ekilerek kültüre edilmiş, petrilere farklı morfoloji gösteren saf koloniler seçilmiştir.

Çeşitli yeni seçici kültür ortamları hazırlanarak, %25 ve %33 tuzlulukta havuzlardan, bu havuzlarda baskın şekilde görülen ve havuzun metabolik bileşiminin belirlenmesinde önemli rol oynayan ancak zor kültüre edilebilen mikroorganizmalar (metabolik çalışmalar için model organizmalar olarak kullanması hedeflenerek) kültüre edilmeye çalışılmıştır. Basitrasın içeren %25 MGM sıvı besiyerine ekilen %33 ve % 25 tuzluluk havuzu örneklerinin, sıvı kültüre yapılan ekimleri sonrasında, gelişimleri süresince mikroskopta gözlem yapılarak, morfolojik olarak kültüre edilmesi hedeflenen türlere benzer morfolojiler gösteren mikroorganizmalar saf kültür olarak geliştirilmeye çalışılmıştır.

Arke ve Bakteri izolatlarının 16S rRNA bölgesi amplifiye edilerek sonrasında jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

Tablo 2.2. *PZR ve Agaroz jel elektroforezi şartlar*

PZR prosedürü	Agaroz Jel Elektroforezi Prosedürü
4 mL (5x)Mmix	%1 Agaroz jel
0,5 mL 27F	2mL (20000X) Red safe /40mL
0,5 mL 1492R	1X TAE Tampon
1 mL template	1X TAE, 90 volt 40 dk.

PZR sıcaklık programı: 94°C (3 dk.) x1 // [94°C (30 sn,) - 50°C (1dk) - 72°C (2 dk.)] x 30 // 72 °C (10 dk.)x1; Toplam süre: 2s 18 dk.; Kapak sıcaklığı: 105°C

2.6. İzolatlardan Elde Edilen 16S rRNA Ürünlerinin Enzimatik Kesimi (ARDRA)

Elde edilen 16S rRNA amplifikasyon ürününden 10 µl civarında (kullanılan PCR ürünün jelde görüntülenerek belirlenen kalitesine bağlı olarak hacim arttırılıp azaltılarak) ve kullanılacak restriksiyon enzimi, uygun tamponu ve mQ su eklenerek son hacmi 20 µl'ye ayarlanacak şekilde reaksiyonlar kurularak, Termo cycler'da 37°C'de 18-24 saat

kesim için bekletilmiştir. *MboI*, *XbaI*, *SpeI* ve *Hinf I* restriksiyon enzimleri için kesim profilleri elde edilmiştir.

2% agaroz içeren, 20 mL 0.5X TBE tamponu için 2 µl (20000x) Red safe eklenerek oluşturulan jele, 15 µl enzim kesim reaksiyonu ürünü 5µl yükleme boyası ile karıştırarak yüklenmiş. Omega CL5000 DNA Marker ve Thermo 50 bp DNA ladder ise 5'er µl hacimde yüklenmiştir.

Jeller, 0.5X TBE tamponu içinde 2 saat 80 voltta, 2 saat 60 voltta olmak üzere 4 saat boyunca yürütüldükten sonra Syngene GBox Sistemi ile görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

Arke izolatlarının, *Hinf I* restriksiyon enzimi ile de kesim profilleri elde edilmiştir.

Her farklı enzim kesimi profilinden, mevcut olduğu durumda, iki temsilci seçilerek geri primer okumaları için dizilemeye gönderilmiştir.

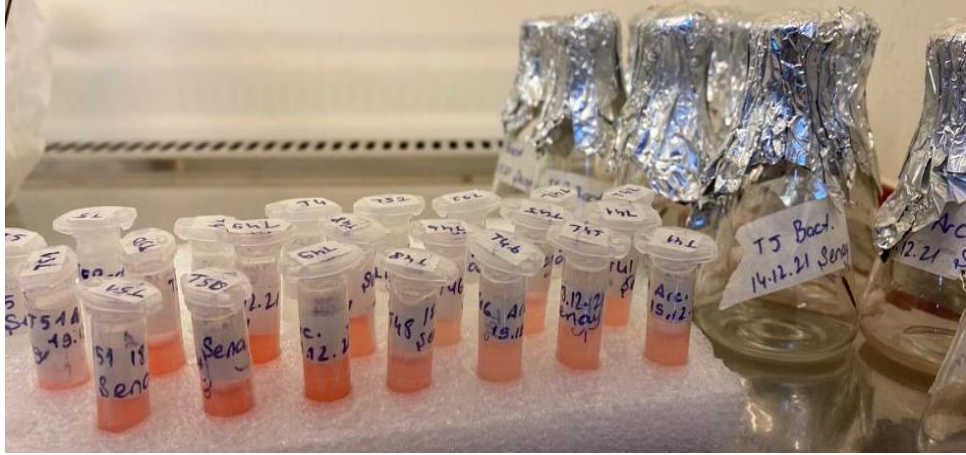
İzolatların 16S rRNA 1492r primer kullanılarak dizi analizleri için Ankara'da bulunan BM Labosis (BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti)'nden hizmet alınmıştır.

2.6.1. Dizi bilgisi elde edilen izolatların stok kültürlerinin hazırlanması

Dizi sonuçlarının değerlendirilmesi sonrasında izolatlar; düşük hacimde %23 MGM sıvı kültürlerde geliştirildikten sonra, -80°C de muhafaza edilmek üzere, %20'lik Gliserol ile stok kültürleri hazırlanmıştır (Bkz.Görsel 2.5 ve Görsel 2.6).



Görsel 2.5. Stok hazırlamak için geliştirilen sıvı besiyeri kültürleri



Görsel 2.6. %23 MGM sıvı besiyerinde geliştirilerek hazırlanan stok kültürleri

2.7. Cy3 İşaretli Oligonükleotid Probları ile Hibridizasyon ve Görüntüleme Çalışmaları (FISH)

%3 - %33 aralığında tüm tuzluluklar için Fiksasyon, Filtrasyon, Hibridizasyon DAPI ile boyama ve Epifloresan mikroskop ile görüntüleme çalışmaları yapılmıştır

-Fiksasyon: Havuzlardan alınan ve çok bekletilmeyen, taze 1 mL su örneğine 200 μ l %37'lik Formaldehit (Fluka) eklenmiş ve 4 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra su örneği 10 mL 1X steril PBS ile birleştirilmiş, elde edilen bu karışım 0.2 μ m por çaplı GTTP Isopore (Millipore) filtreden geçirilmiştir. Aynı filtreden bu kez filtreyi yıkamak için tekrar 1X 10 mL PBS geçirilmiş ve filtreleler iyice kurutulduktan sonra -20 °C'ye kaldırılarak hibridizasyon işlemine kadar -20 °C'de saklanmıştır (Antón vd., 1999).

-Hibridizasyon: Pasta dilimi şeklinde küçük parçalar formunda kesilerek, farklı özgün prob lar ile hibridize edilmek üzere işaretlemeleri yapılan her bir parça filtre üzerine, 18 μ l hibridizasyon tamponu ve 2 μ l de kullanılacak probdan eklenmiştir. Her bir prob 50 ng/ μ l konsantrasyonda kullanılmıştır. Hibridizasyon işlemi, 50 m'lik plastik tüpler içinde yapılmıştır. İçerisine, üzerinde filtre parçalarının bulunduğu lamalar, ve hibridizasyon tamponu emdirilmiş kağıtlar bulunan bu tüpler 2 saat boyunca 46 °C'de hibridizasyon fırında (Combi-H, FINEPCR, Precision, Ind. Co) inkübe edilmiştir.

Hibridizasyon işlemi sonrasında, yıkanmaları için, filtreler, 48°C'lik su banyosunda bulunan yıkama solusyonu içerisine alınarak 15 dakika bekletilmişlerdir. Bundan sonra

havada tamamen kurumaları için bekletildikten sonra filtreler DAPI boyaması için hazır hale getirilmiştir (Antón vd., 1999).

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan FISH problemlerinin dizi bilgisi

Prob adı	Prob özgüllüğü	Prob dizisi (5' →3')	Referans
ARC915	Archaea	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	(Amann vd., 1990)
EUB338	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	(Amann vd., 1990)
Non 338	Negatif kontrol	CTCCTACGGGAGGCAGC	(Amann vd., 1990)
EHB412	Salinibacter	TACGCCCCATAGGGGTGT	(Antón vd., 2000)

In-situ hibridizasyon tamponu

5M NaCl (Thermo Fisher)360 µl

1M Tris-HCl pH 8.0 (Thermo Fisher)40 µl

Formamide (Sigma).....700 µl /900 µl

Milli-Q su900 µl

%10 SDS2 µl

Hazırlanan tampon çalışma boyunca buz içerisinde tutulur.

Yıkama tamponu (FISH için)

1M Tris-HCl pH 8.0 (Thermo Fisher).....1 m

5M NaCl (Thermo Fisher)700 µl

0.5 M EDTA pH 8.0 (Thermo Fisher)500 µl

Hacim Milli-Q su ile 50 mL'ye tamamlanır.

Farklı tuzluluktaki tüm havuzlar için 1'er mL su örneği Formaldehit ile fikse edildikten sonra 10 mL %10 PBS ile seyreltilerek 25 mm filtre çapı ve 0,2 µm por çapı bulunan polikarbonat filtreden süzülerek hazırlanmıştır. FISH hibridizasyon prosedürü uygulanana dek -20°C de saklanmıştır.

Tüm havuz suları için iki set örneğe, örnekleme yapılır yapılmaz, hücrelerin örnekleme zamanındaki durumlarının korunması amaçlanarak hemen örnekleme bölgesinde fiksatif eklenmiş, laboratuvara getirildikten sonra ise filtre edilmiştir.

Üst iki tuzluluk için ayrıca örnekleme sırasında 24 saat geçmeden fiksasyon yapılmış ve bir gün sonra da filtrasyonları yapılmıştır.

Aşağıda filtre edilen farklı havuz sularında bulunan mikroorganizmaların görüntülenip belirlenebilmesi için kullanılan oligonükleotid problemleri ve kullanılan formaldehit miktarları tablo halinde verilmiştir (Bkz. Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Tuzluluğa karşılık kullanılan floresan işaretli oligonükleotid problemleri

Tuzluluk	Kullanılan Problemler	Formamid miktarları
33	Eub 338; Arc 915; EHB412	700 µl
25	Eub 338; Arc 915; EHB412, Non338	700 µl
19	Eub 338; Arc 915	700 µl; 900 µl
16	Eub 338; Arc 915	700 µl 900 µl
9	Eub 338	700 µl

Hücrelerin görüntülenerek fotoğraflanması için, Leica DM6000B Epifloresan mikroskobu kullanılmıştır.

2.8. Örneklerin Total DNA'ları Kullanılarak DGGE PCR Kurulması ve Ürünlerin Denatüre Edici Gradyent Jel Elektroforezi

2.8.1. 16S rRNA geninin DGGE analizi için amplifikasyonu

Total havuz DNA'ları template olarak kullanılarak DGGE PCR kurulmasını işlemi için bakteri ve arke PCR için 341F ve 344F GC takısız ileri primer ve 907 R-GC takılı geri primerler kullanılarak 16S rRNA'nın yaklaşık 550 baz çiftinden meydana gelen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu kurularak DGGE için yeterli miktarda DNA elde edene dek çoğaltılmıştır.

Tablo 2.5. DGGE PCR ları için kullanılan primerler

Primer adı	Primer özgülüğü	Primer dizisi (5' →3')	Referans
21F	Archaea	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA	(DeLong, 1992)
27F	Bacteria	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	(Lane vd., 1985)
1492R	Evrensel	GGTTACCTTGTTACGACTT	(Lane, 1991)
344F	Archaea	ACGGGGCGCAGCAGGCGCGA	(Schäfer vd., 2001)
341F	Bacteria	CCTACGGGAGGCAGCAG	(Muyzer vd., 1993)
907 R-GC	Bacteria	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	(Muyzer vd., 1993)

Bakteri 16S rRNA'lar için amplifikasyon reaksiyonları aşağıdaki şartlarda gerçekleştirilmiştir;

İlk Döngü

94 °C

5 dakika

65 °C

1 dakika

72 °C

3 dakika

9 Döngü (Her döngüde primer bağlanma sıcaklığı 1 °C azaltılarak)

94 °C

1 dakika

64 °C (63, 62, 61,...55 °C'e kadar)

1 dakika

72 °C

3 dakika

20 Döngü

94 °C

1 dakika

55 °C

1 dakika

72 °C

3 dakika

Son Döngü

94 °C

1 dakika

55 °C

1 dakika

72 °C

10 dakika

4 °C

Süresiz

Archaea 16S rRNA'lar için amplifikasyon reaksiyonları ise aşağıdaki şartlarda gerçekleştirilmiştir.

94 °C

5 dakika

29 Döngü

94 °C

30 saniye

56 °C

45 saniye

72 °C

2 dakika

1 Döngü

94 °C

30 saniye

56 °C

45 saniye

72 °C

7 dakika

4 °C

Süresiz

%9 tuzluluk için sadece bakteri PCR kurulurken, diğer 4 tuzluluk için hem Arkelere uygun ileri primer hem Bakterilere özgü ileri primer kullanılarak DGGE PCR kurulmuştur. Elde edilen DNA miktarı belirlenerek %9-%33 aralığındaki 5 tuzluluk için, artan tuzluluk ve bakteri arke ardışık sıralaması ile yüklenen PCR ürünlerinin miktarları belirlenmiştir.

DGGE tankı hazırlanan 17 lt 1X TAE ile doldurulmuştur.

DGGE Tampon stok çözeltileri hazırlanmıştır. (50mL)

%80'lik DGGE Stok Solusyonu

Üre.....13.45 g

Deiyonize Formamid.....12.8 mL

Akrilamid/Bisakrilamid (%30).....8 mL

TAE (20X).....2 mL

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

%0'lık DGGE Stok Solusyonu

Akrilamid/Bisakrilamid (%30).....8 mL

TAE (20X).....2 mL

mQ su ile 30 mL'ye tamamlanmış. Buzdolabında 4 °C'de saklanmıştır (Muyzer, 1996).

2.8.2. DGGE-I şartları

Yukarıda verilen tampon stok solüsyonları kullanılarak %40-%70 aralığında denatüre edici gradyenti oluşturularak, jelde artan konsantrasyonda üre ve formamid gradienti oluşturulmuştur. Polimerize edici ajanlar da eklenmiş ve jelin üst kısmına kuyucukların oluşumu için tarak da yerleştirildikten sonra polimerizasyon için en az 4 saat bekletilmiştir. Elektroforez işlemine başlamadan önce tarak çıkarılarak oluşturulan kuyucuklara 20 µl örnek, 5 µl jel yükleme boyası ile karıştırılarak yüklenmiş ve tanktaki tamponun sıcaklığı 60°C'ye ulaştığında sisteme 5 V/cm akım 1 gece boyunca uygulanmıştır. Her kuyucuğa tolpadma 400 ng örnek yüklenmesi sağlanarak ve 2 saat süre boyunca önce 80 Volt ve daha sonra da 22 saat boyunca 120 Volt voltaj uygulanarak yürütülmüştür.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel dikkatlice bulunduğu cam plakalar arasından çıkartılarak yıkanmak üzere etidyum bromür solusyonu (1 µg/mL) bulunan küvete alınmıştır. Önce burada bir saat boyunca boyandıktan sonra bu kez de 1X TAE içeren küvete alınarak yine bir saat boyunca yıkanmış ve daha sonra transilluminatörde UV ışığı ile gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Jelde UV ışığı altında gözlenen farklı konumlardaki ayrı bantlar, steril bisturi yardımıyla kesilmiş ve jelden kesilen bu bantlar steril ependorf tüpler içine alınmıştır. Tgüplere yine steril 20 µl mQ su eklenmiş ve bir gece boyunca 4 °C’de bekletilmiştir. Bu inkübasyon sonrası mQ su’ya elut edilmiş olan DNA, DGGE primerleri ile tekrar amplifiye edilmesi için kalıp olarak kullanılmıştır. Elde edilen PCR reaksiyon ürünleri de dizilemeye gönderilmiştir (Sogin vd., 2019; Muyzer vd. 1996).

2.8.3. DGGE-II şartları

Bu ikinci jelde %30-%60 aralığında denatüre edici gradyenti oluşturularak, jelin artan konsantrasyonda üre ve formamid gradientine sahip olması sağlanmıştır. 500 ng örnek yüklenerek 2 saat boyunca 80 Volt ve 22 saat boyunca 120 Volt voltaj uygulanarak ikinci bir jel elde edilmiştir (Green vd., 2010).

DGGE PCR ürünlerinin kontrolleri için hazırlanan %0.8 Agaroz jel ve 1X TBE tamponu içinde 80 voltta, 25 dk. Yürütülerek, Syngene GBox Sistemi ile görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

Her iki jel de görüntüledikten sonra görülebilen bantlar UV ışık altında kesilmiş ve bu kez GC takısız olan primerler kullanılarak, jelden elde edilen bantların tekrar PCR ile çoğaltılması denenmiştir.

İkinci DGGE sonrasında jelden kesilen 19 banttan 12’si template olarak kullanılarak elde edilen PCR reaksiyon ürünleri dizilemeye gönderilmek üzere yeterli miktarda çoğaltılabilmektedir.

2.8.4. DGGE bantlarının dizi analizi

Önceki dönemde elde edilen ve jelden kesilerek tekrar bakteri ve arkelere özgü primerler kullanılarak, PZR ile çoğaltılan DGGE bantları agaroz jel elektroforezi ile tekrar kontrol edildikten sonra dizi analizi için BMLabosis’e gönderilmiştir.

2.9. Metabolomik Analiz için Örnek Hazırlama ve Analizi

Her örnekten 1'er mL, 2 mL' lik santrifüj tüpüne aktarılarak konsantratör'de 8 saat boyunca kurutulmuştur.

Türevlendirme basamakları, yöntem modifiye edilerek azaltılmıştır.

Konsantre/liyofilize etme işlemleri sonrasında elde edilen katı materyalden 0.1 g tartılmıştır.

Bunun üzerine 250 µL BSTFA eklenerek,

10 dk ultrasonik banyoda tutulmuştur,

Vorteks edildikten sonra ise,

30 dk. 37°C ve 1350 rpm'de türevlenmeye bırakılmıştır.

Türevlenme sonrasında, 10 dk. daha ultrasonik banyoda tutulduktan sonra,

Santrifüj tüpüne aktarılarak 2 dk. 21.1g de santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası üst fazdan alınan 100 µl'lik kısım GC/MS analizi için vialle aktarılarak analiz edilmiştir. (Sogin vd., 2019).

2.9.1. Gaz kromatografisi (GC) analiz şartları

Analizlerden, birinci set analizler AUBİBAM'da bulunan GC/MS ve GC FID sistemlerini bir arada bulunduğu Gaz Kromatografi Sistemi Kullanılmıştır.

Sistem: Agilent 7890B GC System

Kolon: Agilent HP-5MS (30 m x 0.25 mm iç çap x 0.25 µm film kalınlığı)

Dedektör: Alev İyonlaşma Dedektörü (FID)

Enjeksiyon sıcaklığı: 300°C

Dedektör sıcaklığı: 360°C

Sıcaklık programı: 60°C, 20°C/dk. 315°C (5,25 dk), Toplam 18 dk

Taşıyıcı gaz: Helyum (1mL/dk)

2.9.2. Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) şartları I

Sistem: Agilent 7890B GC 5977B Mass Selective Dedector System

Kolon: Agilent HP-5MS (30 m, 0.25 mm iç çap, 0.25 µm film kalınlığı)

Enjeksiyon sıcaklığı: 300°C

İyon kaynağı sıcaklığı: 230°C

İyonizasyon modu: EI

Elektron enerjisi: 70 ev

Kütle aralığı: 35-600 m/z

Sıcaklık programı: 60°C, 20°C/dk. 315°C (5,25 dk), Toplam 18 dk

Taşıyıcı gaz: Helyum (1 mL/dk)

Tanımlamalar: Wiley 9-Nist 11 Mass Spectral Databas

1 µL örnek splitsiz olarak sisteme enjekte edilmiştir.

Bileşenlerin tanımlanması için Gaz Kromatografisi/KütleSpektrometresi, bağlı yüzdelere belirlenmesi için ise Gaz Kromatografisi kullanılmıştır.

2.9.3. GC/MS ile ekstraselüler metabolit analizleri:

Sıvı besiyerinde geliştirilen bazı arke ve bakteri izolatlarının iki farklı türevlendirme yöntemi sonrası GC/MS gaz kromatografisi kütle spektrometresi ile ekstraselüler metabolit analizler için; seçilen bazı karışık ve saf kültürlerden alınan; 2'şer mL sıvı kültür örnekleri ve besiyeri örnekleri 10 dakika 21.1 xg ve +4°C'de santrifüj edildikten sonra, süpernatant hemen alınmış ve örnek hazırlama aşamasına kadar -20°C 'de saklanmıştır.

Bu işlem %33 tuzluluktan elde edilen eski karışık kültür örneğine, 33-5 kodlu *Halorubrum lypoliticum* ve 32H kodlu *Halomonas fontilapidosi* sıvı kültürleri için. Ayrıca 0-6-24-36-72 saatlik *Halomonas fontilapidosi* kültürleri için de uygulanmıştır.

Konsantre etme öncesinde iç standart olarak Ribitol (0.2 mM) ve Colestane (100mM) eklenmiştir.

Her örnekten 0.5'er mL örnek 1,5-2 mL' lik santrifüj tüpüne aktararak konsantratör'de 4 saat boyunca kurutulduktan sonra türevlendirme aşamaları uygulanmıştır.

2.9.4. Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) şartları II

Eskişehir Teknik Üniversitesi Kimya Bölümünde yer alan GC/MS sistemi ile ikinci set analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu sistemle aynı konfigürasyona sahip Eczacılık Fakültesinde bulunan aynı GC/MS sistemi ile analizlere devam edilmiştir.

