

**ÇAMALTI TUZLASI
HALOFİLİK MİKROORGANİZMALARININ
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Kezban ÇETİNKUŞ
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos, 2007

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kezban ÇETİNKUŞ'un "Çamaltı Tuzlası Halofilik Mikroorganizmalarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 20.07.2007 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. KIYMET GÜVEN
Üye : Prof. Dr. MERİH KIVANÇ
Üye : Yard. Doç. Dr. MUSTAFA YAMAÇ

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇAMALTI TUZLASI HALOFİLİK MİKROORGANİZMALARININ İZOLASYONU ve KARAKTERİZASYONU

Kezban ÇETİNKUŞ

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN
2007, 97 Sayfa**

Bu çalışmada Çamaltı Tuzlası Halofilik prokaryotlarının identifikasyonu amaçlanmıştır. Çamaltı Tuzlasından su ve toprak örnekleri alınmıştır. Farklı besiyerleri kullanılarak 34 adet aerobik halofilik bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu izolatların bazı biyokimyasal ve antibiyotiklere duyarlılık testleri yapılmıştır. Farklı koloni morfolojisine sahip 34 adet izolatın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Archaea ve Bacteria ayrımı yapılarak 19 adet izolatın Archaea, 15 adet izolatın Bacteria domainine ait olduğu belirlenmiştir. Kommünite analizine yönelik, kültür bağımsız bir test olan Fluoresan In situ Hibridizasyon (FISH) metodu uygulanarak Bacteria/Archaea sayıları tesbit edilmiştir. FISH çalışmaları ile Bacteria üyelerinden *Salinibacter*'in Çamaltı Tuzlası'ndaki varlığı ilk olarak ortaya konmuştur. DAPI boyamaları ile örneklerdeki Archaea, Bacteria ve toplam hücre sayıları açığa çıkarılmıştır. Bacteria domainine ait olduğu belirlenen izolatların Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) analiz edilerek yağ asidi profilleri çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çamaltı Tuzlası, Halofilik Archaea/Bacteria, FISH, PZR

ABSTRACT**Master of Science Thesis****ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS
FROM ÇAMALTI SALTERN****Kezban ÇETİNKUŞ****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN
2007, 97 Pages**

In this study, identification of halophilic prokaryotes from Çamaltı Saltern were aimed. Water and soil samples were taken from pools of Çamaltı Saltern. A total of 34 aerobical strains were isolated by using different media and biochemical tests and their antibiotic resistance were performed. 34 strains differed in colony morfology were tested by PCR for domain determination and 19 of the isolates were identified as Archaea and 15 of the isolates were identified as Bacteria. FISH method was used as a culture independent method for community analyses. *Salinibacter* in Çamaltı Saltern was recorded for the first time by using FISH. Archaea, Bacteria and total microorganism numbers were calculated by using DAPI staining. Fatty acid analysis of 15 of the isolates which were identified in bacteria domain were done to determine fatty acid profiles.

Keywords: Çamaltı Saltern, Halophilic Archaea/Bacteria, FISH, PZR

TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun seçiminde ve çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her zaman bilgisine ve deneyimlerine başvurduğum, her türlü yardım ve katkılarını benden esirgemeyen değerli Hocam Prof. Dr. Kıymet GÜVEN'e sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a, çok teşekkür ederim.

Bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ersin YÜCEL'e teşekkür ederim.

Tezim boyunca her türlü yardımı benden esirgemeyen hocam Arş. Gör. M.Burçin MUTLU'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardım ve dayanışmalarından ötürü tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Verdikleri eğitimle bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme teşekkür ederim.

Tüm çalışmam boyunca göstermiş olduğu fedakarlıktan dolayı babam Fikret ÇETİNKUŞ'a teşekkür ederim.

Kezban ÇETİNKUŞ

Ağustos, 2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
SUMMARY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1.Tuz ve Tuzlu Ortamlar.....	1
1.2. Araştırma Bölgesinin Tanıtımı.....	6
1.3.Halofilik Mikroorganizmalar.....	11
1.3.1.Halofilik Archaea.....	12
1.3.2.Halofilik Bacteria.....	13
1.4.Halofilik Mikroorganizmaların İdentifikasyonu.....	14
1.4.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	16
1.4. 2.Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi.....	18
1.5.Mikrobiyal Komünite Analizlerinde Fluoresan In situ Hibridizasyon (FISH) uygulamaları.....	19
1.6.Halofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Potansiyelleri.....	20
2. MATERYAL VE YÖNTEM	24
2.1.Materyal.....	24
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	24
2.1.1.1.MedyumA.....	24
2.1.1.2.MedyumB.....	24
2.1.1.3.MedyumC.....	25
2.1.1.4.MedyumD.....	25
2.1.1.5.MedyumE.....	25