Sistem: SHIMADZU-GC-2010 Plus Gaz Kromatogram sistemi

Kolon1: Rtx-5MS (30 m x0.25 mm 0,0.25 µm film kalınlığı)

Kolon 2: CP-Sil 5 CB (25 m x0.25 mm 0,0.25 µm filmkalınlığı)

Enjeksiyon sıcaklığı: 380°C

İyon kaynağı sıcaklığı: 220°C

İyonizasyon modu: EI
Elektron enerjisi: 70 ev
Kütle aralığı: 35-650 m/z
Sıcaklık programı: 60°C, 20°C/dk. 315°C (14 dk), Toplam 26 dk
Taşıyıcı gaz: Helyum (1 mL/dk)
Enjeksiyon hacmi: 1 µL
Örnekler değişken split oranlarında sisteme enjekte edilmiştir.

2.9.5. İzolatların hücre dışı, hücre içi çözünen ve hücresel çözünmeyen metabolitlerinin analizi

Seçilen 5 Arke (*Halobacterium salinarum* ve 4 farklı *Halorubrum* türü) %25 MGM sıvı besiyerlerinde geliştirilmiş ve iki farklı zamanda örnekleme yapılarak, her bir ayrı zaman örneklemesinden 3 farklı fraksiyon olacak şekilde ekstraksiyon yapılarak, Hücre dışı-Hücresel çözünen ve Hücresel çözünmeyen fraksiyonları ekstre edilerek hazırlanmış ve -20°C ye kaldırılarak saklanmıştır.

2.9.5.1. Metabolit ekstraksiyonu:

2 mL hücre süspansiyonu alınarak, 2 dakika 16.000 g'de +4°C'de santrifüj edilmiştir.

Süpernatant ayrılarak üzerine 100 µl %98'lik Formik asit ilave edildikten sonra hemen -20°C'ye kaldırılmıştır (hücre dışı fraksiyon).

Kalan pellet üzerine 1 mL MQ su ilave edilerek sonikasyon işlemi sonrası berrak lizat oluşturulmuştur.

Lizat üzerine 50 µl %98'lik Formik asit ilavesi sonrası agregatler oluşturulmuştur.

Oluşan agregatlar çözünen fraksiyondan santrifüj işlemi ile ayrılmıştır (2 dakika 16.000 g ve +4°C'de).

Berrak süpernatant hemen -20°C 'ye kaldırılmıştır (hücresel çözünen fraksiyon).

Santrifüj sonrası kalan çözünmeyen pellet 500 µl Metanol eklenerek -20°C'ye kaldırılmıştır (hücresel çözünmeyen fraksiyon).

2.9.5.2. Liyofilizasyon ve BSTFA ile türevlendirme:

Halobacterium salinarum için oluşturulan bu 3 farklı fraksiyon -20°C ‘den, soğuk zincir bozulmadan alınarak liyofilize edilmiştir. (-85°C sıcaklık ve 1.03 mBar ve vakum altında).

Hücrel çözünmeyen fraksiyonun Metanol fazı, liyofilizasyon işlemi öncesinde Azot gazı altında uzaklaştırılmış, -85°C ‘de dondurulduktan sonra liyofilizasyon işlemine alınmıştır.

Kurutma sonrası bu üç fraksiyon, BSTFA kullanılarak, çevresel havuz örneklerine uygulanan türevlendirme yöntemi ile türevlendirildikten sonra ESTÜ Fen Fakültesinde bulunan GC/MS sistemi ile analiz edilmiştir.

2.9.5.3 *Idiomarina* sıvı kültürlerinin ekstrasellüler ve intraselüler metabolitlerinin analizi

MM63 minimal besiyerinde C kaynağı olarak gliserol kullanılarak geliştirilen *Idiomarina* kültürü 16. ve 96. saatlik sıvı kültürlerinin ekstrasellüler metabolitleri ve intraselüler metabolitlerinin ekstraksiyonu için; 2.9.5.1. Metabolit Ekstraksiyonu başlığında verilen ekstraksiyon metodu uygulanmıştır. Bu veri setinde santifüj sonrası hücrel çözünmeyen kısım elde edilmediği için Hücre Dışı ve Hücre İçi Fraksiyonları olacak şekilde iki set hazırlanmıştır.

2.9.5.2. Liyofizasyon ve BSTFA ile Türevlendirme başlığında verilen işlemler bu analiz seti için de uygulanmış ancak Hücrel Fraksiyonlar için pellet miktarı yetersiz olduğu için işleme Hücrel Çözünmeyen Fraksiyonu ayrılmadan devam edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Örnekleme Alanı ile İlgili İzlenimler

İşletme yönetiminin yönlendirmesi ile ulaşılan, istenen aralıkta farklı tuzluluklara sahip havuzların, %4 tuzlulukta görülen mavi-yeşil su renginin, tuzluluk oranı %19'a ulaştığında turuncu pigmentasyon göstermeye başladığı, tuzluluk %33'e ulaştığında ise pembe kırmızı tonda renklenme oluştuğu gözlenmiştir.

3.1.1. Örnekleme yapılan havuzlarının koordinatları, tuzluluk ve pH değerleri

Örnek alma bölgesinde el refraktometresi ile ölçülen tuzluluk ve laboratuvarıda ölçülen pH değerleri verilmiştir (Bkz. Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Örnekleme yapılan havuzların tuzluluk, pH değerleri ve koordinatları

Tuzluluk	pH	Kordinat
4	8.23	38°31'54.9"N 26°53'41.1"E
9	7.92	38°29'15.2"N 26°55'37.5"E
15	7.70	38°27'12.7"N 26°56'05.7"E
19	7.78	38°29'11.3"N 26°55'22.1"E
25	7.61	38°29'10.8"N 26°55'20.9"E
33	7.38	38°29'19.1"N 26°56'39.0"E

Tablodaki değerler incelendiğinde, tuzluluk artışı ile birlikte pH değerinin düştüğü görülmektedir.

3.2. Örneklerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Havuzulardan alınan örneklerin önce yukarıda belirtilen tuzluluk ve pH'ları ölçülerek belirlendikten sonra, ayrıca elementel bileşimleri, iyonik bileşimleri, iki farklı kurutma yöntemi sonrası elde edilen katı madde miktarları ve yoğunlukları da belirlenmiştir

3.2.1. Farklı tuzluluktaki örneklerin elementel bileşimleri

Çevresel tuzla havuz örneklerinin elementel bileşimleri aşağıdaki şekilde belirlenmiştir (Bkz. Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Çevresel örneklerin ICP ile belirlenen elementel bileşimleri

Tuzluluk	Element (ppm) (mg/L)				Toplam
	Mg	Ca	Na	K	
9	1644	521	10145	621	12931 ppm (15,8 g/L)
15	8738	852	23800	3674	37064 ppm (37,1g/L)
19	11500	827	47875	5100	65302 ppm (65,3g/L)
25	11800	374	69175	5766	87115 ppm (87,1 g/L)
33	19800	165	71625	8408	99998 ppm (100,0 g/L)

Çevresel örneklerden total DNA izolasyonu için santrifüj işlemi uygulandıktan sonra biriktirilen süpernatantlarda belirlenen elementel bileşimler verilmiştir (Bkz. Tablo 3.3).

Tablo 3.3. DNA ekstraksiyonu için santrifüj sonrası süpernatantların ICP ile belirlenen elementel bileşimleri

Tuzluluk	Element (ppm) (mg/L)				Toplam
	Mg	Ca	Na	K	
15	25984	307	55311	7410	89012 ppm (89,0 g/L)
19	16576	556	57020	4812	78964 ppm (78,9 g/L)
25	12254	807	30745	3609	47415 ppm (47,4 g/L)
33	25984	307	55311	7410	89012 ppm (89,0 g/L)

3.2.2. Farklı tuzluluktaki örneklerin iyonik bileşimleri

Tablo 3.4. Farklı tuzluluktaki örneğin iyon kromatografisi ile belirlenen iyonik bileşimleri

Tuzluluk	pH	İyon (ppm)		
		Cl ⁻	Br ⁻	SO ₄ ⁻²
9	7,92	62,704	1,323	9,049
15	7,70	86,463	1,521	14,758
19	7,78	156,582	1,738	20,482
25	7,61	156,582	1,738	20,482
33	7,38	165,327	1,360	27,670

3.3. Örneklerden Elde Edilen Katı Madde Miktarları ve Örneklerin Yoğunlukları

Konsantratörde kurutma işlemi uygulaması sonrasında örneklerin hesaplanan bağlı yoğunlukları, katı madde miktarları ve ağırlıkça yüzde katı madde miktarları verilmiştir (Bkz. Tablo 3.5).

Tablo 3.5. *Konsantre edilen örneklerin, katı madde miktarları ve yoğunlukları*

Tuzluluk	1mL Örnek Ağırlığı (mg)	Bağıl yoğunluk	Katı ağırlığı (mg)	Ağırlıkça %
9	1,0721	1,0761	122,4	11,42
15	1,1268	1,1310	230,1	20,42
19	1,1593	1,1636	269,3	23,23
25	1,2107	1,2152	398,1	32,88
33	1,2549	1,2596	465,7	37,11

Liyofilizasyon işlemi sonrasında örneklerin hesaplanan bağıl yoğunlukları, katı madde miktarları ve ağırlıkça yüzde katı madde miktarları verilmiştir (Bkz. Tablo 3.6).

Tablo 3.6. *Liyofilize edilen örneklerin, katı madde miktarları ve yoğunlukları*

Tuzluluk	1mL Örnek Ağırlığı (mg)	Bağıl yoğunluk	Katı ağırlığı (mg)	Ağırlıkça %
9	1,0561	1,0600	110,5	10,46
16	1,1162	1,1203	147,9	13,25
19	1,1366	1,1408	110,3	9,70
26	1,2373	1,2419	173,2	14,00
33	1,2208	1,2253	231,1	18,93

Metabolit analizi için örnek hazırlama aşamalarından biri olan su örneğini konsantre etme işlemi hem konsantratör hem de liyofilizatör kullanılarak uygulanmıştır (Sogin, vd., 2019).

İspanya'nın Güneybatı kıyısından kristalizasyon havuzlarından %33,2 tuzluluktan alınan su örneğinin yoğunluğu 1,212 g/mL. Örneğin kimyasal bileşimi de: CaSO₄ 1.40 (g/L); MgSO₄ 23.06 (g/L); MgCl₂ 34.08(g/L); NaCl 265.38(g/L); KCl 7.51(g/L); ve NaBr 0.84 (g/L) olarak belirtilmiştir. Toplam tuzluluk da 332.30 g/L olarak verilmiştir (Gómez-Villegas vd., 2018).

Ayvalık tuzlasında yapılan çalışmada ise örneklerin tuzlulukları belirtilmemiş olsa da; Cl⁻ 25-205 g/L aralığında; Br⁻ ise 0,4 -1,2 g/L aralığında belirlenmiştir. Sonuçlar bizim iyon okuma sonuçlarımız ile uyumludur. Bizim okuma yapamadığımız: Nitrat 0,3-1,2 g/L; Fosfat 10-60 g/L aralığında, Florür ise 0-0.2g/L aralığında belirlenmiş. Tek bir örnekte okunabilen 0,8 g/L Sülfat dışında Sülfat ve Nitrit tayin edilememiştir. ICP-OES analiz sonuçlarında ise Mg 3,3 -23,9 g/L aralığı ile bizim sonuçlarımız ile uyumlu iken, Na 1,2-12,9 g/L aralığı ile oldukça düşük, Ca ise 0,3-10,4 g/L ile oldukça yüksek okunmuştur (Yılmaz, 2019).

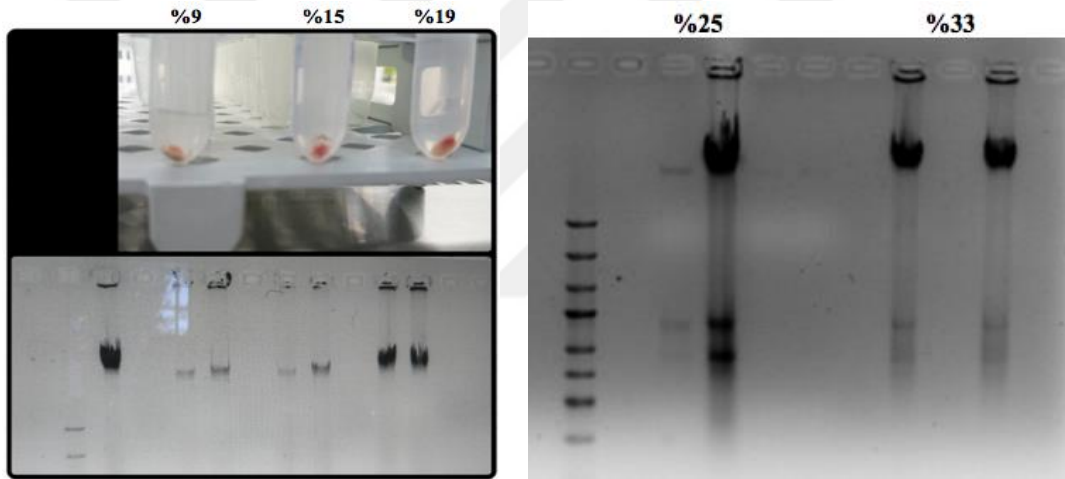
%15 tuzluluk NŞ örneği için miktarları belirlenebilen element ve iyonların ICP

ve IC okuma sonuçları toplanırsa: Na, Ca, Mg ve K elementlerinin toplamı 37,1 g/L'dir. Cl⁻, Br⁻ ve SO₄²⁻ iyonlarının toplamı da 100 g/L olmaktadır. Bu durumda toplam 1 mL %15 tuzluluk NŞ örneği için 137,1 g/L 'lik miktar ICP ve IC okumaları sonrasında belirlenebilmiştir.

Liyofilizasyon sonrasında elde edilen katı madde miktarı ise 147.9 g/L olarak belirlenmişti. Element ve iyonların tümü belirlenememiş olsa da, bu yaklaşımla tuzların büyük kısmının belirlenmiş olduğu görülmektedir.

3.4. Total DNA Ekstraksiyonu ve Metagenomik Çalışmalar İçin Örnek Hazırlama

Değişken tuzluluklardaki havuz sularından ekstre edilen total DNA'lar jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Bkz. Görsel 3.1).



Görsel 3.1. Çevresel örnek DNA'sı ve jelde görüntülenmesi

Yüksek tuzluluktaki %33 %25 ve %19 tuzluluktaki örneklerden ikışer set 24 x 2 mL den santifüj ile yüksek miktarda pellet elde edilmiştir.

Oda şartlarında beklemiş olan (2 ay kadar) %3 ve %9 tuzluluk örneklerinden elde edilen pellet ile -20°C'de muhafaza edilmiş olan örneklerden elde edilmiş olan arasında önemli ölçüde farklılık gözlenmiştir. Özellikle %9 tuzluluğa sahip -20°C 'de saklanmış olan örnekte, az da olsa pigmentasyon görülmüş ve DNA ekstraksiyonuna yetebilecek kadar pellet elde edebilmiş iken, aynı işlem oda şartlarında beklemiş olan %9 tuzluluktaki örneğe iki kez uygulanmasına rağmen, pigmentasyon gözlemlenmemiş ve DNA ekstre edilememiştir.

3.5. Kültüre Etme Çalışmaları ve İzolatların Seçimi

3.5.1. Çeşitli sıvı ve katı besiyerlerine yapılan ekimler ve izolasyonlar

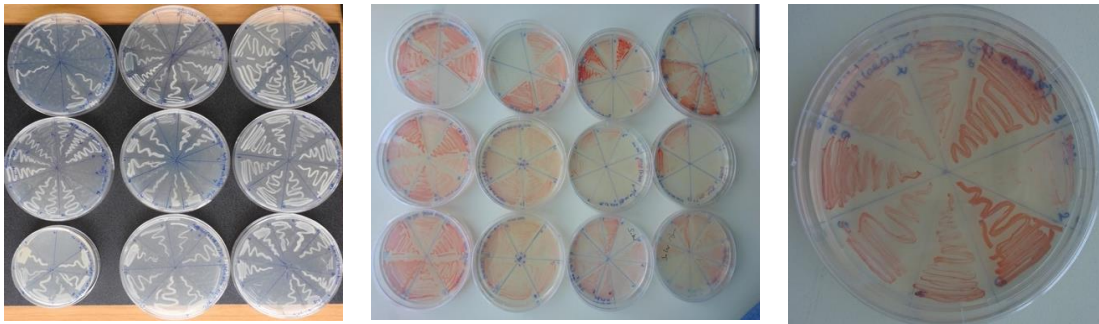
Değişken tuzluluklardaki havuz sularından alınarak getirilen taze su örnekleri, uygun tuzluluğa sahip katı besiyerlerine ekilerek, iki farklı sıcaklıkta (30°C ve 37°C) inkübasyona bırakılmış ve petrilerdeki koloni oluşturan birimler sayılmıştır. Aşağıdaki tabloda dört ayrı tuzlulukta sayım yapılabilen örnekler ve mililitredeki koloni oluşturabilen birim sayıları verilmiştir (Bkz. Tablo 3.7).

Bu gelişim gözlenen petrilerden farklı morfolojideki koloniler seçilerek tekrar ilgili tuzlulukta katı besiyerine aktarılmış ve bunlardan gelişim gösteren saf koloniler takip eden çalışmalarda kullanılmak üzere izole edilmiştir.

Tablo 3.7. Kültüre etme sonrası koloni sayımı yapılabilen petriler

Tuzluluk	Besiyeri	30°C 72 saat kob/mL	37°C 72 saat kob/mL	37°C 120 saat kob/mL
% 9	%12 MGM	4,8 x 10 ³	-	-
% 15	%12 MGM	4,8 x 10 ³	10 x 10 ³	12 x 10 ³
% 19	%18 MGM	3,1 x 10 ³		
% 25	% 23 MGM			9,6 x 10 ³
	% 25 MGM	-	-	3,0 x 10 ³
%33	% 23 MGM	-	-	-
	% 25 MGM	-	-	-

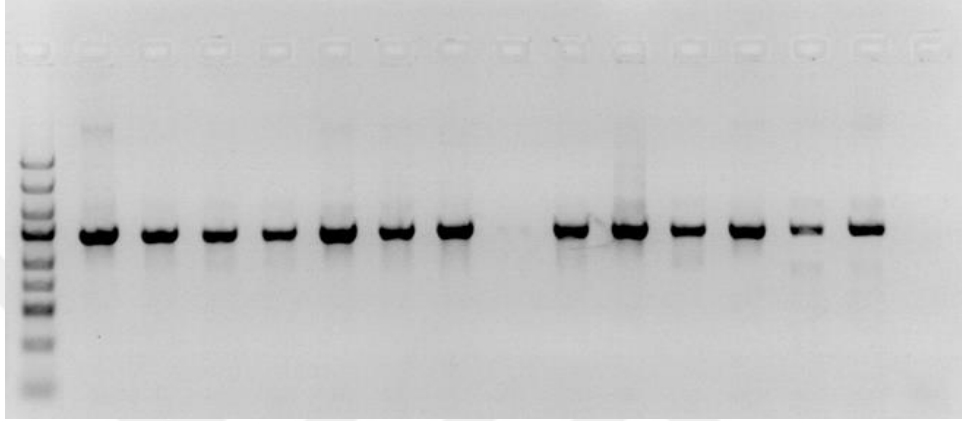
Farklı tuzluluklardan alınan örnekler kendi tuzluluklarına yakın çeşitli tuzluluklardaki katı ve sıvı MGM besiyerlerine, ayrıca farklı katı ve sıvı seçici özellikte besiyerlerine ekilerek kültüre edilmiş petrilerde farklı pigmentasyon ve morfoloji gösteren saf koloniler görülmektedir (Bkz. Görsel 3.2).



Görsel 3.2. Değişken tuzluluk havuzlarından elde edilen bakteri ve arke izolatları

3.5.2. Arke ve bakteri izolatlarından DNA ekstraksiyonu ve 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılması

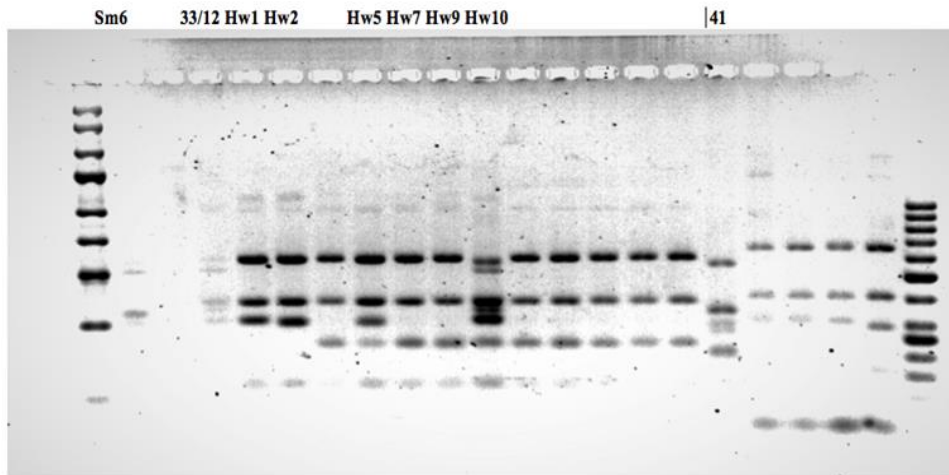
Tüm arke ve bakteri izolatlarının genomik DNA'ları elde edildikten sonra 16S rRNA bölgesi amplifiye edilerek jel elektroforezi ile kontrolleri yapılmıştır, Görsel 3.3. bunlara örnek olarak verilmiştir.



Görsel 3.3. 16S rRNA bölgesinin amplifiye edilen örneklerin jel görüntüleri

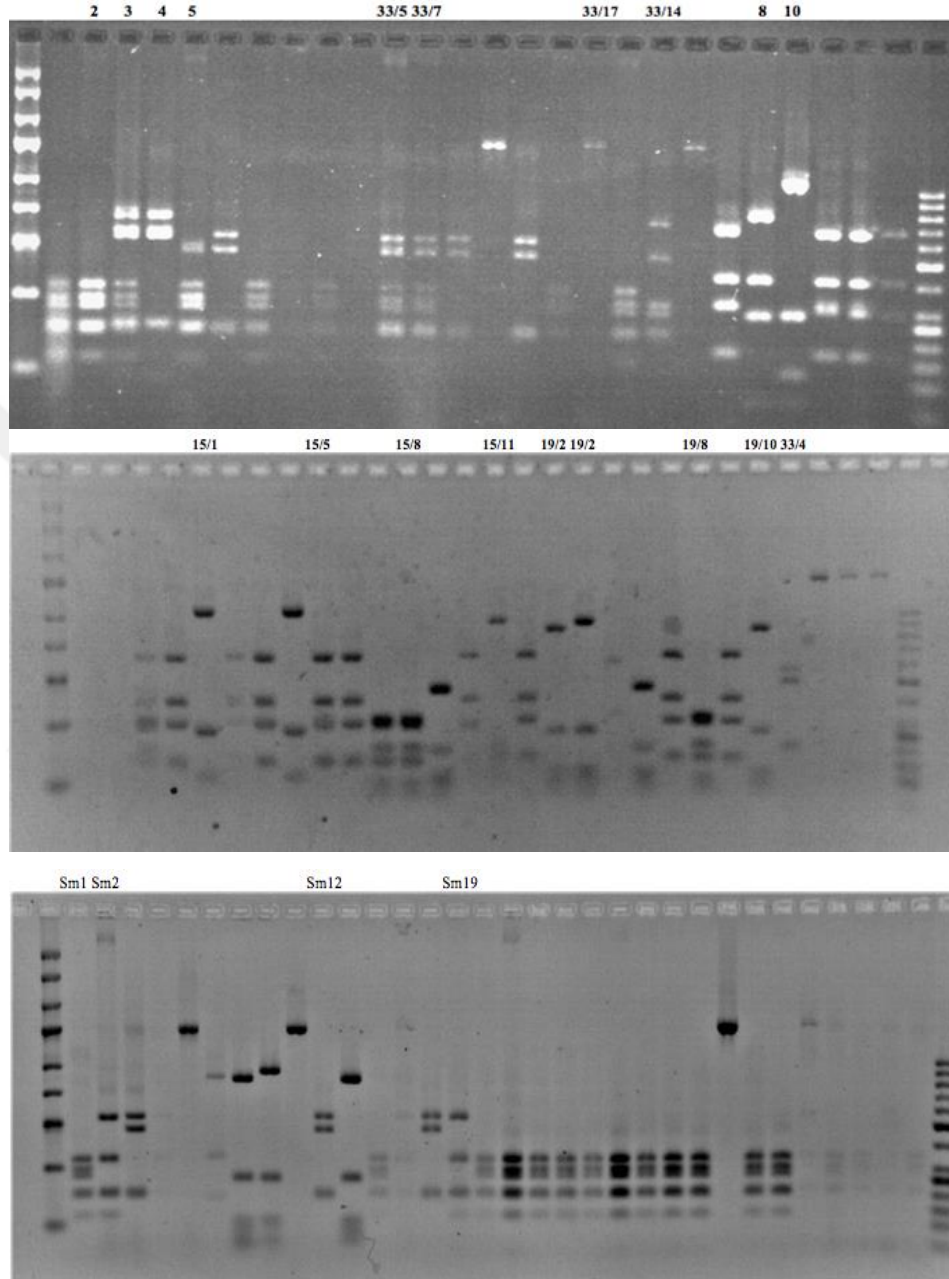
3.6. İzolatlardan PCR Sonrası Elde Edilen 16S rRNA Ürünlerinin Enzimatik Kesimi (ARDRA) Sonuçları

Arke izolatlarının Hinf I restriksiyon enzimi ile elde edilen kesim profilleri (Bkz. Görsel 3.4).

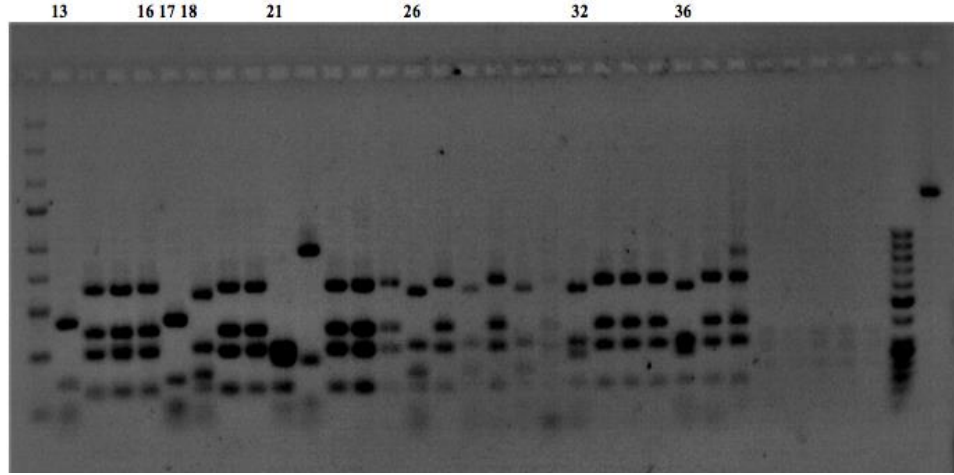


Görsel 3.4. Arke izolatlarının HinfI restriksiyon enzimi ile elde edilen kesim profilleri

İzolatların *MboI* *XbaI* ve *SpeI* restriksiyon enzimleri ile elde edilen kesim profilleri (Bkz. Görsel 3.5 ve Görsel 3.6).



Görsel 3.5. *MboI* enzimi ile elde edilen kesim profilleri



Görsel 3.6. *XbaI*, *SpeI* ve *MboI* enzimleri ile elde edilen kesim profilleri.

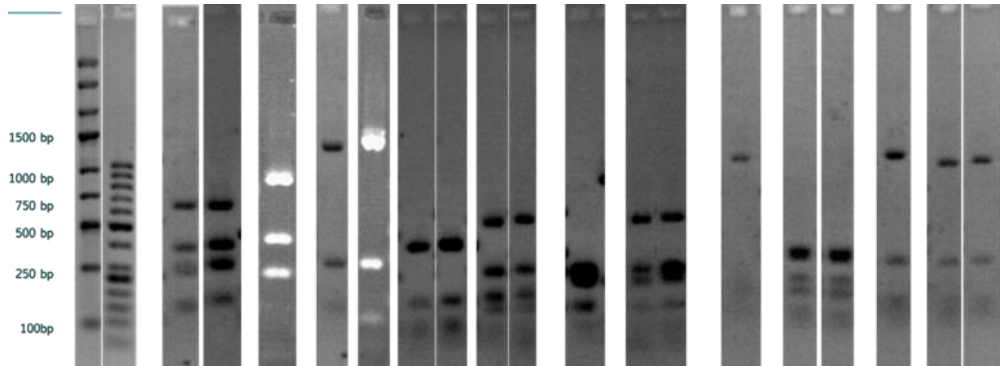
Jellerde görülen kesim profilleri üzerinde verilen kodlar, dizilemeye gönderilmek üzere seçilen izolatları belirtmektedir.

Haloquadratum walsbyi besiyerinde gelişen kolonilerden seçilen arke izolatları kullanılmıştır. *XbaI*, *SpeI* enzimleri ile kesim başarılı olmamıştır.

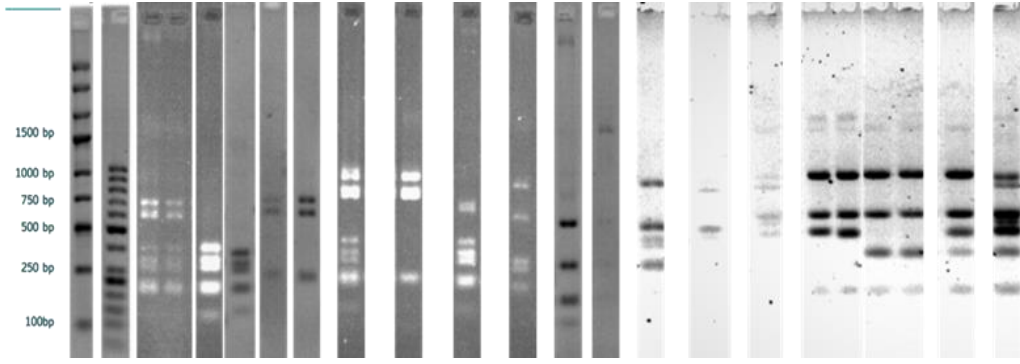
Arke izolatlarının, *Hinf I* restriksiyon enzimi ile de kesim profilleri elde edilmiştir.

Her farklı enzim kesimi profilinden, mevcut olduğu durumda, iki temsilci seçilerek geri primer okumaları için dizilemeye gönderilmiştir.

Restriksiyon enzimleri ile kesimler sonucunda; Bakteriler için 11 farklı, Arkeler için ise 15 farklı kesim profili elde edilmiştir. Elde edilen kesim profilleri şekillerde verilmiştir (Bkz. Görsel 3.7 ve Görsel 3.8).



Görsel 3.7. *ARDRA* ile bakteri izolatları için belirlenen 11 farklı kesim profili



Görsel 3.8. ARDRA ile arke izolatları için belirlenen 15 farklı kesim profili

Elde edilen her bir farklı kesim profilinden mevcut olduğu durumda iki ayrı izolat için 16S rRNA'ları PCR ile çoğaltılan izolatların 1492r primer kullanılarak dizi analizleri için Ankara'da bulunan BM Labosis (BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti)'nden hizmet alınmıştır.

21 arke izolatından 14'ü *Halorubrum* cinsine ait olarak bulunmuştur. Bu 14'ünün içinden 10 örnek, aynı enzim kesim profilini veren 5 farklı kesim için dizilemeye gönderilen duplike örneklerdir. Mbo I enzimi ile aynı enzim kesim profilini vermiş olan arkelerin hepsi için Hinf I enzimi ile kesim yapılmamıştır.

3.6.1. Tanımlanan bakteri ve arke izolatları

Geri primer okumaları sonucunda firma tarafından sonuç olarak gönderilen .ab1 datası, MEGA7 programı kullanılarak incelenmiş, kısaltılarak .fasta formatına dönüştürülmüştür.

Elde edilen bu kısmi rRNA nükleotid dizileri NCBI'nın BLAST programı kullanılarak ve 'Nucleotide Blast' ve 'rRNA/ITS databases' opsiyonu seçilerek veritabanlarında yer alan tüm Bakteri ve Arke rRNA dizileri ile karşılaştırılarak en yüksek benzerlik gösterenler incelenmiştir. 'Graphics ve Multi sequence alignment viewer' (MSA viewer) seçenekleri ile elde edilen kısmi dizinin yüksek benzerlik gösterdiği diziler ile farklılık gösterdiği kısımlar incelenmiştir.

Bakteri dizilerinin karşılaştırmaları için 11.10.2020. Arke dizileri için ise 14.10.2020 tarihinde erişim sağlanmıştır.

Tablo 3.8. İzole edilen bakteriler ve literatürde izole edildikleri kaynak

Bakteri İzolatı	Literatürde izole edildiği kaynak
<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> strain KMM300	Deniz yumuşakçaları
<i>Idiomarina loihiensis</i> strain L2TR	Genome sequence of the deep-sea gamma-proteobacterium <i>Idiomarina loihiensis</i> reveals amino acid fermentation as a source of carbon and energy
<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> strain 18AG	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> subsp. nov., a haloalkaliphilic aerobe from Campania Region (Italy) Syst. Appl. Microbiol. 28 (1), 34-42 (2005)
<i>Salinivibrio kushneri</i> strain AL184	isolated from salterns
<i>Halomonas arcis</i> strain AJ282	Syst. Appl. Microbiol. (2018)
<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	isolated from hypersaline environments of China
<i>Tamilnaduibacter salinus</i> strain Mi 7	<i>Marinobacter adhaerens</i> type strain HP15), a diatom-interacting marine microorganism
<i>Halomonas halmophila</i> strain NBRC 15537	isolated from a salt pan in Tamilnadu, India
<i>Halomonas fontilapidosi</i> strain 5CR	Int. J. Syst. Evol. Microbiol (2015)
<i>Halomonas arcis</i> strain AJ282	Dead sea
<i>Halovibrio denitrificans</i> strain HGD 3	denitrifying bacterium
<i>Salicola marasensis</i> strain 7Sm5	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.(2007)
<i>Halomonas janggokensis</i> strain M24	isolated from hypersaline environments of China
	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.(2007)
	Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes Int. J. Syst. Evol. Microbiol (2006)
	an extremely halophilic bacterium isolated from the Maras solar salterns in Peru
	saline water in Anmyeondo, Korea, Gomseom solar saltern
	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.(2007)

Tablo 3.9. İzole edilen arkeleler ve literatürde izole edildikleri kaynak

Arke İzolatı	Literatürde izole edildiği kaynak
<i>Halorubrum</i> sp. A2FP11cs	Submitted (20-JUN-2013) Microbiology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus Cartuja S/N, Granada, Andalusia 18071, Spain
<i>Halorubrum ezzemoulense</i> strain CECT 7099	Archaea; Euryarchaeota; Stenosarchaea group; Halobacteria; Haloferacales; Halorubraceae; Halorubrum.
<i>Haloarchaeobius salinus</i> strain YC82	<i>Haloarchaeobius salinus</i> sp. nov., isolated from an inland salt lake, and emended description of the genus <i>Haloarchaeobius</i> Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65 (PT 3), 910-914 (2015)
<i>Halorubrum chaoviator</i> strain DSM 19316	Alt concentration pond, evaporitic salt crystal Mexico Baja California, Pacific Coast Date of sampling: 1994
<i>Halorubrum arcis</i> JCM 13916	Archaea; Euryarchaeota; Stenosarchaea group; Halobacteria; Haloferacales; Halorubraceae; Halorubrum; Halorubrum distributum group.
<i>Halobacterium salinarum</i> strain 91-R6	<i>Halobacterium noricense</i> sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of <i>Halobacterium</i> sp. NRC-1 as a strain of <i>H. salinarum</i> and emended description of <i>H. salinarum</i>
<i>Halorubrum lipolyticum</i> strain JCM 13559	Archaea; Euryarchaeota; Stenosarchaea group; Halobacteria; Haloferacales; Halorubraceae; Halorubrum.
<i>Haloarcula salaria</i> strain HST01-2R	<i>Haloarcula salaria</i> sp. nov. and <i>Haloarcula tradensis</i> sp. nov., isolated from salt in Thai fish sauce
<i>Halorubrum saccharovorum</i> strain JCM 8865	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61 (PT 2), 231-236 (2011)
<i>Halorubrum chaoviator</i> strain DSM 19316	Archaea; Euryarchaeota; Stenosarchaea group; Halobacteria; Haloferacales; Halorubraceae; Halorubrum.
<i>Halorubrum terrestre</i> strain JCM	Archaea; Euryarchaeota; Stenosarchaea group; Halobacteria; Haloferacales; Halorubraceae; Halorubrum.
<i>Haloarcula hispanica</i> strain Y-27	Salt crust, Ashgabat, Turkmenistan
<i>Halorubrum californiense</i> strain JCM 14715	Culture collection: <i>Haloarcula hispanica</i> Juez et al. (ATCC 33960) Solar saltern, Alicante, Spain
<i>Halorubrum sodomense</i> strain JCM 8880	Crystallizer pond at the Cargill Solar Salt Plant, Newark, CA, USA
<i>Haloarcula japonica</i> strain TR-1	Surface water from the Dead Sea
	Saltern soil at Noto Peninsula, Japan [2871].
	Morphology: Triangular cell, asymmetric cell division [2870],
	ultrastructure of cell wall [3256].

İzolatların elde edildikleri tuzluluğa göre dağılımı ise aşağıda verilmiştir (Bkz. Tablo 3.10).

Tablo 3.10. İzolatların elde edildikleri tuzluluğa göre dağılımı

%33 Tuzluluk	%25 Tuzluluk	%19 Tuzluluk	%15 Tuzluluk
S2-1492R <u>KF321800.1</u> <i>Halorubrum</i> sp. A2FP11cs	Sm12-1492R <u>NR_025555.1</u> <i>Halobacterium salinarum</i> strain 91-R6	S36-1492R <u>NR_044115.1</u> <i>Halomonas arcis</i> strain AJ282	15-1-1492R <u>NR_074933.1</u> <i>Idiomarina loihiensis</i> strain L2TR
S3-1492R <u>NR_113217.1</u> <i>Halorubrum ezzemoulense</i> strain CECT 7099	S5-1492R (ocak) <u>NR_113472.1</u> <i>Halorubrum chaoviator</i> strain DSM 19316	19-2-1492R <u>NR_043524.1</u> <i>Halovibrio denitrificans</i> strain HGD 3	S10-1492R <u>NR_074933.1</u> <i>Idiomarina loihiensis</i> strain L2TR
S4-1492R <u>NR_134833.1</u> <i>Haloarchaeobius salinus</i> strain YC82		19-3-1492R <u>NR_043480.1</u> <i>Salicola marasensis</i> strain 7Sm5	15-5-1492R <u>NR_042255.1</u> <i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> strain 18 AG
S41-1492R <u>NR_113470.1</u> <i>Halorubrum arcis</i> JCM 13916		S21-1492R <u>NR_042489.1</u> <i>Halomonas janggokensis</i> strain M24	S16-1492R <u>NR_157685.1</u> <i>Salinivibrio kushneri</i> strain AL184
33-4-1492R <u>NR_025555.1</u> <i>Halobacterium salinarum</i> strain 91-R6			15-8-1492R <u>NR_044115.1</u> <i>Halomonas arcis</i> strain AJ282
33-5-1492R <u>NR_113480.1</u> <i>Halorubrum lipolyticum</i> strain JCM 13559			15-11-1492R <u>NR_074765.1</u> <i>Marinobacter adhaerens</i> HP15
33-12-1492R <u>NR_116666.1</u> <i>Haloarcula salaria</i> strain HST01-2R			S17-1492R <u>NR_137364.1</u> <i>Tamilnadiibacter salinus</i> strain Mi 7
33-14-1492R <u>NR_113484.1</u> <i>Halorubrum saccharovorum</i> strain JCM 8865			S18-1492R <u>NR_113766.1</u> <i>Halomonas halmophila</i> strain NBRC 15537
Sm1-1492R <u>NR_113472.1</u> <i>Halorubrum chaoviator</i> strain DSM 19316			S26-1492R <u>NR_113766.1</u> <i>Halomonas halmophila</i> strain NBRC 15537 (? <i>H. almeriensis</i>)
Sm2-1492R <u>NR_113487.1</u> <i>Halorubrum terrestre</i> strain JCM 10247			S32-1492R <u>NR_044519.1</u> <i>Halomonas fontilapidosi</i> strain 5CR
Sm6-1492R <u>NR_028159.1</u> <i>Haloarcula hispanica</i> strain Y- 27 complete sequence			

Tablo 3.10 (Devam) İzolatların elde edildikleri tuzluluğa göre dağılımı

%33 Tuzluluk	%25 Tuzluluk	%19 Tuzluluk	%15 Tuzluluk
Hw1-1492R NR_113471.1 <i>Halorubrum californiense</i> strain JCM 14715 Hw2-1492R NR_113485.1 <i>Halorubrum sodomense</i> strain JCM 8880 ? <i>californiense</i> Hw10-1492R %33 NR_028234.1 <i>Haloarcula japonica</i> strain TR-1 33-5-1492R NR_113480.1 <i>Halorubrum lipolyticum</i> strain JCM 13559 33-12-1492R NR_116666.1 <i>Haloarcula salaria</i> strain HST01- 33-14-1492R NR_113484.1 <i>Halorubrum saccharovororum</i> strain JCM 8865 <i>Halorubrum chaoviator</i> strain DSM 19316			

Tablo 3.11. İzole edilen arkeler ve geliştirildikleri besiyerleri

21 Arke İzolatı (tuzluluklar belirtilmiştir)	Geliştirildiği Besiyeri
<i>Halorubrum chaoviator</i> strain DSM 19316 (25 ve 33)	Salinibacter m. ve. %23 MGM 30 °C
<i>Halorubrum sodomense</i> strain JCM 8880	H. walsby medium
<i>Halorubrum ezzemoulense</i> strain CECT 7099 x3	H. walsby medium / %23 R2A 37°C
<i>Halorubrum californiense</i> strain JCM 14715	H. walsby medium
<i>Halorubrum terrestre</i> strain JCM 10247	Salinibacter m.
<i>Halorubrum saccharovororum</i> strain JCM 8865	%23 MGM 37°C
<i>Halorubrum lipolyticum</i> strain JCM 13559 x2	%25 MGM 37°
<i>Halorubrum arcis</i> JCM 13916	-
<i>Halorubrum</i> sp. A2FP11cs	%23 R2A 37°C
<i>Haloarcula salaria</i> strain HST01-2R	%23 MGM 37°C
<i>Haloarcula hispanica</i> strain Y-27 complete sequence	Salinibacter m.
<i>Haloarcula japonica</i> strain TR-1	H. w. medium
<i>Halobacterium salinarum</i> strain 91-R6 x2 (33 ve 25)	% 25 MGM 37°C ve Salinibacter m.
<i>Haloarchaeobius salinus</i> strain YC82	%23 R2A 37°C

Tablo 3.12. İzole edilen bakteriler ve geliştirildikleri besiyerleri

15 Bakteri İzolatı (tuzluluklar belirtilmiştir)	Geliştirildiği Besiyeri
<i>Halomonas janggokensis</i> strain M24 (19)	%18 MGM 37 °C
<i>Halomonas arcis</i> strain AJ282 x2 (19 ve 15)	%18 ve %12 MGM 30 °C
<i>Halomonas fontilapidosi</i> strain 5CR (15)	%18 MGM 30 °C
<i>Halomonas halmophila</i> strain NBRC 15537 (15). x2	%18 MGM 30 °C ve 37 °C
<i>Halovibrio denitrificans</i> strain HGD 3 (19)	%18 MGM 30 °C
<i>Salicola marasensis</i> strain 7Sm5 (19)	%18 MGM 30 °C
<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>alcaliphilus</i> strain 18 AG (15)	%12MGM 30 °C
<i>Salinivibrio kushneri</i> strain AL184 (15)	%18 MGM 37 °C
<i>Idiomarina loihiensis</i> strain L2TR (15) x2	%12MGM 30 °C
<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15 (15)	%12MGM 30 °C
<i>Tamilnaduibacter salinus</i> strain Mi 7 (15)	%18 MGM 37 °C
<i>Pseudoalteromonas rutenica</i> strain KMM300 (9)	%12MGM 30 °C

21 arke izolatından dizi okuması kötü olan 25/1 kodlu bir örnek de dahil 14'ü *Halorubrum* cinsine ait olarak bulunmuştur. Bu 14'ünün içinden 10 örnek, aynı enzim kesim profilini veren 5 farklı kesim için dizilemeye gönderilen duplike örneklerdir.