2.1.1.6.MedyumHaloarcula.....	26
2.1.1.7.%12 MGM (Modifiye Geliştirme Medium).....	26
2.1.1.8.%18 MGM (Modifiye Geliştirme Medium).....	27
2.1.1.9.%23 MGM (Modifiye Geliştirme Medium).....	27
2.1.1.10.%25 MGM (Modifiye Geliştirme Medium).....	27
2.1.1.11.%25 Deniz Suyu (SW)(g/lt).....	28
2.1.1.12.Nişasta Besiyeri.....	28
2.1.2.Çalışmada Kullanılan Çözeltiler.....	29
2.1.2.1.%25 Deniz Suyu (SW)(g/lt).....	29
2.1.2.2.%30'lukTuzlu SuÇözeltisi.....	29
2.1.2.3.TAE 50X (1ltiçin).....	29
2.1.2.4.TBE5X (1 lt için).....	30
2.1.2.5.PBS10X	30
2.1.2.6.Elektroforez için Yükleme Tamponu (6X).....	30
2.1.2.7.InSitu Hibridizasyon Tamponu.....	31
2.1.2.8.FISH için YıkamaTamponu.....	31
2.1.2.9.Yağ Asidi AnaliziSolüsyonları.....	31
2.2.METOD.....	32
2.2.1. Örneklerin Toplanması.....	32
2.2.1.1.Su örneklerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	32
2.2.1.2.Toprak örneklerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	33
2.2.2. Su ve Toprak Örneklerinden Canlı Bakteri Sayımı ve İzolasyonu.....	34
2.2.3. İdentifikasyon.....	34
2.2.3.1 Morfolojik ve Biyokimyasal Testler.....	34
2.2.3.2. Antibiyotiklere Duyarlılık Testi.....	35
2.2.3.3. PCR ile identifikasyon.....	35
2.2.3.4. Yağ Asidi Analizi.....	37

2.2.3.5. Fluoresan in situ Hibridizasyon (FISH) ile Archaea ve Bacteria populasyonlarını belirlenmesi.....	38
3.BULGULAR	40
3.1. Örneklerin Toplanması.....	40
3.2. Örneklerdeki Toplam Tuz ve pH Değerlerinin Belirlenmesi.....	41
3.3. Su örneklerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	41
3.4. Toprak örneklerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	43
3.5. Su ve Toprak Örneklerinde Canlı Mikroorganizma Sayımı.....	43
3.6. Su ve Toprak Örneklerinden Archaea ve Bacteria İzolasyonu.....	45
3.7. İdentifikasyon.....	52
3.7.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Testler.....	52
3.7.2. Antibiyotiklere Duyarlılık Testi.....	57
3.7.3. Nükleik Asid Analizine Dayalı Testler.....	60
3.7.4. Yağ Asidi Analizi.....	63
3.8. Fluoresan in situ Hibridizasyon (FISH) ile Archaea ve Bacteria populasyonlarının belirlenmesi.....	68
4. TARTIŞMA	78
KAYNAKLAR	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. İzmir Çamaltı Tuzlası 1. Üretim Merkezi.....	7
1.2. İzmir Çamaltı Tuzlası 2. Üretim Merkezi.....	8
1.3. Çamaltı Tuzlası Genel Görünüşü ve Örnek Alınan Havuzlar.....	10
3.1. Farklı pigmentasyona sahip izolatların agar üzerindeki görüntüleri.....	46
3.2. Farklı pigmentasyona sahip izolatların sıvı ortamdaki görüntüleri	51
3.3. Modifiye Gram boyama işlemi sonrası Gram negatif olarak boyanmış kok şekilli hücreler.....	54
3.4. Modifiye Gram boyama işlemi sonrası Gram pozitif olarak boyanmış kok şekilli hücreler.....	55
3.5. İzolatların farklı karbon ve şeker kaynaklarını kullanabilme yetenekleri.....	55
3.6. İzolatların farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetlerinin agar üzerindeki görünümü.....	60
3.7. 16S rRNA geni amplifikasyon ürünleri (A=Archaea primerleri ile reaksiyon ve Bacteria primerleri ile reaksiyon).....	61
3.8. Yağ Asidleri Profillerine Göre Çamaltı Tuzlası Bacteria İzolatları arasındaki Benzerlik Oranı.....	64
3.9. Su Örneklerinde DAPI Boyama.....	72
3.10. Su Örneklerinde Arc915 probu ile hibridizasyon sonrası ışığa veren Archaea Hücreleri.....	74

Şekil 3.11. Su Örneklerinde Eub 338 probu ile hibridizasyon sonrası	
ışıkma veren Bacteria hücreleri.....	76
Şekil 3.12.Su Örneklerinde EHB 412 probu ile hibridizasyon sonrası	
ışıkma veren <i>Salinibacter</i> hücreleri.....	76
Şekil 3.13.Toprak örneklerinde Arc 915 probu ile hibridizasyon	
sonrası ışıkma veren Archaea hücreleri.....	77
Şekil 3.14.Toprak örneklerinde Eub 338 probu ile hibridizasyon	
sonrası ışıkma veren Bacteria hücreleri.....	77
Şekil 3.15. Toprak örneklerinde EHB 412 probu ile hibridizasyon	
sonrası ışıkma veren <i>Salinibacter</i> hücreleri.....	78
3.11. Su Örneklerinde Eub 338 probu ile hibridizasyon sonrası	
ışıkma veren Bacteria hücreleri.....	75
3.12. Su Örneklerinde EHB 412 probu ile hibridizasyon sonrası	
ışıkma veren <i>Salinibacter</i> hücreleri.....	75
3.13. Toprak örneklerinde Arc 915 probu ile hibridizasyon	
sonrası ışıkma veren Archaea hücreleri.....	76
3.14. Toprak örneklerinde Eub 338 probu ile hibridizasyon	
sonrası ışıkma veren Bacteria hücreleri.....	76
3.15. Toprak örneklerinde EHB 412 probu ile hibridizasyon	
sonrası ışıkma veren <i>Salinibacter</i> hücreleri.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