Yakın dönemde yapılan bir tez çalışmasında, Ayvalık Tuzlasından alınan 10 su örneğini farklı SG besiyerlerinde geliştirilerek belirlenen türler, *Halobacillus karajensis*, *Halobacillus alkaliphilus*, *Salegentibacter salarius*, *Halomonas alimentaria*, *Halomonas denitrificans*, *Actinopolyspora erythraea*, *Chromohalobacter beijerinckii*, *Marinobacter algicola*'dır. Ayrıca enzim ürettiği belirlenen 3 halofilik bakteri ise cins bazında (2 adet *Haloferax* sp., 1 adet *Saccharopolyspora* sp.) tespit edilebilmiştir. Ortalama 1.2 x 10³ kob/mL kültüre edilebilir halofilik bakteri tespit etmişlerdir (Yılmaz, 2019).

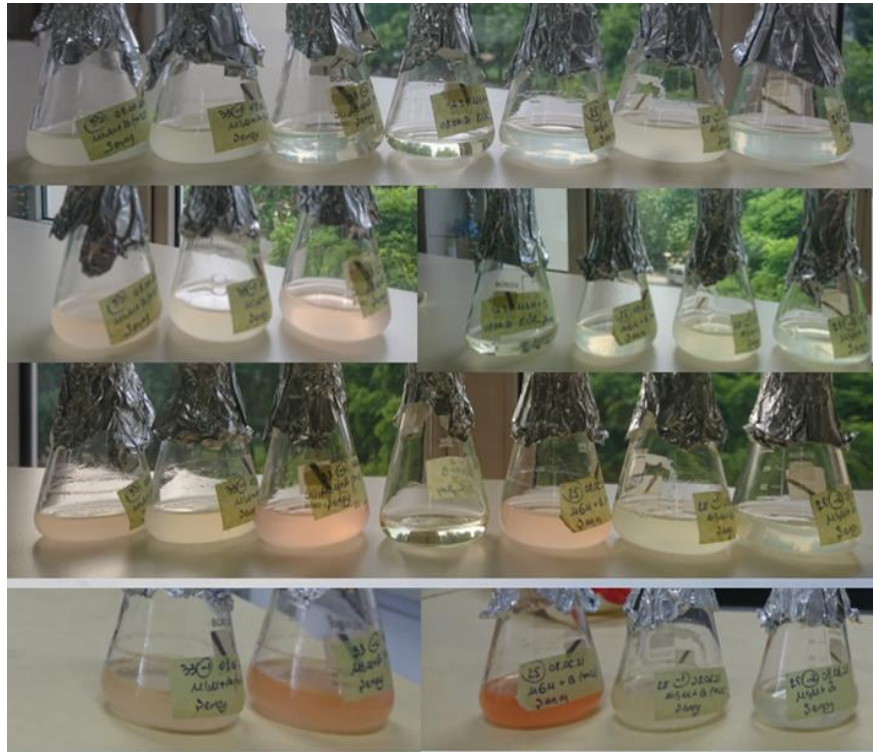
Yeni tamamlanan bir tez çalışmasında ise Tuz Gölünden kültür edilebilen prokaryotik çeşitlilik ise şu şekilde bulunmuştur. *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559; *Halorubrum sodomense* JCM 8880; *Halorubrum californiense* FV_22B20; *Haloarcula salaria* HST01-2R; *Halorubrum chaoviator* DSM 19316; *Haloterrigena thermotolerans* PR5; *Haloarcula japonica* JCM 7785 (Kesbiç, 2020). *Halorubrum* türleri bizim elde ettiklerimizle oldukça benzerdir.

Çamaltı Tuzlasından %6 and %32 arasındaki tuzluluk havuzlarından alınan örneklerle yapılan bakteriyel çeşitliliği tespit etmeye yönelik kültür bağımlı ve kültür bağımsız çalışmalar ile *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Halomonas* ve *Salinibacter* cinslerine ait türler tespit edilmiştir (Mutlu ve Güven 2015).

İlk kültür çalışmalarında 5 farklı tuzluluktan kültüre edilebilen izolatlar arasında henüz *Salinibacter* cinsine ait bir temsilciye rastlanmadığı için, özellikle %25 ve %33 tuzluluktaki örneklerden seçilen izolatlar bu anlamda taranmaya devam edilmiştir. Çalışma aralığımız içinde olan bu üst iki tuzlulukta *Salinibacter* türlerinin bulunduğu bilinmektedir (Leoni vd., 2020; Gomez vd., 2018; Mutlu vd., 2015).

3.6.2. Besiyeri ortamına basitrasin ilave edilerek yapılan izolasyon ve tanımlama çalışmaları

Çeşitli yeni seçici kültür ortamları hazırlanarak, %25 ve %33 tuzluluktaki havuzlardan, bu havuzlarda baskın şekilde görülen ve havuzun metabolik bileşiminin belirlenmesinde önemli rol oynayan ancak zor kültüre edilebilen mikroorganizmalar (metabolik çalışmalar için model organizmalar olarak kullanması hedeflenerek) kültüre edilmeye çalışılmıştır. Basitrasin içeren %25 MGM sıvı besiyerine ekilen %33 ve %25 tuzluluk havuzu örneklerinin, sıvı besiyerine yapılan ekimleri sonrasında, gelişimleri süresince mikroskopta gözlem yapılarak, morfolojik olarak kültüre edilmesi hedeflenen türlere benzer morfolojiler gösteren mikroorganizmalar takip edilerek, saf kültür olarak geliştirilmeye çalışılmıştır.



Görsel 3.9. %33 ve %25 tuzluluk havuzları örnekleri sıvı karışık kültürleri

Sıvı kültürlerden, farklı gelişim dönemlerinde, Basitrasin içeren ve içermeyen MGM katı besiyerleri çeşitlerine ekilerek geliştirilen ve seçilen. Sonrasında ise tekrar saf kültür olarak, katı ya da sıvı ortamda geliştirilen arke ve bakteri kültürlerinin önce genomik DNA'ları elde edilmiştir.

Geri primer okumaları sonucunda elde edilen .ab1 datası, MEGA11 programı kullanılarak incelenmiş, kısaltılarak .fasta formatına dönüştürülmüştür. Elde edilen bu kısmi rRNA nükleotid dizileri NCBI'nın BLAST programı kullanılarak Nucleotide Blast ve rRNA/ITS databases opsiyonu seçilerek veritabanlarında yer alan tüm Bakteri ve Arke rRNA dizileri ile karşılaştırılarak en yüksek benzerlik gösterenler incelenmiştir. 'Graphics ve Multi sequence alignment viewer' (MSA viewer) seçenekleri ile elde edilen kısmi dizinin yüksek benzerlik gösterdiği diziler ile farklılık gösterdiği kısımlar irdelenmiştir. Bakteri ve Arke dizilerinin karşılaştırmaları için 29.11.2021 tarihinde erişim sağlanmıştır.

İzolatlara ait elde edilen kısmi rRNA dizilerinin değerlendirilmesi sonrasında;

Arkeler:

Halorubrum (11 izolat),

Haloarcula (5 izolat) ve

Haloferax (3 izolat) cinsi üyelerine,

Bakteriler ise;

Salicola,

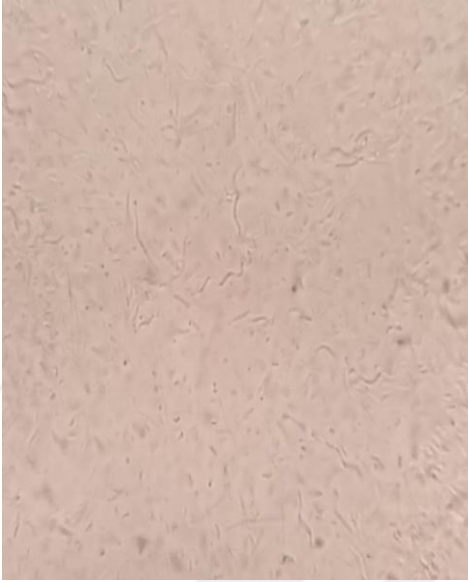
Halovibrio ve

Halospina cinsi üyelerine ait olarak tespit edilmiştir.

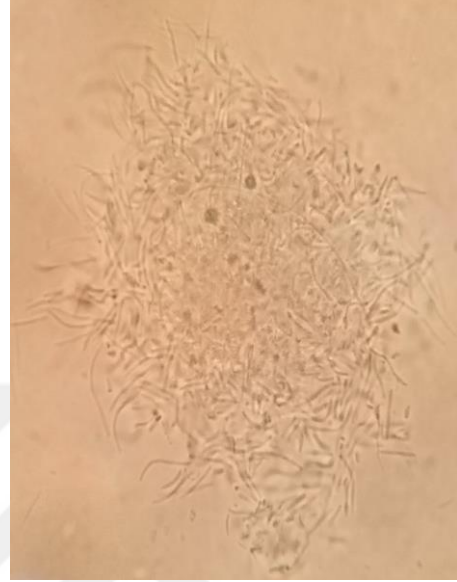
Yüksek tuzlulukta ve Basitrasin içeren besi yerlerinde geliştirilerek izole edilen arke üyeleri çeşitlilik gösterirken, böyle ortamlarda geliştirilerek dizilenmek üzere seçilmiş olan bakterilere ait dizi sonuçları genellikle benzer bulunmuştur.

Genellikle *Salicola* ve *Halovibrio* türlerinin literatür bilgilerine dayanarak, morfolojik olarak farklılık gösterdiği bilinmektedir. *Salicola* cinsleri yuvarlak şekilli ve ışık mikroskopunda daha zor ayırt edilebilir iken, *Halovibrio* türleri ince uzun çubuk şekillidir. Bu morfolojik farklılıklar bakımından izolatların bir kısmı irdelenmiş ve iki farklı morfolojiye sahip üyeler de tespit edilmiştir (Sorokin vd., 2006; Maturrano vd., 2006).

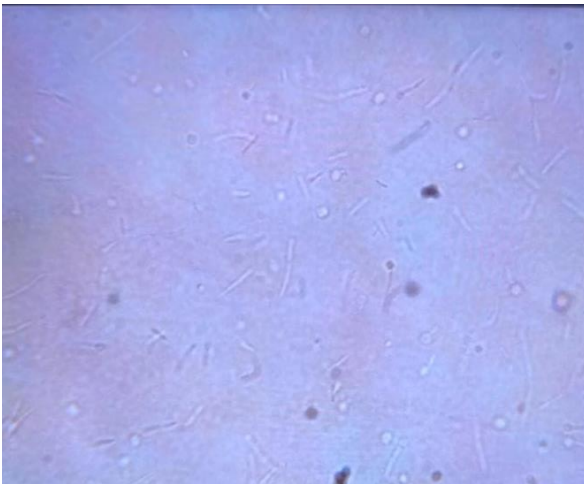
Basitrasin içeren %25 MGM sıvı besiyerine ekilen %33 tuzluluk havuzu örneğinin sıvı kültürlerinden ışık mikroskobu görüntüleri x100 büyütmede elde edilmiştir (Bkz. Görsel 3.10 ve Görsel 3.11).



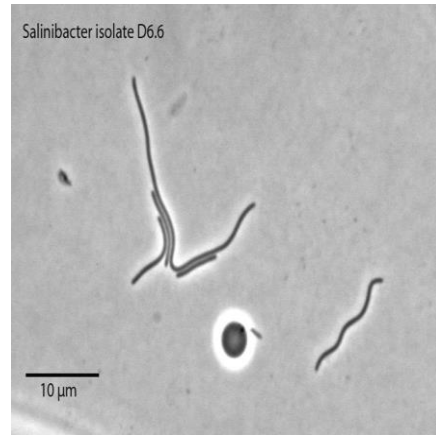
Görsel 3.10. %33 tuzluluk örneği-I



Görsel 3.11. %33 tuzluluk örneği-II



Görsel 3.12. *Salinibacter ruber*



Görsel 3.13. *Salinibacter ruber*

(Smith M. D. The Halohandbook)

Basitrasin içeren %25 MGM sıvı besiyerine ekilen %33 ve % 25 tuzluluk havuzu örneklerinin, sıvı kültüre yapılan ekimleri sonrasında, gelişimleri süresince mikroskopta gözlem yapılarak, morfolojik olarak kültüre edilmesi hedeflenen türlere benzer morfolojiler gösteren mikro organizmalar saf kültür olarak geliştirilmeye çalışılmıştır. Bunların arasında genellikle şeffaf ya da çok hafif beyaz pigmentasyon gösteren, kısa

veya orta uzunluktaki ince basil formlarına rastlanmıştır. Ancak kırmızımsı pembe pigmentasyon gösteren ve %33 tuzluluktan izole edilmiş olan tek bir bakteri üyesi belirlenmiştir.

Görsel 3.12. 'de görülen, %23MGM sıvı besiyerinde geliştirilen mikroorganizmanın sıvı kültürünün x100 büyütmede, ışık mikroskopundaki görüntüsüdür. Literatürde besiyeri tuzluluğundaki değişimlerin hücrelerde morfolojik değişimlere yol açabileceğini ve ilginç bir yapı olan kibrit çubuğu benzeri bir yapı alabilecekleri ifade edilmektedir. Bu ise hücre duvarının zayıflaması ile membrana bağlı sitoplazmanın dışı doğru çıkıntı yapması sonucunda ortaya çıkmaktadır (Smith, 2009).

18.11.2022'de alınan, Çamaltı Tuzlasına ait havuz örneği, *Haloquadratum* türlerini kültüre edebilmeye yönelik %25 SW+%23 MGM, Na Pirüvat, eser element ve vitamin solüsyonları eklenerek hazırlanan CM2 sıvı kültüründe çalkalamasız etüvde geliştirilerek mikroskopta incelenmiş ancak, *Haloquadratum* üyelerine benzer morfolojide mikroorganizmalar kültüre edilememiştir (Walsby, 1980; Smith, 2009; Cui, 2021)

Basitrasın eklenen sıvı kültürlerde geliştirilen izolatlardan, pembe renkli olan ve 27F bakteri ileri primeri ile kurulan PCR reaksiyonu pozitif sonuç veren ve mikroskobik olarak uzun çubuk şekilli olan ve *Salinibacter* türü olabileceği düşünülen mikroorganizma, ayrıca sıvı ve katı kültürlerde de geliştirilmiş ve dizi analizine gönderilerek tanımlanmıştır.

3.7. Cy3 İşaretli Farklı Oligonükleotid Problemleri ile Hibridizasyon ve Görüntüleme Sonuçları

Tüm havuz suları için, DAPI ile boyama sonrası 1 mL'deki prokaryotik hücre sayıları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

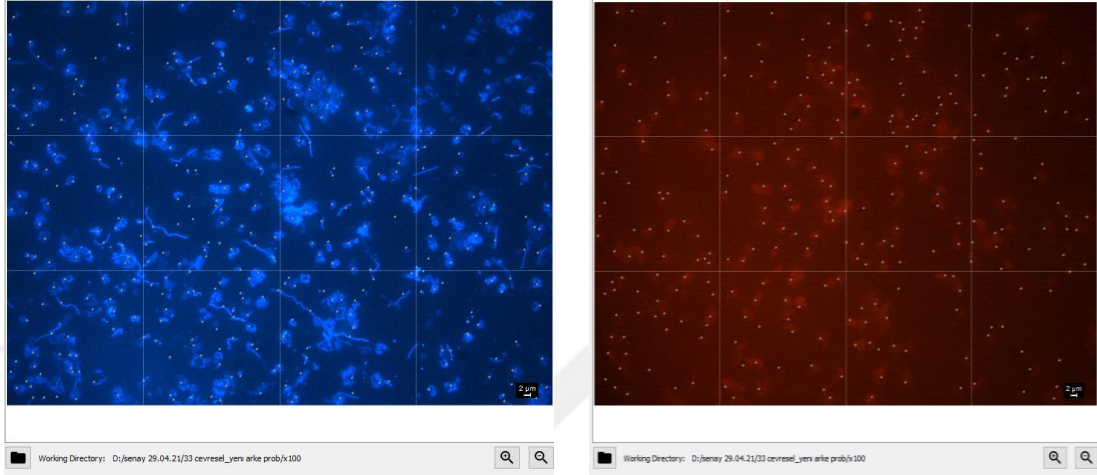
Tablo 3.13. Tuzluluğa karşılık DAPI prokaryotik hücre sayımları

% Tuzluluk	DAPI (Hücre sayısı mL ⁻¹)	Arc 915	Eub 338
33	$1.92 \times 10^7 \pm 0.41$	% 67	% 33
25	$2.67 \times 10^7 \pm 0.29$	% 60	% 40
19	$4.11 \times 10^7 \pm 0.22$	-	-
16	$3.82 \times 10^7 \pm 0.27$	-	-
9	$1.87 \times 10^7 \pm 0.29$	-	-

3.7.1. Farklı tuzluluklardaki havuz örneklerinin oligonükleotid problemleri ile hibridizasyon sonrası görüntüleri

DAPI

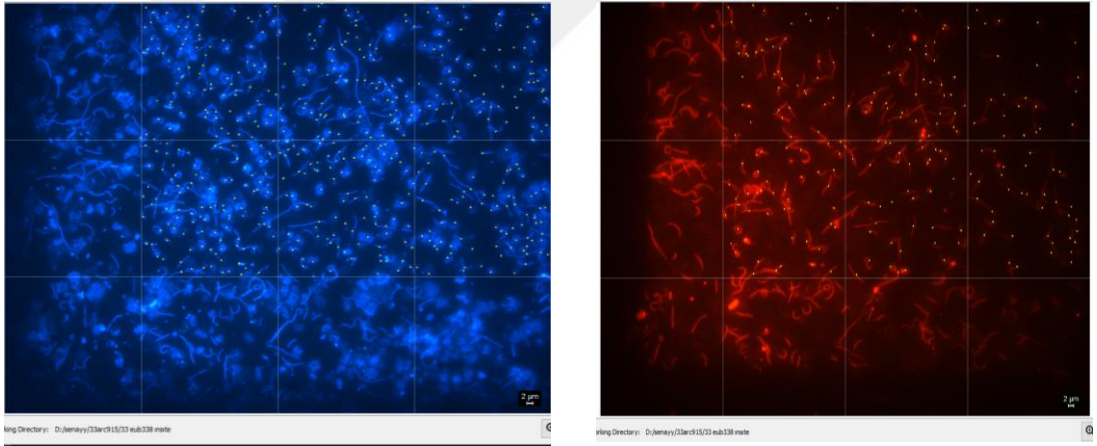
Arc 915



Görsel 3.14. %33 Tuzluluk havuzu örneği-I

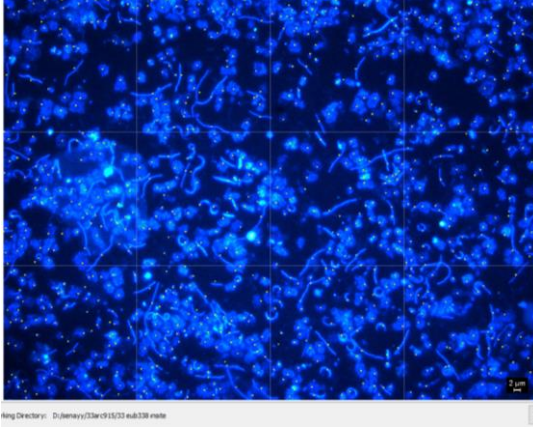
DAPI

Eub 338

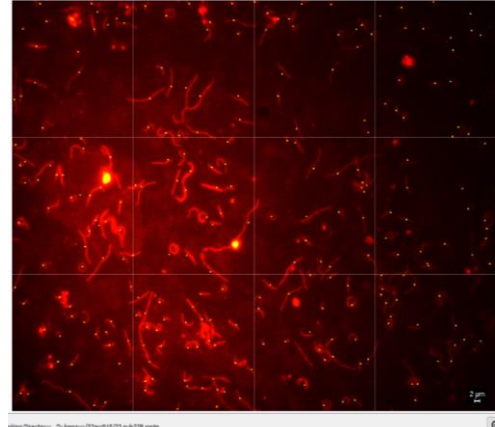


Görsel 3.15. %33 Tuzluluk havuzu örneği (in site formaldehit)

DAPI

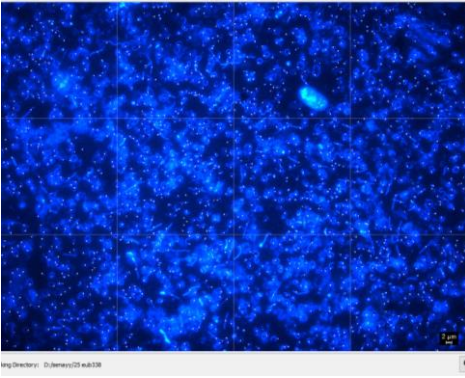


Eub 338

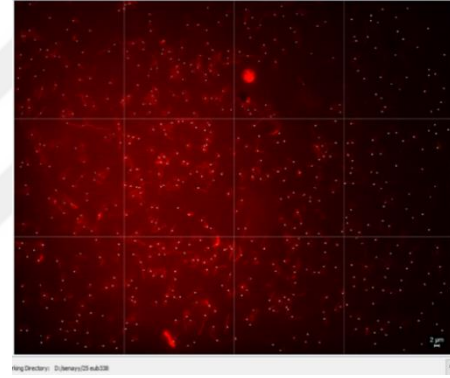


Görsel 3.16. %33 Tuzluluk havuzu örneği-II

DAPI

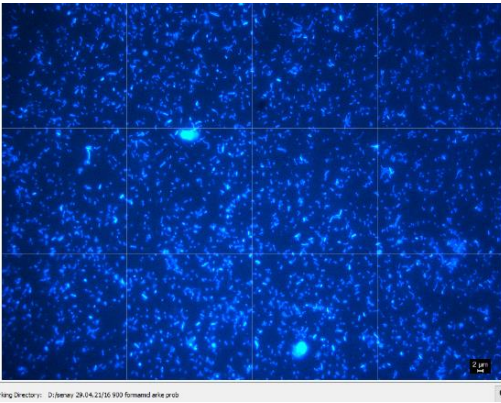


Eub 338

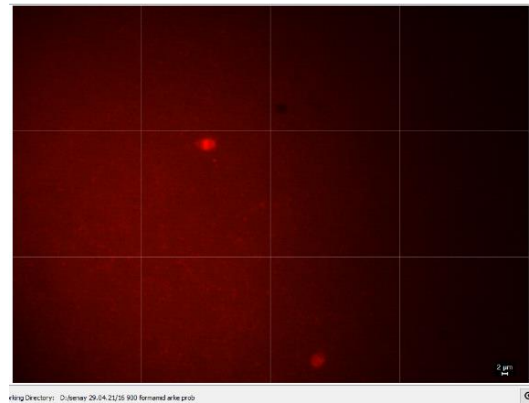


Görsel 3.17. %25 Tuzluluk havuzu örneği

DAPI

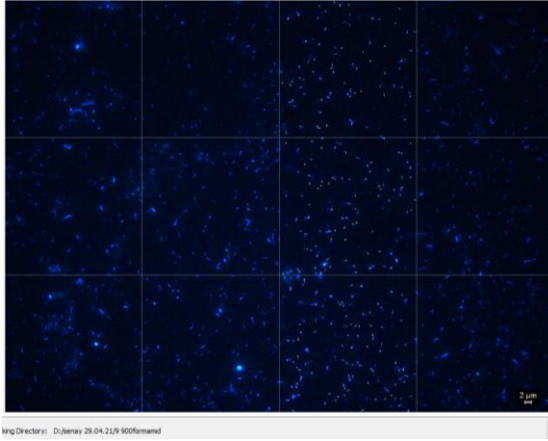


Arc 915

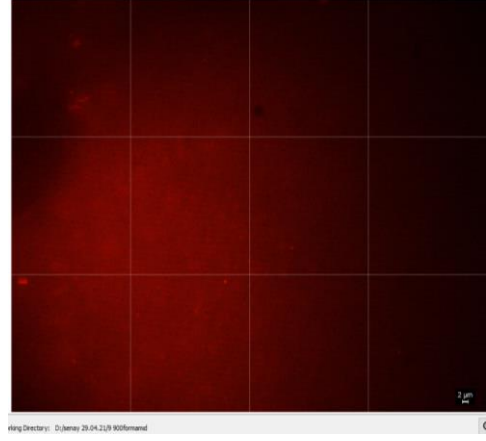


Görsel 3.18. %16 Tuzluluk havuzu örneği-I

DAPI

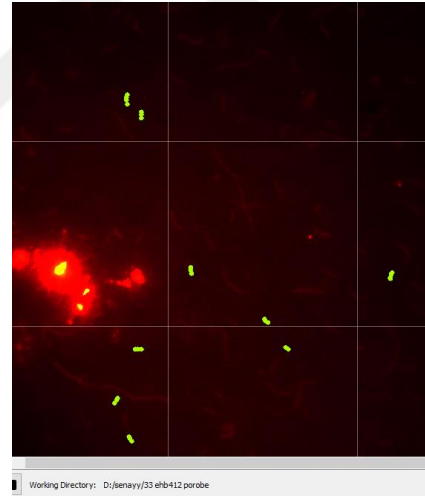
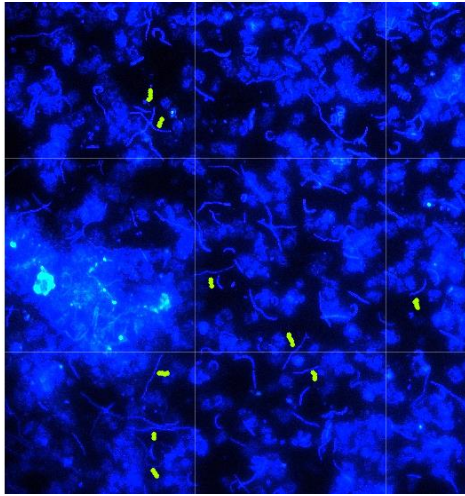


Eub 338



Görsel 3.19. %16 Tuzluluk havuzu örneği-II

3.7.2. %33 Tuzluluk havuzu örneğinin EHB412 oligonükleotid probu ile hibridizasyon sonrası görüntüleri



Görsel 3.20. EHB412 oligonükleotid probu ile hibridize olarak görüntülenen hücreler.

Soldaki görüntü DAPI ile boyanan, sağdaki ise EHB412 oligonükleotid probu ile hibridize olarak görüntülenen hücreleri göstermektedir (Bkz. Görsel 3.20).

Genellikle ince çubuk şekilli organizmaların EHB412 probu ile hibridize olmadığı görülmüştür. Böyle bölgelerin bir kısmı her iki görüntü alanında da kısa sarı işaretler ile gösterilmiştir.

Kültüre edilen saf bakteri ve arke kültürlerinin mikroskopik olarak da incelenmesi sonrasında, bakteri üyeleri arasında uzun çubuk şekilli bakteri türlerinin genellikle

gözlendiği, bunların Epifloresan mikroskopta gözlemlenenler ile benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Epifloresan mikroskop ile görüntüleme sonrasında gözlemlenmiştir ki;

%33 tuzlulukta daha yaygın olarak düz ipliksi şekilli bakteri formları yaygın iken % 25 tuzlulukta üstünlük kıvrık şekilli bakteriler yönündedir.

Yine tuzluluk üst sınıra doğru yaklaştıkça *Haloqudratum* hücrelerinin boyutları artmaktadır.

%16 tuzlulukta, taranan çoğu alanda, *Dunaliella* hücreleri görülmektedir.

Üst iki tuzluluk dışında, oligonükleotid problemlerin ışımaya sonuçları sayılabilecek kadar ayırt edici olamamıştır.

Hibridizasyon tamponu hazırlanırken 700 µl yerine 900 µl formamid kullanılarak gerçekleştirilen tekrarda görüntü iyileştirilse de sağlıklı sayım yapılabilecek düzeye gelememiştir.

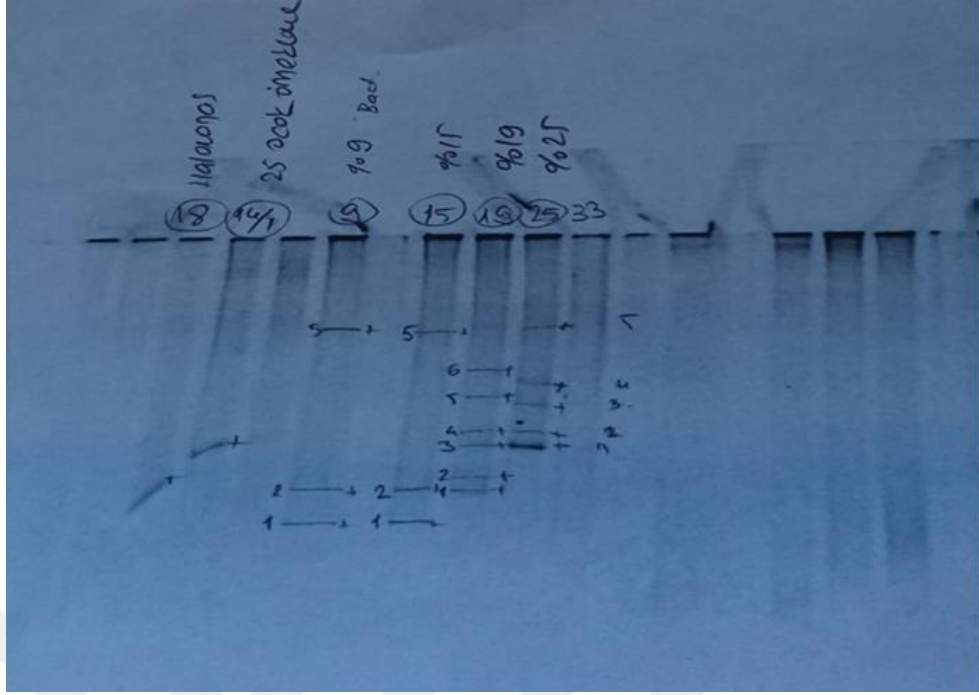
Değişken tuzlulukta havuz sularındaki DAPI ile boyanma sonrası sayılarak belirlenen prokaryotik hücre yoğunluğu; $(0.7-4.1) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ aralığında belirlenmiştir. Çamaltı Tuzlasında benzer tuzluluklarda belirlenen prokaryotik hücre yoğunlukları $(1.2-3.2) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ aralığında belirlenmiştir (Mutlu ve Güven, 2011).

İtalyadaki Margherita di Savoia Tuzlasında farklı tuzluluklardaki havuzlardaki Arke ve Bakterilerin taksonomik profillerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada DAPI ile boyama ile mL'deki prokaryotik hücre sayılarını daha düşük olarak belirlemişlerdir $(1.8-5.0 \times 10^5)$ ancak tuzluluğa bağlı hücre sayılarındaki değişim dağılımı bizim tespit ettiğimiz ile benzerdir, orta tuzlulukta hücre yoğunluğu daha yüksek belirlenmiştir (Leoni vd., 2020).

3.8. Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE)

3.8.1. DGGE_I

%40-%70 aralığında denatüre edici gradyenti oluşturularak, jelin artan konsantrasyonda üre ve formamid gradientine sahip olması sağlanmıştır Her kuyucuğa 400 ng örnek yüklenerek ve 2 saat boyunca 80 Volt ve 22 saat boyunca 120 Volt voltaj uygulanarak yürütülmüştür.

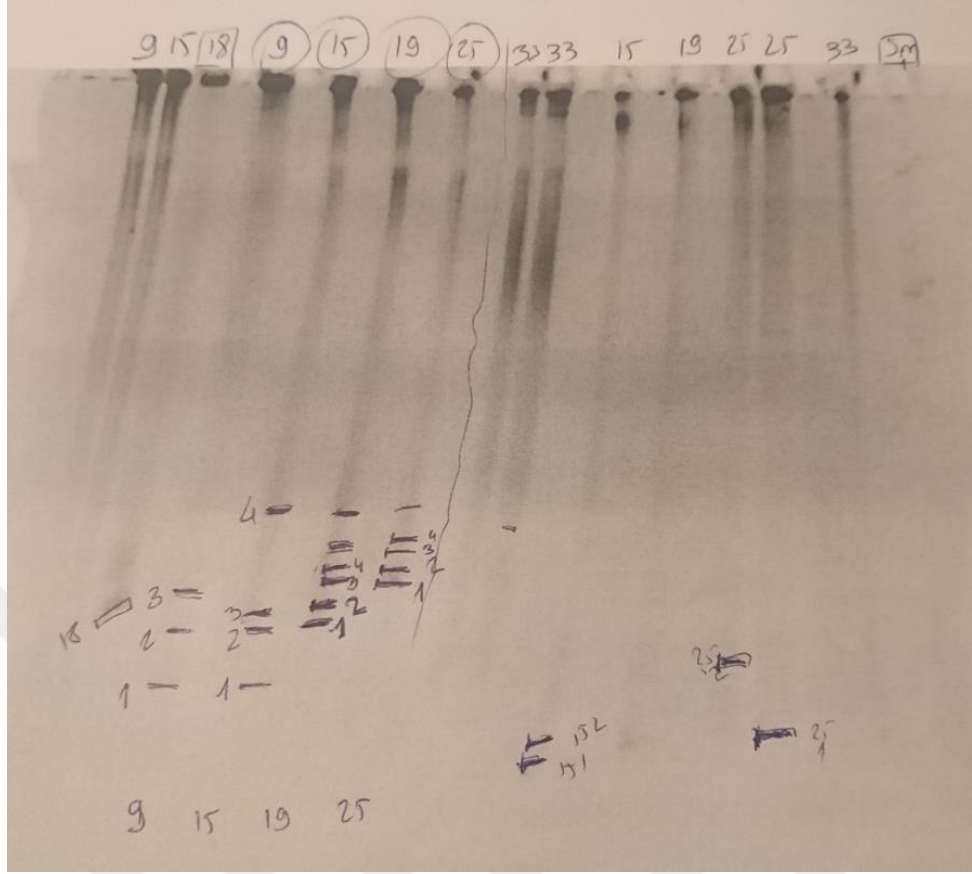


Görsel 3.21. *Total DNA’lardan elde edilen DGGE PCR ürünlerinin DGGE Jeli-I*

Bunlardan %25 tuzluluk total’DNA sıdan DGGE PZR ile çoğaltılan 550 bazlık total bakteri DNA’sında farklı bölgelere göç ederek ayrılan ve kesilerek, pozitif DGGE PZR sonucu alınan;1, 2 ve 4 numaralı bantlar dizilemeye gönderilmiştir.

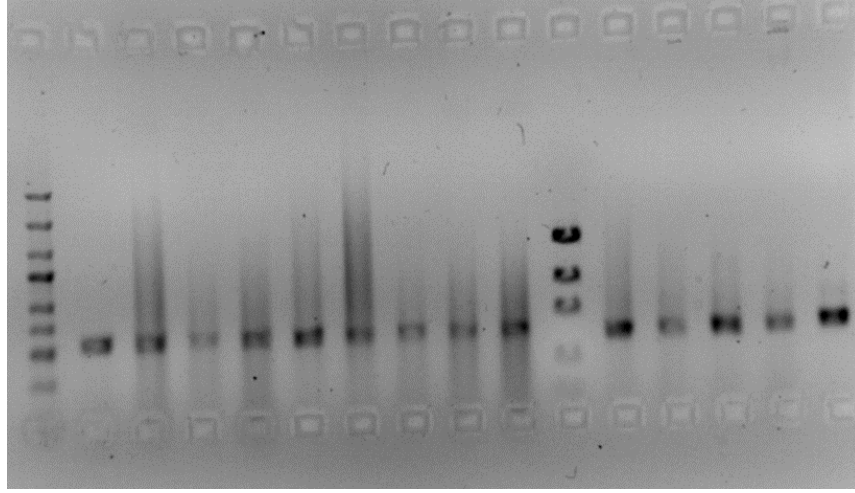
3.8.2. DGGE_II

Bu ikinci jelde %30-%60 aralığında denatüre edici gradyenti oluşturularak, jelin artan konsantrasyonda üre ve formamid gradientine sahip olması sağlanmıştır ve 500 ng örnek yüklenerek ve 2 saat boyunca 80 Volt ve 22 saat boyunca 120 Volt voltaj uygulanarak ikinci bir jel elde edilmiştir (Green vd., 2010).



Görsel 3.22. Total DNA’lardan elde edilen DGGE PCR ürünlerinin DGGE Jeli-II

İkinci DGGE sonrasında jelden kesilen 19 banttı 12’si template olarak kullanılarak elde edilen PCR reaksiyon ürünleri dizilemeye göndermek üzere yeterli miktarda çoğaltılabilmektedir. Jelde görülen ilk 9 kuyucuk 19, 25 ve 33 tuzluluk total DNA’larının bakteri DGGE PCR ürünlerinden elde edilen bantlardan elde edilmiş, son 4 örnek ise 15 ve 25 tuzluluğa ait ayrılabilen Arkelere ait bantlar kalıp olarak kullanılarak elde edilmiştir.



Görsel 3.23. Jelden kesilen bantlar kalıp olarak kullanılarak elde edilen PCR ürünleri

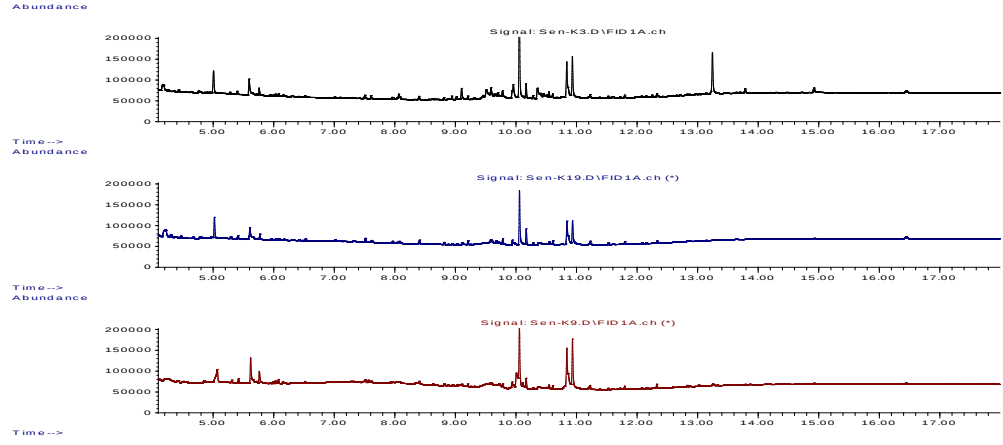
3.8.3. DGGE bantlarının dizi analizi

Önceki dönemde elde edilen ve jelden kesilerek tekrar bakteri ve arkelere özgü primerler kullanılarak, PZR ile çoğaltılan DGGE bantları agaroz jel elektroforezi ile tekrar kontrol edildikten sonra dizi analizi için BMLabosis'e gönderilmiştir. 907R geri primer ile okumaları yapılarak belirlenen dizi analizleri sonrasında %25 tuzluluk havuzu total DNA'sından elde edilen, bakteri primeri ile çoğaltılan bantların üçünün de *Salinibacter* cisine ait olduğu. Arke primeri ile çoğaltılan %25 tuzluluk total DNA'sından DGGE sonrasında elde edilen en kalın bant kesilerek elde edilen PCR ürünün, dizi analizi sonucunda ise *Haloquadratum* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar önceki dönemde yapılan Cy3 işaretli farklı oligonükleotid problemleri ile hibridizasyon ve epifloresan mikroskop ile görüntüleme sonrası elde edilen görüntüler ile örtüşmektedir.

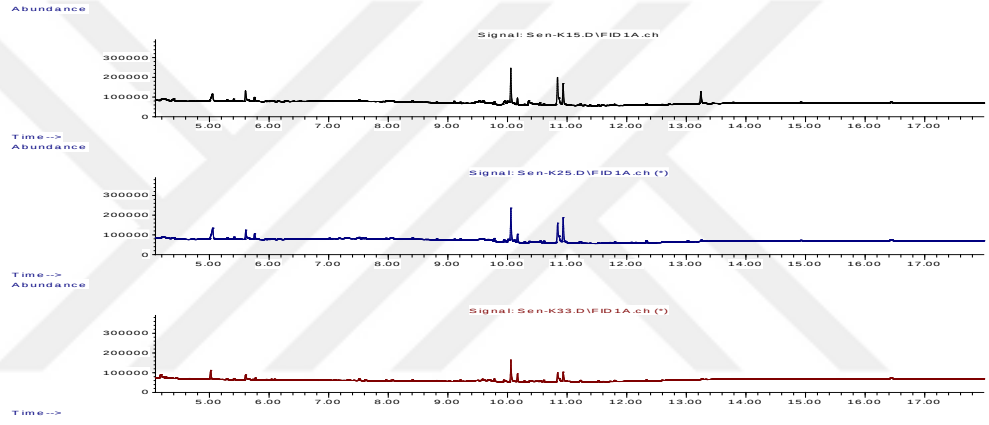
3.9. Metabolit Analizleri

3.9.1 İki farklı teknikle kurutma sonrası GC/MS analizleri

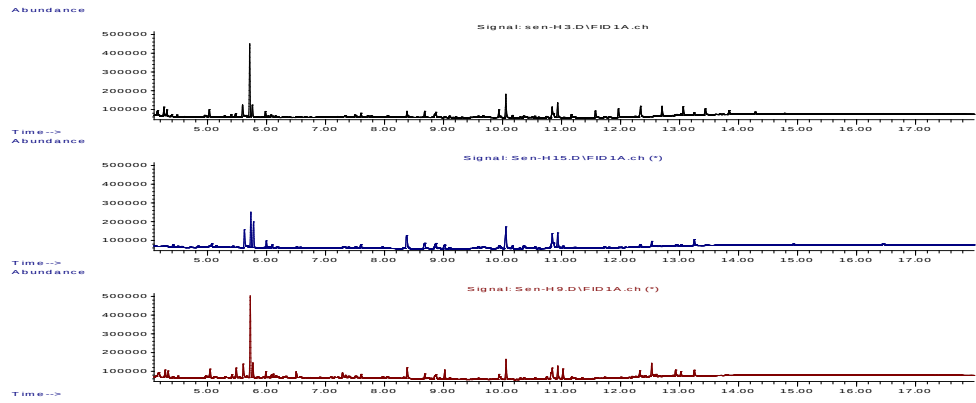
Konsantre ve liyofilize edilmiş olan çevresel örnekler için türevlendirme yapıldıktan sonra her bir örneğin analizi sonrasında elde edilen kromatogramlar karşılaştırmalı olarak aşağıda verilmiştir.