2.1. Çalışmada Kullanılan FISH Problarının Özellikleri.....	38
3.1. Örneklerin Arazide Ölçülen Toplam Tuzluluk ve pH Değerleri.....	40
3.2. Çamaltı Tuzlası Su Örneklerinin Kimyasal Analizi.....	42
3.3. Çamaltı Tuzlası Toprak Örneklerinin Kimyasal Analizi.....	43
3.4. Çamaltı Tuzlası Su Örneklerinin Canlı Bakteri Sayımı.....	44
3.5. Çamaltı Tuzlası Toprak Örneklerinin Canlı Bakteri Sayımı.....	45
3.6. Çamaltı Tuzlasında İzole Edilen İzolatların Gram Reaksiyonları, Koloni Morfolojileri ve Pigmentasyon.....	52
3.7. Katalaz Reaksiyonu Sonuçları.....	56
3.8. Nişasta Hidrolizi Testi Sonuçları.....	57
3.9. İzolatların Farklı Antibiyotiklere Karşı Hassasiyetleri.....	58
3.10.16S rRNA ürünlerine göre izolatların ait oldukları domain (Archaea ya da Bacteria).....	62
3.11. FAME Analizine Göre Çamaltı Tuzlası Bacteria İzolatlarının İdentifikasyon Sonuçları.....	65
3.12. Çamaltı Tuzlası Bacteria İzolatlarının %1 ve Daha Fazla oranda içerdikleri Yağ Asidlerinin Ortalaması ve Standart Sapması.....	68

3.13. DAPI Yöntemi ile Çamaltı Tuzlası Su Örneklerindeki	
Toplam Hücre Sayıları.....	70
3.14. DAPI Yöntemi ile Çamaltı Tuzlası Toprak	
Örneklerindeki Toplam Hücre Sayıları.....	71
3.15. FISH yöntemi ile Çamaltı Tuzlası örneklerindeki Bacteria,	
Archaea, <i>Salinibacter</i> ve toplam hücre sayıları.....	73

1. GİRİŞ

Sodyum klorürün doyma noktasına yakın veya doyma noktasında olduğu ortamlar hipersalin (aşırı derecede tuzlu) ortamlar olarak adlandırılmaktadır. Hipersalin (aşırı derecede tuzlu) çevreler sınıfına giren ve ülkemizin tuz ihtiyacının büyük bir kısmını karşılayan İzmir Çamaltı Tuzlası'nın halofilik prokaryotik organizmalarının ortaya konması bu çalışmadaki başlıca amacı oluşturmaktadır.

Aşırı derecede halofilik bakteriler, ekstrem koşullara uyum göstermiş özel yapıları nedeniyle biyoteknoloji alanında çalışan birçok araştırmacının ilgisini çeken organizmalardır. Aşırı tuzluluğa dayanıklı enzimleri, tuzluluğa karşı koyabilmek için kullandıkları stratejiler, zor şartlarda enerji üretimine olanak sağlayan özel proteinlerinin varlığı ve bunlar gibi kendilerine has olan özellikleri, onların biyoteknoloji alanında son derece değerli araçlar olarak görülmesine yol açmaktadır. Bu nedenle aşırı derecede halofilik bakterilerin tanımlanması ve hücre yapılarının ortaya konulması gerekmektedir.

Çamaltı Tuzlası'nda bulunan havuzlardan 15 su örneği ve 5 toprak örneği alınmıştır. Kültüre alınmış örneklerden saf bakteri izolasyonu yapılmış ve Archaea ve Bacteria domainlerine ait mikroorganizmalar ayırdedilmiştir. Kültür edilemeyen organizmalar Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen izolatlar sahip oldukları sistemler(bakteriosinleri, enzimleri, pigmentleri) nedeniyle çeşitli biyoteknolojik araştırmalarda kullanılma potansiyeline sahiptirler.

1.1. TUZ VE TUZLU ORTAMLAR

Tuz, yaşamsal öneminden dolayı insanoğlunun eskiden beri çok iyi bildiği ve günlük yaşamında sık kullandığı bir mineraldir. İnsanın tuzu kullanmaya ne zaman başladığı kesin olarak bilinmese de bu sürenin M.Ö 1000 yılına kadar gittiği düşünülmektedir (Koday 1999).

Tuz, doğada bol miktarda bulunan, besinlere tat verici ve koruyucu madde

olarak kullanılan, kristal yapılu bir sodyum klorür (NaCl) bileşiğidir. Küp biçimli kristaller halinde bulunan tuz, içerdiği maddelere bağlı olarak renksiz, saydam yada yarı saydam olabilir. Tuz, hidroskobik bir maddedir, yani normal koşullarda atmosferdeki nemi tutar. Tuzun suya karşı ilgisini gösteren başka bir özelliği de, suda kolayca çözünebilmesidir. 25°C’de 100 ml su içinde 36 gr tuz çözünebilir. Sıcaklık yükseldikçe tuzun çözünürlüğü de artar. Ayrıca tuz suda çözüldükçe suyun sıcaklığı da düşer. Örneğin, 15 °C deki 100 ml suda 36 gr tuz çözüldüğünde, oluşan çözeltinin sıcaklığı yaklaşık 3,3 °C ile 5,5°C arasında azalır. Tuz 427°C’de erir, daha yüksek sıcaklıklarda ise buharlaşır. 0°C’deki özgül ağırlığı 2,165’tir, yani ağırlığı suyun ağırlığının 2,165 katı kadardır (Ana Britannica, 1990). Eski çağlardan beri besinlerde katkı maddesi olarak kullanılan tuz, günümüzde kimya sanayiinin en önemli ham maddelerinden biri olmuştur. Tuz, denizlerde, göllerde, yer altı sularında erimiş halde ve yer altında kaya tuzu şeklinde bulunur (Oren 1997, Ventosa 1997, Grant 1997).