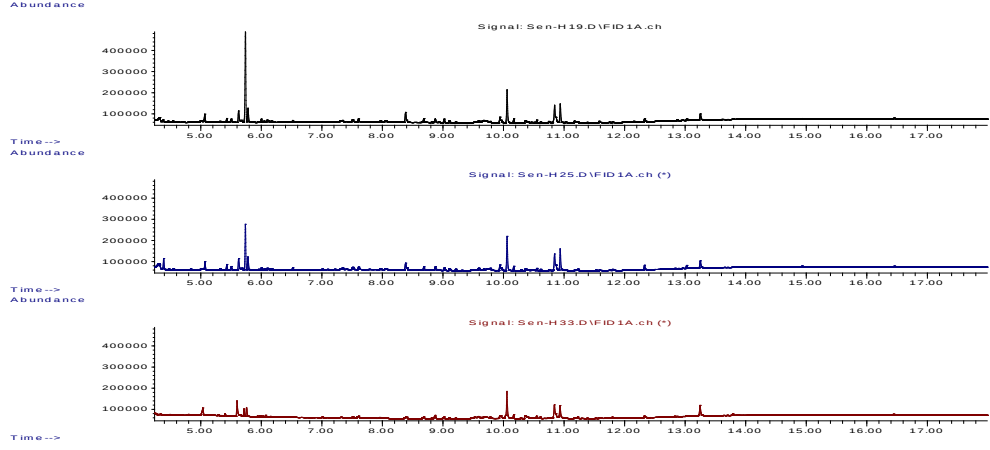
Görsel 3.24. *Konsantre örneklerin kromatogramları (tuzluluklar %3; %19; %9)*



Görsel 3.25. *Konsantre örneklerin kromatogramları (tuzluluklar %15; %25; %33)*

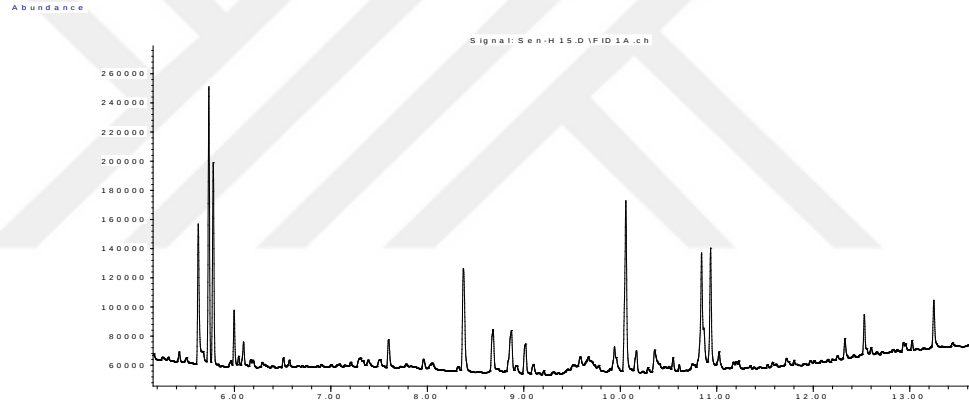


Görsel 3.26. *Liyofilize örneklerin kromatogramları (tuzluluklar %3; %15; %9)*



Görsel 3.27. Liyofilize örneklerin kromatogramları (tuzluluklar %19; %25; %33)

3.9.1.1. %15 Tuzluluktaki örneğe ait kromatogram ve tanımlanan bileşenler



Görsel 3.28. %15 tuzluluktaki çevresel örneğe ait kromatogram

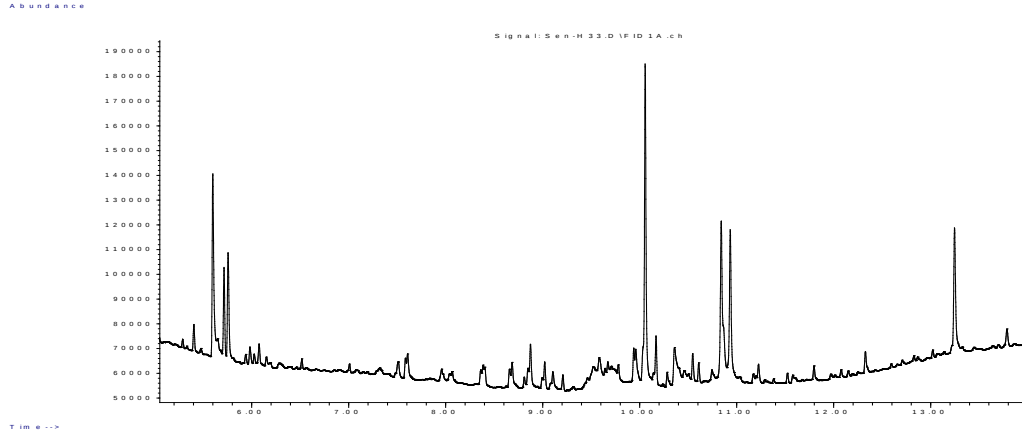
Tablo 3.14. %15 Tuzluluktaki örnekte belirlenen bileşenler ve bağıl yüzdeleri

No:	R.T.	Bileşen (*dış kaynaklı bileşen)	Bağıl Yüzde
1	5.62	Benzoic acid TMS	6,7
2	5.73	Glycerol TMS	11,14
3	5.78	Phosphoric acid TMS	8,7
4	5.66	Succinic acid di-TMS	1,04
5	6.08	Methyl Succinic acid di-TMS	0,33
6	6.09	Cateshol di-TMS	0,9
7	6.16	5-Isopropyl-2-methylphenoxy) trimethylsilane	0,3
8	6.19	Fumaric acid di-TMS	0,27
9	6.57	Glutaric acid di-TMS	0,21
10	7.59	3-Hydroxybenzoic acid, di-TMS	1,59

Tablo 3.14. (Devam) %15 Tuzluluktaki örnekte belirlenen bileşenler ve bağıl yüzdeleri

No:	R.T.	Bileşen (*dış kaynaklı bileşen)	Bağıl Yüzde
11	7.96	3-Hydroxybenzoic acid, di-TMS	0,61
12	8.31	Suberic acid di-TMS	0,29
13	8.37	Phthalic acid di-TMS	7,18
14	8.68	*Isophthalic acid, di-TMS	2,94
15	8.84	Azelaic acid, di-TMS	0,58
16	8.87	*Terephthalic acid, di-TMS	3,0
17	8.91	Protocatechoic acid, 3TMS	0,63
18	9.01	Protocatechoic acid, 3TMS	2,13
18	9.10	Myristic Acid TMS	0,72
20	9.51	Methyl palmitate	0,33
21	9.77	3-O-Benzyl-5,6-O-thiocarbonyl-1,2-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose	0,25
22	9.94	Fatty acid TMS	1,16
23	10.05	Palmitic acid TMS	10,2
24	10.35	Methyl oleate	1,81
25	10.54	1-Octadecanol, TMS	0,63
26	10.84	Oleic acid TMS	6,2
27	10.86	?11-trans-Octadecenoic acid, trimethylsilyl ester	1,38
28	10.93	Stearic acid TMS	5,61
29	13.24	Squalene	2,37

3.9.1.2. %33 Tuzluluktaki örneğe ait kromatogram ve tanımlanan bileşenler

**Görsel 3.29. %33 tuzluluktaki çevresel örneğe ait kromatogram**

Tablo 3.15. %33 Tuzluluktaki örnekte belirlenen bileşenler ve bağıl yüzdeleri

No:	R.T.	Bileşen	Bağıl Yüzde
1	5.59	Benzoic acid TMS	8,53
3	5.71	Glycerol 3TMS	3,35
4	5.75	Phosphoric acid 3TMS	4,70
5	5.98	Succinic acid 2TMS	0,77
6	6.02	Thymol TMS	0,37
7	6.07	Catechol 2TMS	0,86
8	6.15	(5-Isopropylmethylphenoxy) trimethylsilane	0,42
10	7.58	3-Hydroxybenzoic acid 2TMS	0,91
11	7.60	3-Hydroxybenzoic acid 2TMS	1,08
20	8.99	Protocatechoic acid 3TMS	0,45
21	9.02	Protocatechoic acid 3TMS	1,26
23	9.10	Myristic acid TMS	0,87
27	9.52	Palmitic acid ME	0,98
31	9.95	Palmitoleic acid TMS ester	1,82
32	10.03	Palmitic acid TMS	1,14
33	10.05	Palmitic acid TMS	13,74
36	10.35	Oleic acid ME	2,67
38	10.54	1-Octadecanol TMS	1,11
41	10.84	Oleic acid TMS	7,51
42	10.85	Oleic acid TMS	0,22
43	10.93	Stearic acid TMS	7,50

Analizler sonrasında tüm tuzluluktaki örneklerde gliserol, organik asitler ve yağ asitleri gibi bileşenler değişken oranlarda belirlenebilmiştir. Konsantre edilen örneklerin analizleri sonrasında elde edilen kromatogramlar incelendiğinde ise, bu örneklerde liyofilize edilenlere nazaran gliserol miktarlarında bir azalma göze çarpmaktadır. Bu örneklerin hazırlaması sırasında, konsantre etme işlemi ile tam kurumayan bu örneklerle, türevlendirme ajanı ilavesi öncesinde, havanda ezilerek homojen hale getirilmesi işlemi uygulanmıştır, gliserolun bir kısmının bu işlem sırasında kaybedilmiş olabileceği düşünülmüştür. Gliserol *Dunaliella* türleri tarafından üretilmekte ve heterotrofik halofilik organizmalar için ana karbon ve enerji kaynağı olarak kabul edilmektedir. Yüksek tuzluluklardaki ekosistemlerde heterotrofik prosesi sürdüren kilit bileşendir. *Dunaliella*’da sitoplazmanın ana bileşenidir, çoğunun ortama salındığı düşünülmektedir (Oren, 1993; 2015; 2017).

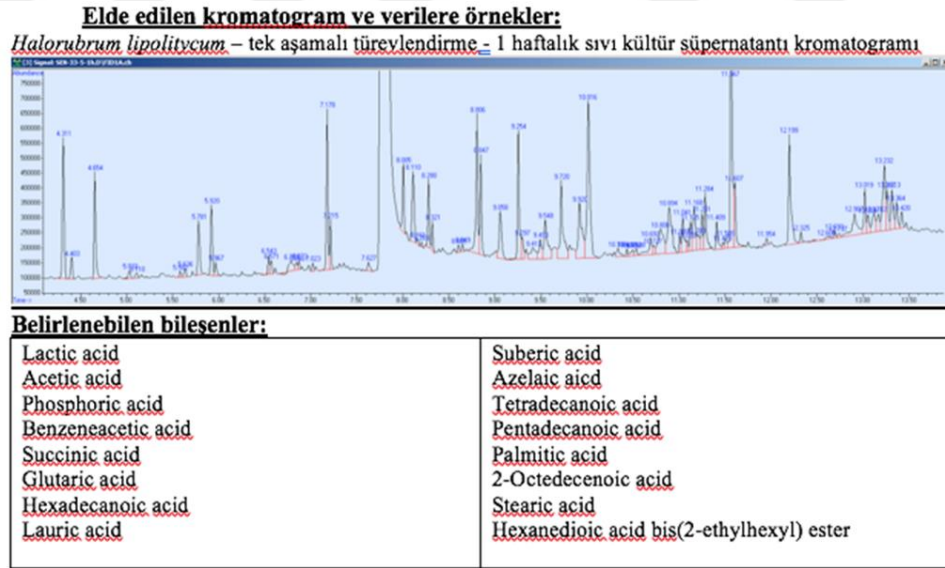
Sogin ve arkadaşlarının önerdiği deniz suyundaki metabolitlerin analizini tarif eden yöntem, mevcut olan kimyasallar kullanılarak ve türevlendirme aşamaları olukça azaltılarak uygulanmış, bu yöntemin yüksek tuzluluklar için de uygulanabileceği görülmüştür.

SeaMet ile elde edilen örneklerde yüksek miktarlarda, organik asitler, amino asitler şeker alkoller ve şekerler belirlenirken (Liebeke vd., 2019; Sogin vd., 2019). Bizim uyguladığımız yöntemle; organik asitler ve ek olarak da bazı fenolik asitler, yağ asitleri, gliserol ve squalen gibi bileşikler belirlenebilmiştir.

3.9.2. İzolatların ekstraselüler metabolit analizleri

Seçilerek, sıvı besiyerinde geliştirilen bazı arke ve bakteri izolatlarının iki farklı türevlendirme yöntemi sonrası gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC/MS) ile ekstraselüler metabolit analizleri sonuçları verilmiştir.

3.9.2.1. %25 MGM sıvı besiyerinde geliştirilen *Halorubrum lipolyticum* hücre dışı metabolitleri

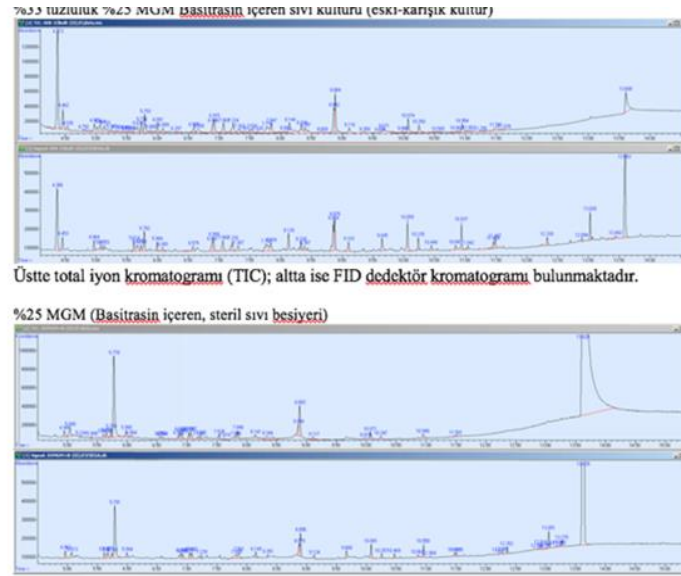


Görsel 3.30. *Halorubrum lipolyticum* kültürü ekstraselluler metabolitleri

3.9.2.2. %33 tuzluluk karışık sıvı kültürü ve stril besiyeri karşılaştırması.

Basitrasin içeren besiyerinde geliştirilen karışık sıvı kültürün ekstraselüler metabolitleri ile ekim yapılmamış steril sıvı besiyerinin metabolitleri, liyofilize edilip

türelendirme işlemi yapıldıktan sonra analiz edilerek karşılaştırılmıştır (Bkz. Görsel 3.31).



Görsel 3.31. %33 tuzluluk örneği karışık sıvı kültürü ve kontrol olarak steril besiyeri analizleri

3.9.3. *Halobacterium salinarum* 5. ve 10. saatlik kültürlerinin hücre dışı, hücresel çözünen ve hücresel çözünmeyen fraksiyonlarının metabolitleri

Halobacterium salinarum 5. saat kültürü, hücre dışı metabolitleri (Bkz. Tablo 3.16) ve sırası ile; hücre dışı, hücresel çözünen ve hücresel çözünmeyen fraksiyonlarının elde edilen kromatogramları karşılaştırmalı olarak verilmiştir (Bkz. Görsel 3.31).

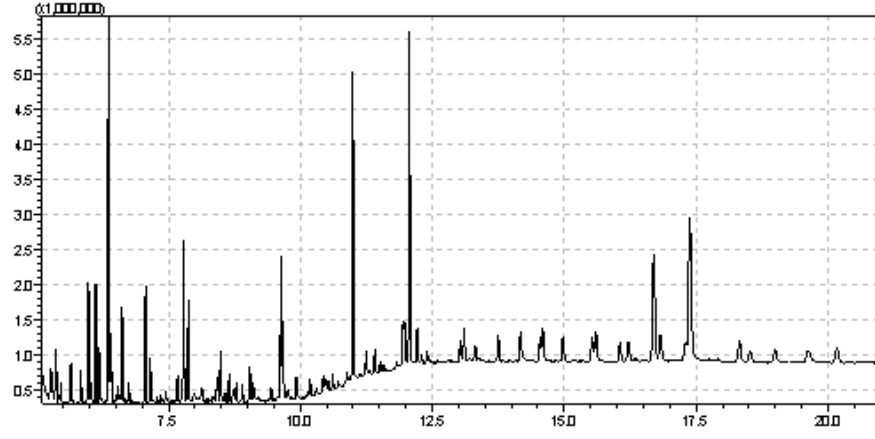
Tablo 3.16. *Halobacterium salinarum* 5. saat kültürü, hücre dışı metabolitleri

R.T.	Bileşen	Bağıl Yüzde (%)
5.65	3-Hidroksivalerik asit	1.5
5.90	4-Hidropoksikaproik asit	1.0
5.98	Benzoik asit	3.3
6.03	Oktanoik asit	1.5
6.13	Gliserol	3.0
6.18	Silanol trimetil fosfat	1.4
6.35	Benzenasetik asit	10.7
6.40	Büten dioik asit	2.1
6.75	Nonanoik asit	1.4
7.10	Penten dioik asit	3.0
7.12	Trometamin	1.4

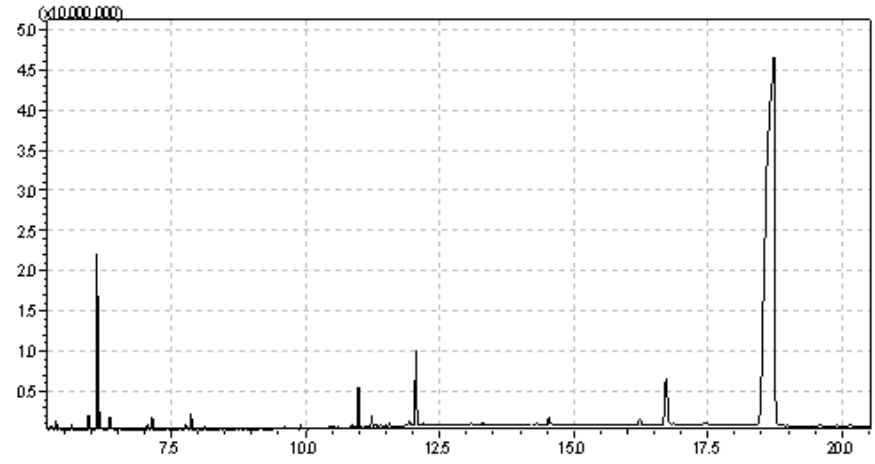
Tablo 3.16. (Devam) *Halobacterium salinarum* 5. saat kültürü, hücre dışı metabolitleri

R.T.	Bileşen	Bağıl Yüzde (%)
7.65	(Tetradekametil sikloheptasiloksan)	0.8
7.78	Hekzandioik asit	4.3
7.88	Terometamin	2.6
8.48	Dietil ftalat	1.5
8.58	Antranik asit	0.8
8.64	4-Hidroksibenzoik asit	0.8
9.00	Suberik asit	1.5
9.11	Ftalik asit	2.2
9.44	İzoftalik asit	1.4
9.63	Azelaik asit	3.8
9.67	Tereftalik asit	2.1
9.92	Miristik asit	1.7
10.18	Sebasic asit	1.6
10.99	Palimitik asit	8.5
12.07	Stearik asit	10.2
12.46	Hidrokarbon	1.0
13.20	Eikosanoik asit	1.1
14.54	1-Monopalmitin	1.0
14.60	?	1.3
14.97	Behenik asit	1.0
15.60	?	1.5
16.04	Tetrakosanoik asit	2.8
16.21	2-Monostearin	2.9
16.70	Gliserol monosearat	6.6
17.37	Lignoserik asit	8.3
18.32	?	3.4
18.54	5- α -Kolestan	3.6
18.98	Pentakosanoik asit	3.8
20.16	Tetrapentakontan	3.9

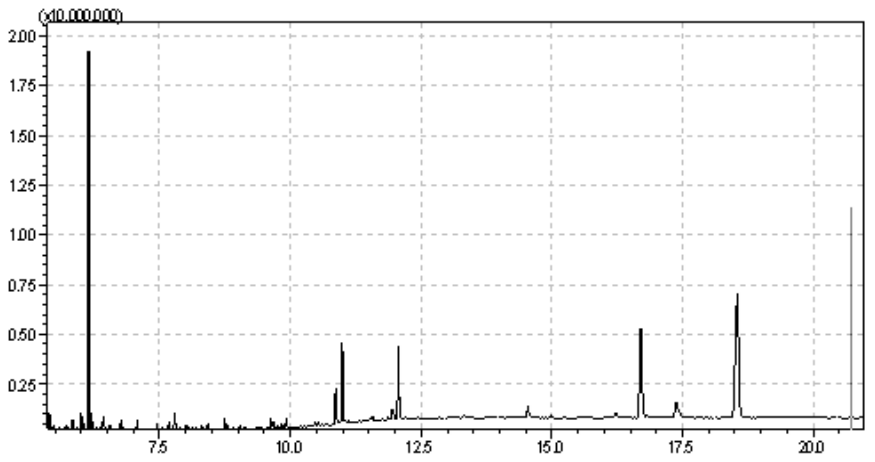
5-33-4-E-2_5-33-4-E-2_1



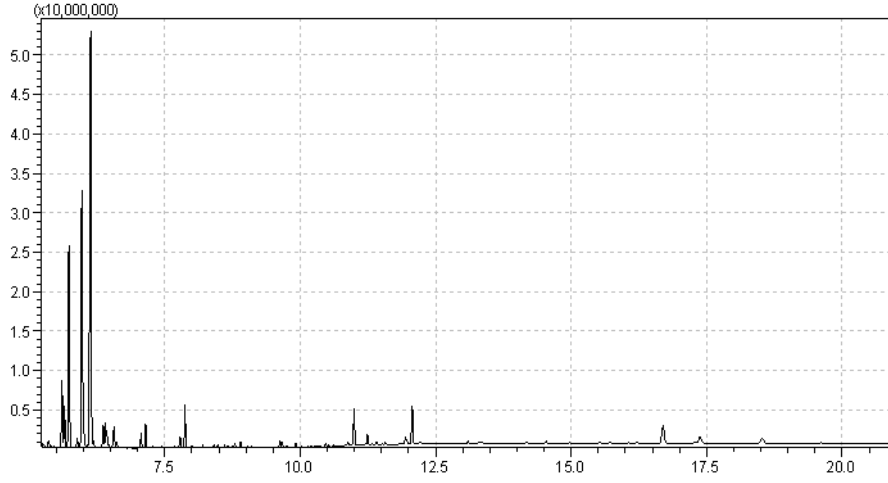
5-33-4-CS-3_5-33-4-CS-3_4



5-33-4-CI-1_5-33-4-CI-1_2



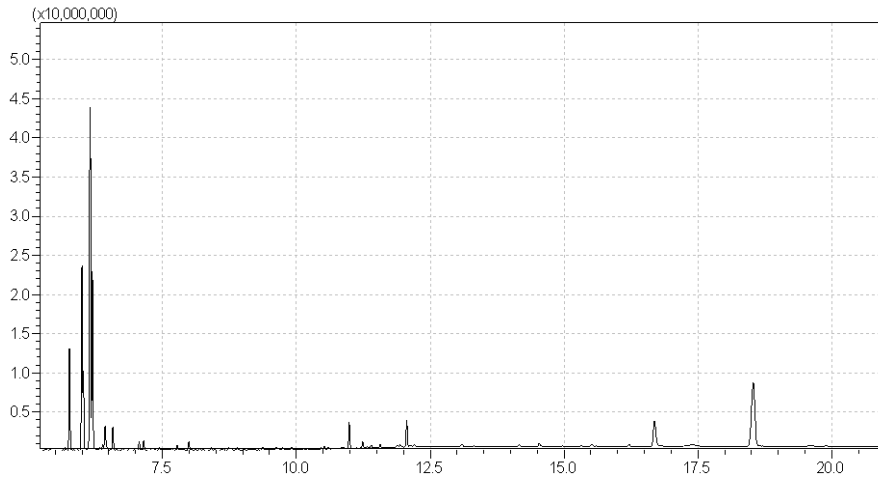
Görsel 3.32. *Halobacterium 5.s.* kültürü; hücre dışı, hücresel çözünen ve hücresel çözünmeyen