Tuzlu ortamların gruplandırılmasında iki ana faktör kullanılmaktadır. Birincisi, tuzun orjini ve yapısıdır. Çoğu aşırı tuzlu sular, deniz suyunun buharlaşması sonucu oluşur. Bu şekilde oluşan ortamlara ‘Thalassohaline Ortamlar’ denir. Klor sülfatlı suların hepsi bu gruba dahildir. Örnek olarak ABD’deki Great Salt Lake (Büyük Tuz Gölü) verilebilir. Diğer tuzlu ortamlar ise kıtasal orjinli tuzların çözünmesinden oluşmaktadır. Bu ortamların kimyasal madde içerikleri deniz suyundan farklıdır ve bu şekilde oluşan ortamlara ‘Athalassohaline Ortamlar’ denir (Valera 1988).

Aşırı tuzlu ortamları gruplandırmada kullanılan ikinci faktör ise tuz konsantrasyonlarıdır. Aşırı tuzluluğun alt limiti, araştırmacılara göre, %3-12 oranları arasında değişmektedir. Bu sulardaki yüksek konsantrasyonunun, canlı tür çeşitliliğinin aşırı azalmasında birinci faktör olduğu düşünülmektedir. Araştırmacılara göre %10-12 tuzluluk oranı, orta derece tuzluluk olarak adlandırılmaktadır. Bu tuzlu ortamlara ‘Mesosaline Ortamlar’ denilmiştir. Thalassohaline ortamlar için üst limit tuz konsantrasyonu %35’tir. Bu ortamlarda NaCl bol miktarda çöker ve tuzların oranı Mg^{+2} hakimiyetine doğru kayar, suda en yüksek tuz olarak Mg^{+} iyonu bulunur. Bununla beraber NaCl’ in çökeldiği ortamlarda, biyolojik formların hepsi için, yaşam direnci üst limittedir (Javor

1984).

Aşırı tuzlu göllerdeki iyonlar çevrenin topografisine, jeolojisine ve genel iklim durumlarına göre değişebilir. ABD Utah'taki Büyük Tuz Gölü'nde genellikle konsantre olmuş deniz suyu bulunur. Bu sebepten çeşitli iyonların nispi oranları deniz suyundakine benzemektedir. Büyük Tuz Gölü'ndeki en yaygın katyon sodyum, en yaygın anyon ise klorid'dir. Ortamın pH'ı alkali olduğundan önemli miktarda sülfat bu ortamda bulunur. Bunun aksine Ölü Deniz gibi aşırı tuzlu ortamlarda, sodyum oranı oldukça düşük olmasına rağmen çevredeki kayaların yüksek magnezyum mineraline sahip olması nedeniyle magnezyum miktarı yüksektir. Soda göllerinin kimyasal içeriği, Büyük Tuz Gölü'nün kimyasal içeriği ile benzerdir fakat soda göllerini çevreleyen kayalardan dolayı soda göllerinde yüksek seviyede karbonat minerali bulunur. Soda göllerinin pH'sı oldukça yüksek olup 10 – 12 arasındadır (Valera 1993).

Çoğu çevrelerde bulunan tuzun orjini deniz suyudur. Okyanus suyunun asıl iyonları Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Sr^{+2} , Cl^- , SO_4^{-2} , HCO_3^- , Br^- , F^- , H_3BO_3 'dur. Cl^- (%55,04) ile SO_4^{-2} (%7,68) baskın anyonlar ve Na^+ (%30,61) ile Mg^{+2} (%3,69) baskın katyonlardır. Genellikle okyanuslardaki tuzluluk oranı sabittir ve ortalama tuzluluk oranı %3,5'tur. Okyanuslardaki tuz çeşitlerinin konsantrasyonunun zaman içinde değişip değişmediği bilinmemektedir. Okyanustaki tuzluluk oranının son 200 milyon yıldır sabit kaldığı açıklanmıştır (Oren 1993).

Aşırı tuzlu sular, kıtasal veya meteorik sular tarafından kayalardaki tuzların çözünmesiyle oluşabilir. Tuzlar, geçirgen olmayan bir havzada toplandıklarında, buharlaşma yoluyla konsantre olurlar. Bu tip çevreler oldukça çeşitlidir ve sık olarak görülmektedir (Encyclopaedia International, 1963).

Deniz suyundan tuzun elde edilmesi için çoklu havuz tuzlaları yarı yapay kıyı sistemleri şeklinde düzenlenmiştir. Tuz elde edilmesi amacıyla deniz suyu havuzlara pompalanır ve tuz konsantre edilir. CaCO_3 'ün çöküşü ve kalsiyum sülfat oluşumu ilk adımda gerçekleşir. Sonuç olarak deniz suyu orijinal hacminin 1/10'na düştüğü zaman NaCl çöker ve çöken NaCl toplanır. Bu sistem sürekli veya yarı sürekli sistemler olarak çalışır. Bu yüzden havuzlar yıl boyunca aynı tuzluluk oranını korurlar. Bu havuzlardaki tuz derecelerinde önemli ekolojik değişiklikler olur. Tuz oranının artmasıyla biyoçeşitlilik azalır (Javor 1989).

çoklu havuz tuzlarının ekolojisiyle ilgili çok sayıda uluslararası çalışmalar vardır. Bu sistemler mikrobiyal çeşitlik üzerine tuzluluk oranının etkisini gösterme açısından oldukça ilginç modellerdir. İspanya'daki çoklu havuz tuzları birkaç yıldır çalışılmaktadır. Çalışmalar tuz konsantrasyonunun artmasıyla prokaryotik çeşitliliğin azaldığını göstermiştir (Rodríguez –Valera ve ark., 1981-1985). Tuzluluk oranı %15 'e kadar olan deniz suyunda pek çok izolat bulunur. %15 tuz oranının üzerinde pek çok ırk özelleşmiş halofiliktir.

Ülkemizde tuz üretimi Tekel tarafından “tuzla” denilen işletmelerde yapılmaktadır. Tuzlarda deniz, göl, kaya ve kaynak sularından tuz üretimi yapılmaktadır. Deniz tuzlarında tuz üretimi, güneş ısıyla buharlaştırma yöntemi ile yapılır. 3,5 bome tuz yoğunluğu olan deniz suyu, önce soğuk su havuzlarına alınarak tuzluluğu artırılır ve içindeki yabancı maddelerin çökmesi sağlanır. Daha sonra sıcak su havuzlarına alınarak suyun bomeyi artırılır ve yaklaşık 25 bomeye eriştiğinde deniz suyu kristalize havuzlarına alınarak tuz çökeltilir. Çökelmiş tuz kalınlığı 15–16 cm 'ye ulaştığında toplama işlemi yapılır. Göl tuzlarında ise tuz üretimi, yaz aylarında yoğun su buharlaşması nedeniyle çöken tuzun toplanmasıyla gerçekleştirilir. Kaya tuzlarındaki tuz üretimi ise, yer altında bulunan tuz kayalarına ulaşıp bu kayaların patlatılmasıyla ufalanan tuz kütlelerinin toplanması şeklinde olmaktadır. Üretilen en kaliteli tuz ise kaynak tuzlarından elde edilen tuzdur. Yeraltı sularının kaya tuzu yataklarından geçmesi sırasında bir miktar tuzu eritip yeryüzüne çıkarmasıyla tuzlu su yatakları oluşur. Bu sulardan tuz üretimi, deniz tuzlarındaki tuz üretimi gibi olmaktadır. Yani kaynak suları havuzlarda biriktirilerek bome derecesi artırılır ve kristalize tuz çökeltisi oluştuktan sonra tuz toplama işlemi yapılır (Macintyre 1970). Araştırmacılar, tuzlu su konsantrasyonunun ilk katmanında yoğun mikroorganizma tabakasının oluştuğunu ve bu ortamda bulunan besinlerin üzerini örttüğünü, böylece besince yoksun olan su tabakasının oluştuğunu belirtmişlerdir. Bu ortamda besin konsantrasyonunun ve planktonların fazla sayıda olmasına rağmen tuzlanın alt kısmındaki organizma sayısının az olduğu belirtilmiştir.

Çok tuzlu deniz tuzlarındaki azot ve fosfor konsantrasyonunun, mikroorganizma artışı ile doğru orantılı olduğu belirtilmiştir. Azot ve fosforun en yüksek değerine NaCl'nin çöktüğü kristalize havuzlarda veya NaCl çökeltisi

oluşmuş göllerde rastlandığı belirtilmiştir. Alkali tuzlu su göllerinin oldukça üretken sistemler olduğu, bu ortamlarda azot ile fosforun bol miktarda bulunduğu ve organizma sayısının yüksek olduğu belirtilmiştir. Sulu ortamda en yüksek fitoplankton üretkenlik değerinin bazı alkali tuzlu göllerde bulunduğu belirtilmiştir (İnandık 1955).

Yüksek tuz konsantrasyonları ve yüksek sıcaklıklar, oksijenin çözünürlüğünü azalttığı için, aşırı tuzlu sular düşük oksijen konsantrasyonuna sahiptirler. Bununla beraber, bu ortamlarda aerobik organizmalar bulunmaktadır. Yüksek miktarda alg ve siyanobakteri içeren sığ göller ve havuzlarda, aerobik olarak gelişen mikroorganizma popülasyonu için gerekli olan oksijen transfer hızı, bu canlılardaki hızlı metabolizmaya cevap verebilecek şekilde yüksek olmalıdır. Tuzlu sular, oksijenin az depolanma kapasitesinden ve düşük difüzyon oranından dolayı, oksijensiz ortamlardır. Yüksek yoğunluk ve tuz tabakalarının oluşumu, tuzlu sularda anaerob ortamların oluşmasına neden olmaktadır. Bazı halofilik bakteriler, içerdikleri gaz vakuelleri sayesinde, oksijen konsantrasyonunun yüksek olduğu su yüzeyinde bulunurlar (Anonim 2000).