Görsel 3.33. *Halobacterium salinarum* 10. saat kültürü, hücre dışı metabolitleri kromatogramı

Tablo 3.17. *Halobacterium salinarum* 10. saat kültürü, hücre dışı metabolitleri

R.T.	Bileşen	Bağıl yüzde (%)
5.60	?3-Ethoxypropanol, TMS	4.10
5.65	?Ethoxy(dimethyl)isopropylsilane	2.59
5.73	Dihydroxyacetone, 2TMS	12.96
5.97	?Acetin, bis-1,3-trimethylsilyl ether	20.21
6.13	Glycerol, 3TMS	34.57
6.36	Benzeneacetic acid, TMS	1.48
6.41	Butanedioic acid, 2TMS	1.50
6.56	Glyceric acid, 3TMS	1.42
7.06	Pentanedioic acid, 2TMS	0.84
7.15	Tromethamine, 3TMS	1.43
7.78	Hexanedioic acid, 2TMS	0.69
	(Adipic acid, bis(trimethylsilyl) ester)	
7.87	Tromethamine, 4TMS	2.43
10.99	Palmitic Acid, TMS	2.30
12.06	Stearic acid, TMS	2.58
16.69	Glycerol monostearate, 2TMS	2.34
17.38	Lignoceric acid, TMS	0.75
18.52	5.alpha.-Cholestane	0.88

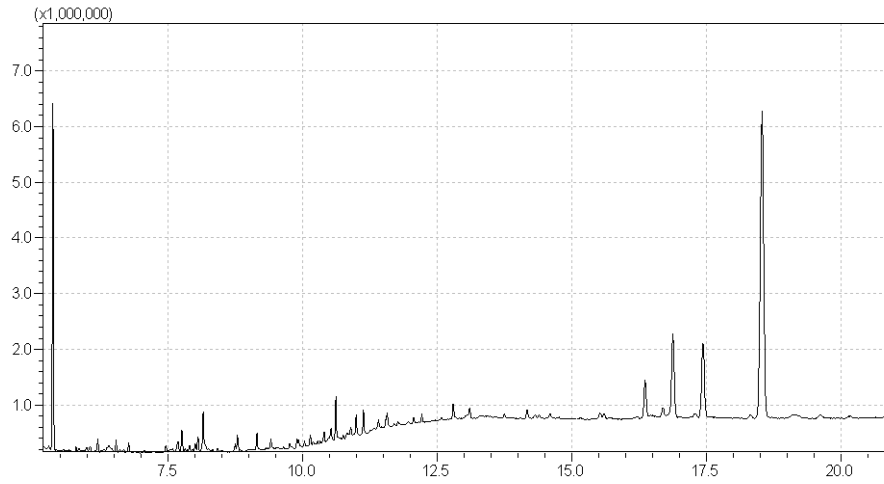


Görsel 3.34. *Halobacterium salinarum* 10. saat kültürü, hücresel çözünen metabolitlerinin kromatogramı

Tablo 3.18’de *Halobacterium salinarum* 10. saat kültürü, hücresel çözünen metabolitleri verilmiştir.

Tablo 3.18. *Halobacterium salinarum* 10. saat kültürü, hücresel çözünen metabolitleri

R.T.	Bileşen	Bağıl yüzde
5.77	Dihydroxyacetone, 2TMS	6.84
6.00	L-(+)-Threose, tris(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	13.20
6.03	Acetin, bis-1,3-trimethylsilyl ether?	4.47
6.15	Glycerol, 3TMS	29.70
6.19	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	12.10
6.39	Benzeneacetic acid, TMS	0.54
6.43	Butanedioic acid, 2TMS	2.49
6.58	Glyceric acid, 3TMS	1.68
7.07	Pentanedioic acid, 2TMS	0.83
7.15	Tromethamine, 3TMS	1.13
7.78	Hexanedioic acid, 2TMS (Adipic acid, bis(trimethylsilyl) ester)	0.58
8.00	L-5-Oxoproline, 2TMS	0.75
9.62	Azelaic acid, 2TMS	0.41
10.99	Palmitic Acid, TMS	1.85
12.06	Stearic acid, TMS	2.16
16.69	Glycerol monostearate, 2TMS	3.87
17.38	Lignoceric acid, TMS	0.96
18.54	5.alpha.-Cholestane	12.53



Görsel 3.35. *Halobacterium 10. saat kültürü, hücresel çözünmeyen metabolitlerinin kromatogramı*

Halobacterium salinarum 10. saat kültürünün, hücresel çözünmeyen metabolitleri;

Tablo 3.19. *Halobacterium salinarum 10. saat kültürü, hücresel çözünmeyen metabolitleri*

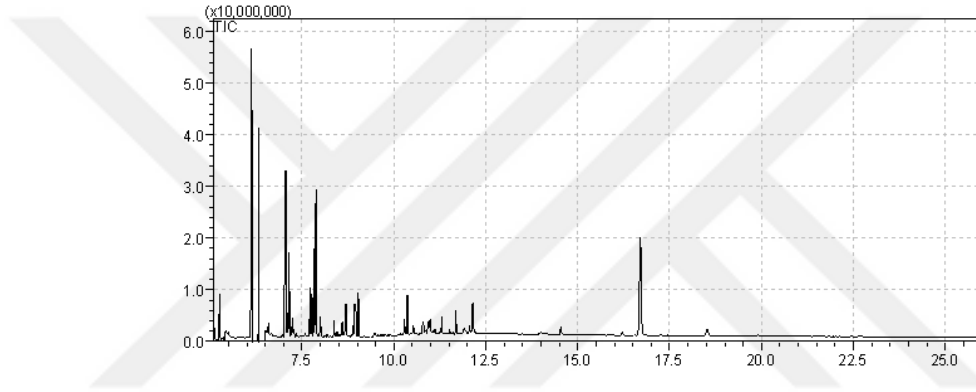
R.T.	Bileşen	Bağıl yüzde
5.35	Dodecamethyl- pentasiloxane	16.69
6.19	?8-Methyl-heptadecane,	0.55
6.53	Octadecane	0.50
8.14	?	2.13
9.14	..cosane	0.80
10.61	5-heptyldihydro-2(3H)-Furanone	1.97
10.99	Palmitic Acid, TMS derivative	1.14
11.12	?	1.00
16.36	? (E,E)-2,6-Dodecadien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-,	3.53
16.87	? Solanesol	8.60
17.43	Squalene	8.57
18.53	5- α -Cholestane	44.35

Türevlendirilerek Gaz Kromatografi ile elde edilen analizlerin sonucunda kullandığımız ekstraksiyon ve türevlendirme tekniğinin kullanılması ile sonuç alınabilmektedir

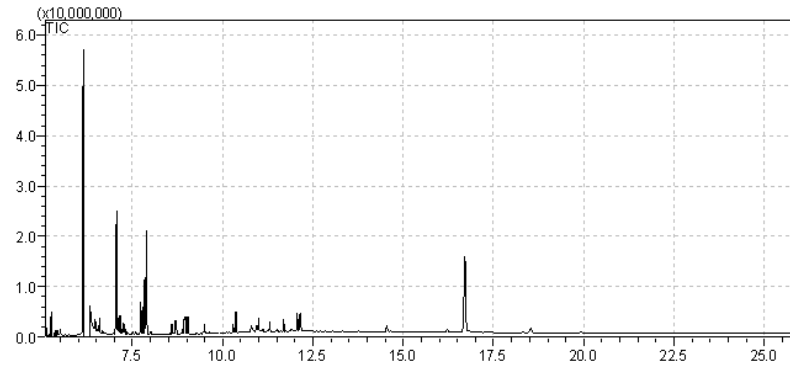
3.9.4. *Idiomarina* 16. ve 96. saatlik kültürlerinin hücre dışı ve hücre içi metabolit analizleri

MM63 minimal besiyerinde C kaynağı olarak Gliserol kullanılarak geliştirilen *Idiomarina* 16. ve 96. saatlik sıvı kültürlerinin hücre dışı ve hücre içi metabolit analizleri türevlendirme sonrası GC/MS ile gerçekleştirilmiştir.

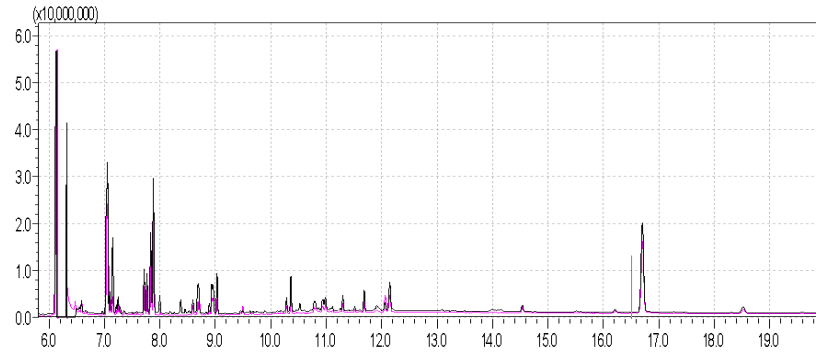
Aşağıda sırası ile *Idiomarina* 16. ve 96. saatlik sıvı kültürlerinin hücre dışı metabolitlerinin kromatogramları (Bkz. Görsel 3.36, Görsel 3.37), ve bu iki kromatogramın üst üste çakıştırılması ile elde edilen karşılaştırma kromatogramı verilmiştir (Bkz. Görsel 3.38).



Görsel 3.36. 16. saat inkübasyon sonrası elde edilen hücre dışı metabolitleri

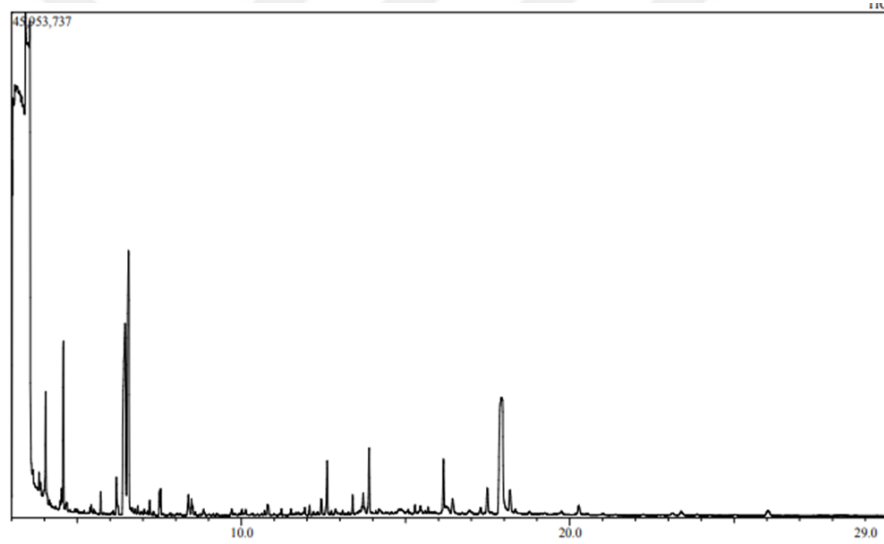


Görsel 3.37. 96. saat inkübasyon sonrası elde edilen hücre dışı metabolitleri

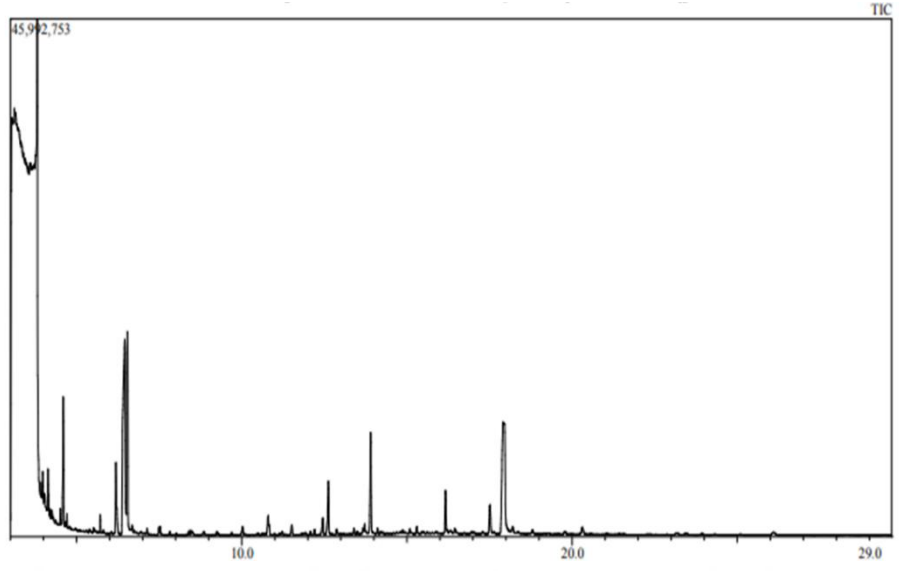


Görsel 3.38. 16. (Siyah) ve 96. (Mor) inkübasyon saatlerin karşılaştırılması

Aşağıda *Idiomarina* 16. ve 96. saatlik sıvı kültürlerinin hücre içi metabolitlerinin kromatogramları verilmiştir. (Bkz. Görsel 3.39 ve Görsel 3.40).



Görsel 3.39. 16. saat inkübasyon sonrası elde edilen hücre içi metabolitlerinin GC/MS kromatogramı



Görsel 3.40. 96. saat inkübasyon sonrası elde edilen hücre içi metabolitlerinin GC/MS kromatogramı

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

5 farklı tuzluluktan 304 izolat elde edilerek bunlardan 188'i için PZR'de kullanmak üzere kalıp DNA hazırlanmıştır. 121 adet izolat için 16S rRNA gen bölgesini çoğaltmaya yönelik PZR kurulup, ürünler %1 Agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. *MboI*, *XbaI*, *SpeI* ve *Hinf I* restriksiyon enzimleri ile toplam 162 ARDRA kesim reaksiyonu kurulmuş ve %2'lik agaroz jelde enzimatik kesim profilleri elde edilmiştir. Enzimatik kesim profillerine göre seçilen 39 (18 Bakteri; 21 Arke) izolat için 50 µl PZR kurulup elde edilen amplifikasyon ürünleri, dizilemeye gönderilmiştir. ARDRA kesim profillerine göre seçilen 50 izolat, sıvı besiyerinde tekrar geliştirilerek %20'lik gliserol ile stokları hazırlanmıştır.

Yüksek tuzluluklarda *Halorubrum* cinsine ait 14 izolatın 9 farklı türü, ayrıca 3 farklı *Haloarcula* türü belirlenmiştir. Ayrıca orta ve düşük tuzluluklarda başlıca farklı *Halomonas* türleri olmak üzere 15 farklı halofilik bakteri türü belirlenmiştir.

Yüksek tuzlulukta ve Basitrasin içeren sıvı ve katı MGM besi yerlerinde geliştirilerek izole edilen ikinci bir kültür çalışması sonrasında; *Halorubrum* (11 izolat), *Haloarcula* (5 izolat) ve *Haloferax* (3 izolat) cinsi arke üyeleri izole edilebilmiş ve stokları hazırlanmıştır. %25 ve %33 tuzlulukta gelişerek izole edilebilen bakteri cinsleri ise *Salicola*, *Halovibrio* ve *Halospina* cinsleri olmuştur.

Yüksek tuzlulukta ve Basitrasin içeren besi yerlerinde geliştirilerek izole edilen arke üyeleri çeşitlilik gösterirken, böyle ortamlarda geliştirilerek dizilenmek üzere seçilmiş olan bakterilere ait dizi sonuçları genellikle benzer bulunmuştur.

Yakın dönemde yapılan bir tez çalışmasında, Ayvalık Tuzlasından alınan 10 su örneğini farklı SG besiyerlerinde geliştirilerek belirlenen türler, *Halobacillus karajensis*, *Halobacillus alkaliphilus*, *Salegentibacter salarius*, *Halomonas alimentaria*, *Halomonas denitrificans*, *Actinopolyspora erythraea*, *Chromohalobacter beijerinckii*, *Marinobacter algicola*'dır. Ayrıca enzim ürettiği belirlenen 3 halofilik bakteri ise cins bazında (2 adet *Haloferax* sp., 1 adet *Saccharopolyspora* sp.) tespit edilebilmiştir. Ortalama 1.2×10^3 kob/mL kültüre edilebilir halofilik bakteri tespit etmişlerdir (Yılmaz, 2019).

Çamaltı Tuzlasından %6 and %32 arasındaki tuzluluk havuzlarından alınan örneklerle yapılan bakteriyel çeşitliliği tespit etmeye yönelik kültür bağımlı ve kültür bağımsız çalışmalar ile *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Halomonas* ve *Salinibacter* cinslerine ait türler tespit edilmiştir (Mutlu ve Güven 2015).

Yeni tamamlanan bir başka tez çalışmasında ise Tuz Gölünden kültür edilebilen prokaryotik çeşitlilik ise şu şekilde bulunmuştur. *Halorubrum lipolyticum* JCM 13559; *Halorubrum sodomense* JCM 8880; *Halorubrum californiense* FV_22B20; *Haloarcula salaria* HST01-2R; *Halorubrum chaoviator* DSM 19316; *Haloterrigena thermotolerans* PR5 ; *Haloarcula japonica* JCM 7785 (Kesbiç, 2020). Bu çalışmada kültüre edilen *Halorubrum* türleri bizim kültüre ettiklerimizle oldukça benzerdir.

Epifloresan mikroskop ile görüntüleme sonrasında gözlenmiştir ki; %33 tuzlulukta daha yaygın olarak düz ipliksi şekilli bakteri formları yaygın iken %25 tuzlulukta üstünlük kıvrık şekilli bakteriler yönündedir. Yine tuzluluk üst sınıra doğru yaklaştıkça *Haloqudratum* hücrelerinin boyutları artmaktadır. %16 tuzlulukta, taranan çoğu alanda *Dunaliella* hücreleri görülmektedir. Üst iki tuzluluk dışında oligonükleotid problemlerin ışıma sonuçları sayılabilecek kadar ayırt edici olamamıştır. Hibridizasyon tamponu hazırlanırken 700 µl yerine 900 µl formamid kullanılarak gerçekleştirilen ikinci yöntemle görüntü iyileştirilse de sağlıklı sayım yapılabilecek düzeyde iyileştirilememiştir. Ayrıca bu filtrelerle sayım yapılabilecek yeterli sayıda görüntüleme yapılamadığı için orta tuzluluklar için Arke Bakteri oranlarını belirlenmemiştir.

Çamaltı Tuzlasından yapılan ayrı bir örneklemede, %33 ve %25 tuzlulukta havuz suları, aynı gün ışık mikroskobunda incelendikten sonra ise *Dunaliella* hücrelerinin %25 tuzlulukta havuzda yaygın bulunduğu, bunların yanısıra oldukça yoğun bir şekilde basil formda mikroorganizmaların bulunduğu görülmüştür.

Değişken tuzlulukta havuz sularındaki DAPI ile boyanma sonrası sayılarak belirlenen prokaryotik hücre yoğunluğu; $(0.7-4.1) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ aralığında belirlenmiştir. Çamaltı Tuzlasında benzer tuzluluklarda belirlenen prokaryotik hücre yoğunlukları $(1.2-3.2) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ aralığında belirlenmiştir (Mutlu ve Güven, 2010).

İtalyadaki Margherita di Savoia Tuzlasında farklı tuzluluklardaki havuzlardaki Arke ve Bakterilerin taksonomik profillerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada DAPI ile boyama ile mL'deki prokaryotik hücre sayılarını daha düşük olarak belirlemişlerdir $(1.8-5.0 \times 10^5)$ ancak tuzluluğa bağlı hücre sayılarındaki değişim dağılımı bizim tespit ettiğimiz ile benzerdir, orta tuzlulukta hücre yoğunluğu daha yüksek belirlenmiştir (Leoni vd., 2020).

Havuz örneklerinden elde edilen katı madde miktarı, iki farklı yöntemle elde edilmiş. Metabolit analizi için örnek hazırlama aşamalarından biri olan su örneğini

konsantre etme işlemi hem konsantratör hem de liyofilizatör kullanılarak uygulanmıştır (Sogin vd., 2019).