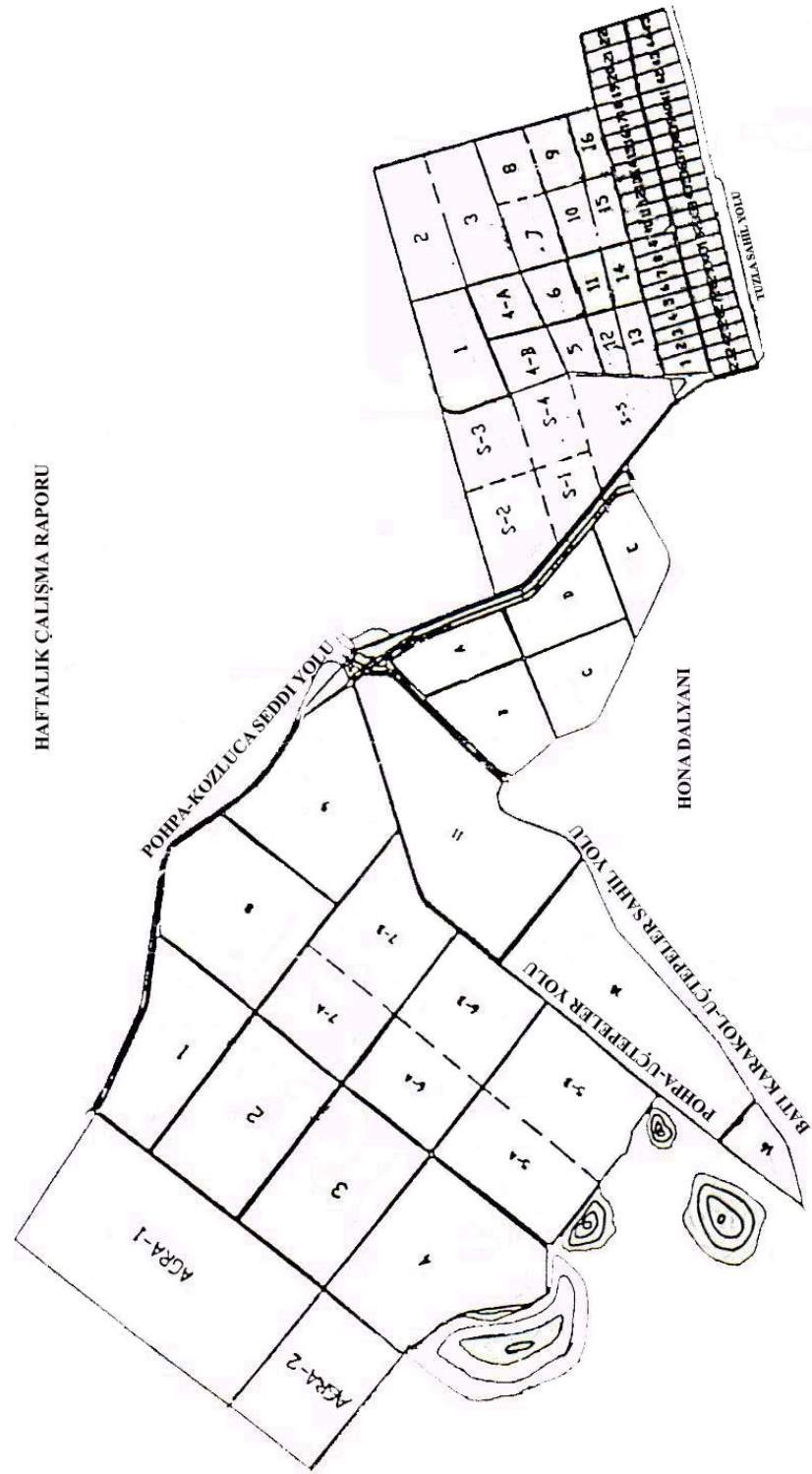
Aşırı tuzlu sular, yıllık yağış miktarının az olduğu coğrafik bölgelerde bulunmaktadır. Bu ortamdaki canlılar çok fazla miktarda radyasyona maruz kalırlar. Genellikle aşırı tuzlu sular kırmızı renktedir. Kırmızı renkte olmasının sebebi ise bu ortamlarda koruyucu olarak görev yapan karotenoidlerden dolayıdır. Işık, halofilik bakteriler için de önemli rol oynamaktadır. Bu mikroorganizmalarda ışık, bakteriorhodopsin ve ışıkla çalışan iyon pompaları tarafından kullanılmaktadır. Halofilik bakterilerin özel karotenoidleri olan bakterioruberinler, genellikle ışık koruyucu olarak görev alırlar. Ayrıca bakterioruberinler, görünür ışıkta ultraviyole ışıklarına maruz kalarak zarar görmüş DNA'da fotoreaktivasyonu kolaylaştıran enerji transferinde rol alırlar. Araştırmacılar, halofilik bakterilerdeki kırmızı rengin kızıl ötesi ışınları tutarak suyun ısısının yükselmesine neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum genellikle çok az termofilik olan organizmalar için oldukça önemlidir. Su ısısının yükselmesi bu mikroorganizmaların gelişmelerini hızlandırarak mikroorganizmaların generasyon sürelerini kısaltır (Vreeland 1993).