Konsantre edilen örneklerde liyofilize edilenlere nazaran gliserol miktarlarında bir azalma göze çarpmaktadır. Konsantre ederek kurutma sonrasında pelteleşme meydana geldiği için örneklerin türevlendirme ajanı ile muamelesi öncesinde havanda ezilerek homojen hale getirilmesi işlemi uygulanması sırada gliserolun bir kısmının bu işlem sırasında kaybedilmiş olabileceği düşünülmektedir.

Tuzla havuz sularında bulunan metabolitleri belirlemeye yönelik yapılan analizler sonrasında tüm tuzluluktaki örneklerde gliserol, organik asitler ve yağ asitleri gibi bileşenler değişken oranlarda belirlenebilmiştir. Gliserol *Dunaliella* türleri tarafından üretilmekte ve heterotrofik halofilik organizmalar için ana karbon ve enerji kaynağı olarak kabul edilmektedir. Yüksek tuzluluklardaki ekosistemlerde heterotrofik prosesi sürdüren kilit bileşendir. *Dunaliella*'da sitoplazmanın ana bileşenidir ve çoğunun ortama salındığı düşünülmektedir. (Oren, 1993; 2015; 2017).

Sogin ve arkadaşlarının önerdiği deniz suyundaki metabolitlerin analizini tarif eden yöntem, elimizde mevcut olan kimyasallar kullanılarak ve türevlendirme aşamalarından biri olan metoksimasyon basamağı eksiltilerek uygulandı, analizler sonrasında farklı tuzluluklardaki tüm çevresel örneklerde gliserol, organik asitler ve yağ asitleri gibi bileşenler değişken oranlarda belirlenebilmiş ve bu yöntemin yüksek tuzluluklar için de uygulanabileceği gösterilmiştir.

AÜBİBAM'daki GC/MS sistemi ile gerçekleştirilen metabolomik analizlerde, BSTFA ile türevlendirme sonrasında elde edilen Trimetilsilil Eserlerinin tanımlanmasında Kütle Dedektörü sonuçları kullanılırken bileşenlerin bağıl yüzdelere belirlenmesi için FID Dedektör sonuçları kullanılmıştır.

Fen Fakültesinde gerçekleştirilen metabolomik analizlerde ise hem bağıl yüzdelere hem de tanımlamalar, Kütle Dedektörü verileri kullanılarak elde edilmiştir.

Çevresel örnekler, karışık mikroorganizma kültürü örnekleri ve izolatların ekstrasellüler metabolitleri çalışılırken 2 mL örnek materyali kullanılmıştır. Bu hacim GC/MS analizleri için yeterli olmuştur.

Saf kültürlerin hücre dışı, hücresel çözünen ve hücresel çözünmeyen fraksiyonları için de aynı türevlendirme yöntemini uygulanmış ancak kullanılan türevlendirici ajan miktarları hücresel fraksiyonlar için modifiye edilerek, daha az hacimde eklenerek uygulanmıştır.

Uygulanan bu modifikasyon, hücresel örnek hacminin az olması sebebi ile örnek konsantrasyonunu arttırmaya yönelik uygulanmıştır. Bu şekilde konsantrasyon arttırılmış olsa da bu kez analiz örneği hacmi azalmıştır. Bu duruma çözüm olarak ise başlangıç hacmi 4 mL'ye çıkartılarak türevlendirme sonrası analiz tekrarları için yeterli olabilecek hacim miktarına ulaşılmıştır.

Bu şekilde kültüre edilen örneklerle yapılan türevlendirme sonrası GC/MS çalışmalarda da dihidroksi aseton, gliserol türevleri, organik asitler, hidrokarbonlar, yağ asitleri gibi birçok madde grubunun yanısıra, iç standart olarak kullanılan 5 α -Kolestan da belirlenmiştir.

Halobacterium salinarum saf sıvı kültürlerinin hücre dışı, hücresel çözünen ve hücresel çözünmeyen fraksiyonlarının her üçü için de GC/MS analizleri yapılmış ve belirlenen metabolitler fraksiyonlar arası farklılıkları bakımından incelenebilmiştir.

Minimal sıvı besiyerinde karbon kaynağı olarak, gliserol eklenerek geliştirilen *Idiomarina* sp. saf kültürü, 16. saat ve 96. saatlik inkübasyonlar sonrasında, iki farklı zamanlı örnekleme yapılarak hücre içi ve hücre dışı metabolitleri için ekstraksiyon, kurutma ve türevlendirme sonrası GC/MS analizleri yapılmış ve belirlenen metabolitler bu iki farklı fraksiyon ve inkübasyon zamanları açısından incelenmiştir.

İki farklı örnekleme zamanı ve 2 fraksiyon için hazırlanan 4 örnek grubunun da başarılı bir şekilde türevlendirdiği ve analizi mümkün kılacak yeterli konsantrasyonda hazırlanabileceği görülmüştür.

Bu analizler sonrasında ortama eklenen gliserolün konsantrasyonunun oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak gliserolün yanısıra diğer madde gruplarının bulunduğu kromatogramlar elde edilmiş ve karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak;

1-İzmir Çamaltı Tuzlasının %9, %15, %19, %25 ve %33 tuzluluktaki havuzlardan alınan örneklerin, fizikokimyasal özellikleri, elementel iyonik bileşimlerinin yanısıra, konsantrasyon ve liyofilizasyon yöntemleri ile kurutularak katı madde miktarları ve ağırlıkça yüzdeleri belirlenmiştir. Elde edilen bu ürünler daha sonra metabolomik analizler için de kullanılmıştır.

2-Alınan örnekler daha sonra Cy3 işaretli farklı oligonükleotid problemleri ile hibridize edilerek görüntülenmek üzere Formaldehit ile in-situ fiksasyonları yapılarak incelenmiştir. Bu şekilde örnekleme sırasında fikse edilen örneklerde hücre

morfolojilerinin iyi korunduğu ve görüntülerin iyi olduğu gözlenmiş, bu yöntemin anlık mikroorganizma durumunun belirlenmesi için kullanılabileceği ortaya konmuştur.

3-Eşzamanlı yapılan DAPI boyamaları ile de farklı tuzluluklardaki toplam hücre sayısı belirlenebilmiştir.

4-Yapılan kapsamlı kültüre etme çalışmaları sonrasında; Yüksek tuzluluklarda *Halorubrum* cinsine ait 14 izolatın 9 farklı türü, ayrıca 3 farklı *Haloarcula* türü belirlenmiştir. Ayrıca orta ve düşük tuzluluklarda başlıca farklı *Halomonas* türleri olmak üzere 15 farklı halofilik bakteri türü belirlenmiştir. Yine üst iki tuzlulukta ve Basitrasın içeren sıvı ve katı MGM besi yerlerinde geliştirilerek izole edilen ikinci bir kültür çalışması sonrasında; *Salinibacter* (2 izolat) *Halorubrum* (11 izolat), *Haloarcula* (5 izolat) ve *Haloferax* (3 izolat) cinsi arke üyeleri izole edilebilmiş ve stokları hazırlanmıştır. %25 ve %33 tuzlulukta gelişerek izole edilebilen bakteri cinsleri ise *Salicola*, *Halovibrio* ve *Halospina* cinsleri olmuştur. İzole edilerek tanımlanan bu geniş çeşitlilikteki arke ve bakteri izolatları ilerideki çalışmalar için kullanılacak potansiyel oluşturmaktadır.

5-Farklı yöntemlerle hazırlanan artan tuzluluklarda çevresel örnekler, türevlendirilerek içerdikleri metabolitler GC/MS ile belirlenmiştir. Bu şekilde bir çalışma ülkemiz deki böyle çevresel ortamlar için için ilk defa olarak ortaya konmuştur.

6-Çevresel örneklerle uygulanan bu türevlendirme ve analiz yöntemi saf ve karışık kültürlerin hücre içi ve hücre dışı metabolitlerini de çalışabilecek şekilde modifiye ve adapte edilerek uygulanmış ve dihidroksi aseton, gliserol türevleri, organik asitler, hidrokarbonlar, yağ asitleri gibi birçok madde grubunun belirlenmesi ve değişiminin takip edilmesini mümkün kılmıştır.

Öneriler ve gelecekte yapılması planlanan çalışmalar;

Bu çalışmada izole edilerek dizi analizine gönderilen ve tanımlanan ve metabolik öneme sahip izolatlar için, farklı kültür ortamları ve karbon kaynakları kullanılarak türevlendirme sonrası GC/MS ile spesifik metabolitlerin analizi ve takibi çalışmaları çeşitlendirilecektir.

Türevlendirme gerektirmeyen ve daha geniş metabolit aralığı için analizi mümkün kılan Sıvı Kromatografik ve Spektroskopik yöntemler kullanılarak global metabolit analizlerini mümkün kılan daha kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilecektir.

Örnekleme sırasında sıvı azot tankı ile -85°C'de anında dondurularak taşınan çevresel havuz örnekleri için bu tez çalışması kapsamında saf kültürlerle uygulanan,

doğrudan liyofilizasyon ekstraksiyon ve türevlendirme basamaklarını içeren yöntem uygulanarak hücre içi ve hücre dışı metabolitler ayrı ayrı hazırlanarak değerlendirilecek şekilde analiz çalışması genişletilebilir.

Yüksek tuzluluk havuzlarındaki dominant türlerden olan *Salinibacter ruber*'in değişken tuzluluklara verdiği morfolojik ve metabolik cevapların eş zamanlı olarak takip edilerek, *Salinibacter* cinsinin, bu çalışma sırasında ışık mikroskobu ile gözlenen, azalan tuzluluk değerlerine karşın gösterdiği morfolojik farklılaşmanın o anki metabolomik değişimler ile ilişkilendirilerek takip edilmesi planlanmıştır.

Yüksek tuzluluk havuzlarındaki görece sınırlanan mikroorganizma çeşitliliği içinde, yaygın olarak bulunan iki ayrı mikroorganizma türü seçilerek geliştirilen ko kültürlerin, metabolomik analizlerinin yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Antó, J., Lucio, M., Peñ, A., Cifuentes, A., Brito-Echeverría, J., Moritz, F., Tziotis, D., López, C., Urdiain, M., Schmitt-Kopplin, P., Rosselló -Móra, R., and Brochier-Armanet, C. (2013). High metabolomic microdiversity within co-occurring isolates of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *PLoS ONE*, 8(5), 64701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064701>.
- Antón, J., Llobet-Brossa, E., Rodríguez-Valera, F., and Amann, R. (1999). Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environmental Microbiology*, 1(6), 517–523. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00065.x>.
- Benlloch, S., Acinas, S. G., Antón, J., López-López, Luz, S. P., and Rodríguez-Valera, F. (2001). Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: Culture versus PCR. *Microbial Ecology*, 41(1), 12–19. <https://doi.org/10.1007/s002480000069>.
- Bidle, K., Amadio, W., Oliveira, P., Paulish, T., Hicks, S., and Earnest, C. (2005). Research Article: A phylogenetic analysis of haloarchaea found in a solar saltern. *BIOS*, 76(2), 89–96. [https://doi.org/10.1893/0005-3155\(2005\)076\[0089:raapao\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1893/0005-3155(2005)076[0089:raapao]2.0.co;2).
- Birbir, M., Calli, B., Mertoglu, B., Bardavid, R. E., Oren, A., Ogmen, M. N., and Ogan, A. (2007). Extremely halophilic archaea from tuz lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3), 309–316. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9223-4>.
- Güven, K., Demirci, A., Mutlu, M. B., and KorcanS. E. (2010). Phenotypic characterization of halophilic bacteria isolated from çamaltı saltern in Turkey. In *Electronic Journal of BioTechnology* (Vol. 1, Issue 2). <https://www.researchgate.net/publication/266572970>.
- Burns, D. G., Camakaris, H. M., Janssen, P. H., and Dyll-Smith, M. L. (2004). Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an australian crystallizer pond are Cultivable. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5258. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5258-5265.2004>.
- Cayol, J.-L., Ollivier, B., Patel, B. K. C., Prensier, G., Guezennec, J., and Garcia, J.-L. (1994). Strictly anaerobic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. July 1994, p. 534-540, International Union of Microbiological Societies.
- Çelebier, M. (2014). Metabolomik çalışmalarda yazılım ve veritabanı desteği: LC-MS verilerinin değerlendirilmesinde XCMS kullanımı. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 23(2). <https://doi.org/10.17827/aktd.87412>.
- Çetinkuş, K. (2007). *Çamaltı tuzlası halofilik mikroorganizmalarının izolasyonu ve karakterizasyonu*. Yayımlanmamış Doktora Tezi. Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Çınar, S., ve Mutlu, M. B. (2016). Comparative analysis of prokaryotic diversity in solar salterns in eastern Anatolia (Turkey). *Extremophiles*, 20(5), 589–601. <https://doi.org/10.1007/S00792-016-0845-7/FIGURES/9>.
- Conde-Martínez, N., Acosta-González, A., Díaz, L. E., and Tello, E. (2017). Use of a mixed culture strategy to isolate halophilic bacteria with antibacterial and cytotoxic activity from the Manaure solar saltern in Colombia. *BMC Microbiology*, 17(1), 230. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1136-x>.
- Dyall-Smith, M. (2008). The Halohandbook: Protocols for halobacterial genetics. *Mark Dyall-Smith, Martinsried, Germany, March, 1–144*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1750.5441>.
- Ekin, E. (2008). *İzmir Çamaltı tuzlasından polibetahidroksibütirat (PHB) üreticisi halofilik mikroorganizmaların izolasyonu, fenotipik karakterizasyonu ve PHB üretim yeteneklerinin araştırılması* Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Extremophiles Handbook. (2011). In *Extremophiles Handbook*. Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1>.
- Gareeb, A. P., and Setati, M. E. (2009). Assessment of alkaliphilic haloarchaeal diversity in Sua pan evaporator ponds in Botswana. *African Journal of Biotechnology*, 8(2), 259–267. <http://www.academicjournals.org/AJB>. (Erişim tarihi: 10.05.2025)
- Gómez-Villegas, P., Vigara, J., and León, R. (2018). Characterization of the microbial population inhabiting a solar saltern pond of the odiel Marshlands (SW Spain). *Marine Drugs*, 16(9). <https://doi.org/10.3390/md16090332>.
- Javor, B. J. (1984). Growth Potential of Halophilic Bacteria Isolated from Solar Salt Environments: Carbon Sources and Salt Requirements. In *Applied and Environmental Microbiology*. Aug. 1984, p. 352-360. American Society for Microbiology.
- Joghee, N. N., & Jayaraman, G. (2014). Metabolomic characterization of halophilic bacterial isolates reveals strains synthesizing rare diaminoacids under salt stress. *Biochimie*, 102(1), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.02.015>
- Jones, O. A. H., Maguire, M. L., Griffin, J. L., Dias, D. A., Spurgeon, D. J., and Svendsen, C. (2013). Metabolomics and its use in ecology. *Austral Ecology*, 38(6), 713–720. <https://doi.org/10.1111/AEC.12019>.
- Koru, E. (2004) Çamaltı tuzlası (İzmir, Türkiye) ekosisteminde Artemia ve önemi. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi* 21 (1-2), 187 – 189.
- Manikandan, M., Kannan, V., and Pašić, L. (2009). Diversity of microorganisms in solar salterns of Tamil Nadu, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6), 1007–1017. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9980-y>.
- Mani, K., Salgaonkar, B. B., and Braganca, J. M. (2012). Culturable halophilic archaea at the initial and crystallization stages of salt production in a natural solar saltern of Goa, India. *Aquatic Biosystems*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-15>.
- Mashego, M. R., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W., and Heijnen, J. J. (2007). Microbial metabolomics: Past, present and future methodologies. In

- Biotechnology Letters*, (Vol. 29, Issue 1, pp. 1–16). <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9218-0>.
- Maturrano, L., Santos, F., Rosselló-Mora, R., and Antón, J. (2006). Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3887–3895. <https://doi.org/10.1128/AEM.02214-0>.
- Mutlu, M. B., ve Güven, K. (2011). Çamaltı tuzlası/Türkiye prokaryotik mikrobiyal kmmünitelerinin fluoresan in situ hibridizasyon (FISH) ve eş zamanlı PZR teknikleri ile tespiti. *Turkish Journal of Biology*, 35(6), 687–695. <https://doi.org/10.3906/biy-1010-151>.
- Mutlu, M. B., and Güven, K. (2015). Bacterial diversity in Camalti Saltern, Turkey. *Polish Journal of Microbiology*, Vol. 64, No 1, 37–45.
- Oren, A. (2015a). Halophilic microbial communities and their environments. In *Current Opinion in Biotechnology*, (Vol. 33, pp. 119–124). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.005>.
- Oren, A. (2015b). Halophilic microbial communities and their environments. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 33, pp. 119–124). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.005>
- Oren A. (2002). *Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Özen, G. (2009). *Metabolomik ve fluksomik çalışmalar ile kolon kanserinde kemoterapötiklere karşı direncin in vitro değerlendirilmesi*. Yayımlanmamış Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Özer, Ö. (2018). *Meme kanserli hastalarda plazmadan metabolik yöntemlere beyin metastazlarının erken tespiti için belirteç saptama*. Uzmanlık Tezi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı.
- Pašić, L., Ulrih, N. P., Črnigoj, M., Grabnar, M., and Velikonja, B. H. (2007). Haloarchaeal communities in the crystallizers of two adriatic solar salterns. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(1), 8–18. <https://doi.org/10.1139/W06-091>.
- Pir, P. (2005). Intergrated analysis of metabolome profiles and gene expression in respiratory deficient deletion mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Thesis For The Degree of Doctor of Philosophy. Boğaziçi University.
- Reasoner, D. J., and Geldreich, E. E. (1985). A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 49, Issue 1). <https://journals.asm.org/journal/aem> (Erişim tarihi: 05.04.2025).
- Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G., and Imhoff, J. F. (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbial Ecology*, 11(2), 107–115. <https://doi.org/10.1007/BF02010483/METRICS>.
- Rosselló-Mora, R., Lucio, M., Pěa, A., Brito-Echeverría, J., López-López, A., Valens-Vadell, M., Frommberger, M., Antón, J., and Schmitt-Kopplin, P. (2008). Metabolic

- evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *ISME Journal*, 2(3), p.242–253. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.93>.
- Sabet, S., Diallo, L., Hays, L., Jung, W., and Dillon, J. G. (2009). Characterization of halophiles isolated from solar salterns in Baja California, Mexico. *Extremophiles*, 13(4), 643–656. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0247-1>.
- Saiz-Jimenez, C., & Laiz, L. (2000). Occurrence of halotolerant halophilic bacterial communities in deteriorated monuments. *International Biodeterioration & Biodegradation* (Vol. 46). www.elsevier.com/locate/ibiod (Erişim tarihi: 15.04.2025).
- Sariyar-Akbulut, B., Salman-Dilgimen, A., Ceylan, S., Perk, S., Denizci, A. A., and Kazan, D. (2008). Preliminary phenotypic characterization of newly isolated halophilic microorganisms by footprinting: A rapid metabolome analysis. *Archives of Microbiology*, 189(1), 19–26. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0289-7>.
- Sezgin, A. (2005). *16S rDNA analysis of microbial communities in anoxic marine sediments of the Marmara sea*. Thesis For The Degree of Master of Science In Environmental Sciences, BS in Bioolgy. Istanbul University.
- Simon, R. D., Abeliovich, A., and Belkin, S. (1994). A novel terrestrial halophilic environment: The phylloplane of *Atriplex halimus*, a salt-excreting plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 14(2), 99–109. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1994.tb00097.x>.
- Sogin, E. M., Puskás, E., Dubilier, N., and Liebeke, M. (2019). Marine Metabolomics: a Method for Nontargeted Measurement of Metabolites in Seawater by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *MSystems*, 4(6), 1–18. <https://doi.org/10.1128/msystems.00638-19>.
- Ventosa, A., Fernández, A. B., León, M. J., Sánchez-Porro, C., and Rodriguez-Valera, F. (2014). The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. In *Extremophiles*, (Vol. 18, Issue 5, pp. 811–824). Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0681-6>.
- Viver, T., Cifuentes, A., Díaz, S., Rodríguez-Valdecantos, G., González, B., Antón, J., & Rosselló-Móra, R. (2015). Diversity of extremely halophilic cultivable prokaryotes in Mediterranean, Atlantic and Pacific solar salterns: Evidence that unexplored sites constitute sources of cultivable novelty. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.002>.
- Yılan, G. (2011). *Microbial adaptation to stress conditions using an integrative modelling and experimental approach*. Thesis For The Degree of Master of Science. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yılmaz M., M. (2019). *Ayvalık tuzlası (Balıkesir)’ndan halofilik bakterilerin izolasyonu ve biyoteknolojik enzim potansiyellerinin araştırılması*. Yayınlanmamış. Yüksek Lisans Tezi. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

ÖZGEÇMİŞ

ORCID NO: 0000-0002-3720-6163

Ad Soyda : Şenay ESER

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Geçmişi:

- 1999-2001, Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- 2001-2004, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognози Anabilim Dalı
- 2016-..., Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Mesleki Geçmişi;

- 2003-2005, Burslu Öğrenci, Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi (AÜBİBAM)
- 2005-2018, Uzman, Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi (AÜBİBAM)
- 2019- ..., Öğr. Gör., Anadolu Üniversitesi, Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (AÜBİBAM)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- **Arıkan, Ş.**, Saltan Z., Öncü Kaya M., (2004).“*Olea europaea* var. *europaea*, Zeytin Meyvasından İzole Edilen Oleuropein’in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Tayini”, 30.06-02.07.2004, Vth Ulusal Kromatografi Kongresi, Eskişehir.
- Kürkçüoğlu M., **Arıkan Eser Ş.**, Başer K.H.C.B., (2016). “Composition of the essential oil of the *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* (Bieb.) Arcangeli”. Nat. Volatiles & Essent. Oils, 3(2): 15-19.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- **Eser Ş.**, Büyüktiryski S., Genç L., (2014). “Determination of fatty acid composition of the oil obtained

- from seeds of *Abies nordmanniana* stev Spach subs *nordmanniana* growing in Artvin Turkey”. 30th International Symposium on Chromatography, 14.09.-18.09.2014, Salzburg, Avusturya.