1.2. ARAŞTIRMA BÖLGESİNİN TANITIMI

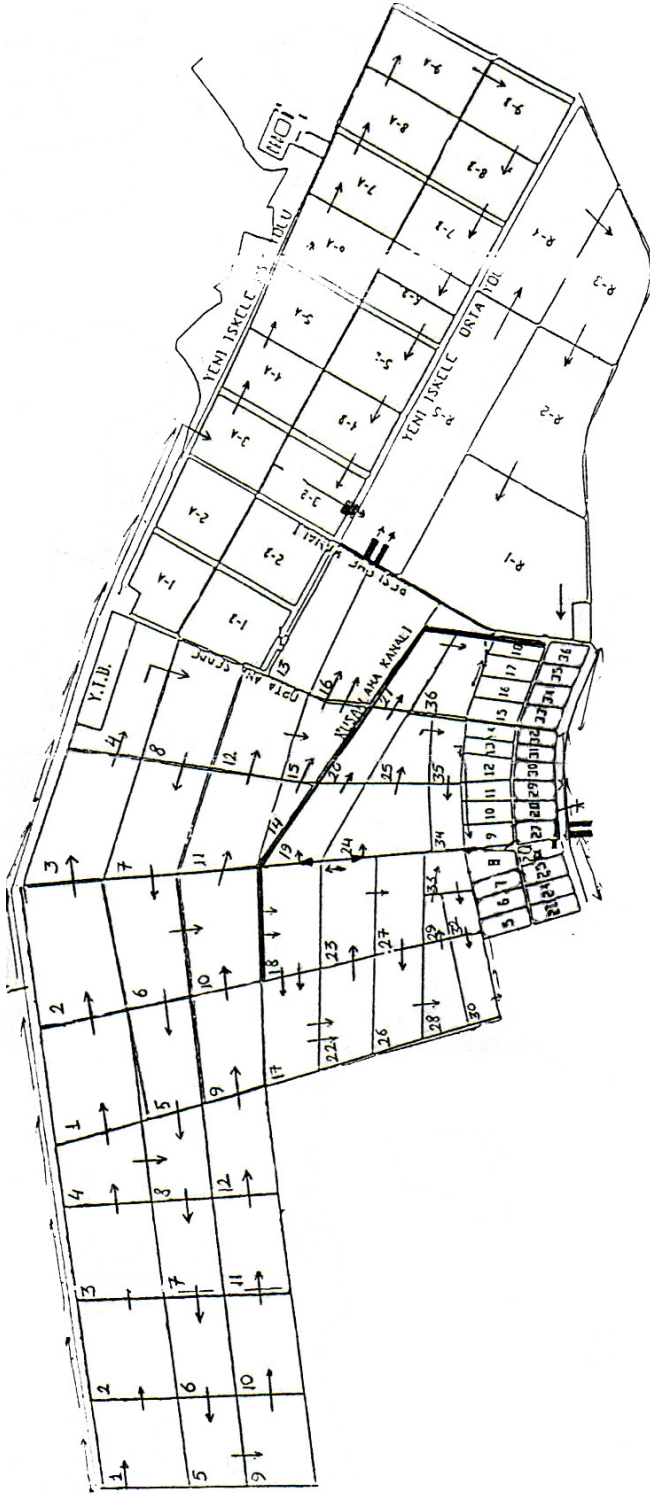
Çamaltı Tuzlası İzmir Körfezinin kuzeyinde, Gediz Deltasında 58 kilometrekare alan üzerinde ülkemizin en büyük deniz tuzlasıdır. Çiğli ilçe merkezine 12 km, İzmir merkezine ise 25 km mesafededir. Güney ve batı kesiminden İzmir körfezi ile çevrelenen tuzlanın doğusunda İzsü Arıtma sahaları, Sasalı köyü, Sasalı Organize Sanayii Bölgesi, Süzbeyli Köyü kuzeyinde ise İzmir-Menemen organize deri sanayi serbest bölgesi bulunmaktadır.

Çamaltı Tuzlası tarihi kesin olarak bilinmeyen yıllarca önceden beri faaliyetini ilkel olarak sürdürmüş, o zaman sahil gölcüklerinde biriken tuzları toplamak suretiyle tuz ihtiyacı karşılanmıştır. Ünlü gezgin Evliya Çelebi'nin dahi bu civarı dolaştığı ve eserinde bu bölgeden “Tuzla-i Melemenkiye” diye bahsettiği bilinmektedir. Tuzun gün geçtikçe artan önemi karşısında modern tuzlanın temelleri 1863 yılında İtalyanlar tarafından atılmıştır. Bir müddet halk tuz üreticileri tarafından çalıştırılmıştır. Sonradan iş merkezleri Galata'da olan Rum, Ermeni, Yahudi asıllı Galata bankerleri tarafından devlete bir miktar vergi karşılığında işletilmiştir. Bunlardan da ‘Rusumi Sidde’ altıncı gümrük adı altında 1912 yılında Maliye Bakanlığına devredilerek devletleştirilmiştir. 1913-1932 yılları arasında Tütün İşleri Müdürlüğü adı altında çalışmış, 1933 yılından itibaren Tekel (Tütün, Tütün Mamulleri, Tuz ve Alkol İşletme A.Ş) Bakanlığına bağlı Tekel Genel Müdürlüğüne devredilerek şimdiki Çamaltı Tuzlası kurulmuştur. Muhtelif yıllarda bir kaç kez yenilenip bugünkü halini almıştır.

Çamaltı Tuzlasında tuz üretimi güneş ısıyı yardımıyla deniz suyunun buharlaşması esasına dayanır. Tuz üretimi için gerekli iklim koşulları tuzlada mevcuttur. Tuzla nemi az olan kuzey rüzgarlarına açıktır. Mayıs ve Ağustos aylarında batı ve güney batıdan, Nisan ve Eylül aylarında ise kuzey ve kuzeybatıdan muntazam rüzgar esmesi tuz üretimi için çok elverişli bir ortam hazırlamaktadır. Çamaltı Tuzlası çok büyük sahaya sahip olduğundan sevk ve idarenin kolaylaştırılması açısından Üretim Şubesi bünyesinde 1. ve 2. Tuz Üretim Merkezi olmak üzere iki ana merkez oluşturulmuştur (Şekil 1.1 ve 1.2)



Şekil 1.1. İzmir Çamaltı Tuzlası 1. Kısım Üretim Merkezi (oklar suyun hareket yönünü göstermektedir).



Şekil 1.2. İzmir Çamaltı Tuzlası 2. Kısım Tuz Üretim Merkezi (oklar suyun hareket yönünü göstermektedir).

Ayrıca tuzlanın muhtelif yerlerinde su sirkülasyonuna yardımcı olmak amacıyla ihtiyaca göre pompalar tesis edilmiştir.

Üretim süreci Mart-Nisan aylarında deniz suyunun pompalarla soğuk su havuzlarına alınmasıyla başlar. Soğuk su havuzlarına alınan bu sular mevsime göre 2,5-3 veya 3-3,5 bome derecesinde olmaktadır. Tuzlu suyun yoğunluk derecesini ölçmek için bome diye adlandırılan ve metrik sisteme dahil olmayan bir birim kullanılmaktadır.

Denizden pompalar vasıtasıyla alınan sular kanallar yardımıyla soğuk su havuzlarına aktarılır. Soğuk su havuzlarında güneşin buharlaştırıcı tesirine bırakılan sularda buharlaşmanın etkisiyle bome derecesi yükseltilir ve deniz suyu bünyesindeki tuzlar çözünürlüğü en düşük olandan yüksek olana doğru bir sırayla çökmeye başlar. Sular, havuzlar arasındaki boğazlar yardımıyla bir havuzdan diğerine aktarılır.

Suda öncelikle Fe_2O_3 'ler çökmeye başlamakta ve 3,6–7 bome arasında bütün Fe_2O_3 çökmüş bulunmaktadır. 3,5 bome'de çökmeye başlayan $CaCO_3$ 'ün ise 16–17 bome'de tamamı kristalleşip çökmektedir. Hidrat halindeki jips yani $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ formülündeki kalsiyum sülfatlar 13 bome'den başlamak üzere yoğunlaşmakta ve müteakiben 16,4 bome derecesinde kalsiyum sülfata dönüşerek bütün buharlaşma evresinde çökmeye devam etmekte ve çökme işi 27-30 bome'de sona ermektedir.

Yaklaşık 20 bome civarına gelen sular sıcak su havuzlarına alınırlar. Burada sular tuzun yani sodyum klorürün çökmeye başladığı 25 bome derecesine kadar yoğunlaştırılır. Bu nedenle sıcak su havuzları, “azmak” diye de adlandırılan kristalizasyon havuzlarının bir nevi ana çözelti kaynağı sayılırlar. Sıcak su havuzlarına kadar boğazlardan aktarma suretiyle geçirilen sular bundan sonra tımpana yardımıyla çekilir ve başka bir kanal boyunca azmak adı verilen kristalizasyon havuzlarına gönderilir. Tımpana aslı İtalyanca olan bir kelimedir. Demir ve tahtadan yapılmış bir nevi su dolabı olan tımpana bir elektrik motoru ile döner ve deniz suyunu alıp bir üst seviyeye yükseltir. Gerektiğinde bir kanaldaki suyu diğer kanala aktarmaya da yaramaktadır.

Sıcak su havuzlarında hafif pembe renk almış olan sular azmaklarda kırmızı bir renk almaktadır. Bu renk, bu tuzlulukta yaşamını sürdürebilen

halofilik bakterilerden kaynaklanmaktadır. Bu canlılar, suda mevcut organik maddeleri tüketip, suyu berraklaştırarak, ayrıca suya renk verip güneş ışığı absorbansını arttırarak tuz üretimine büyük ölçüde yardımcı olurlar. Bu havuzlarda sular, tuzda istenmeyen magnezyum tuzlarının çökmesini engellemek maksadıyla 28–29 bome derecesine geldiğinde havuzlardan tahliye edilir.

Tuz oluşumu 90 ile 105 günde olmaktadır. Bir üretim döneminde sıcak su havuzlarından kristalize havuzlarına 30-35 kez bomeli su verilir. Kristalize havuzlarında eylül ayı başına kadar 15-16 cm kalınlığa ulaşan tuz en geç 2,5 aylık süre içinde toplanmaktadır (Anonim). Şekil 1.3'te Çamaltı Tuzlası'nda bazı havuzlar görülmektedir. Havuzlardaki renk farklılığı tuz konsantrasyonuna bağlı olarak dominant olan mikroorganizmalardan kaynaklanmaktadır.



Şekil 1.3. Çamaltı Tuzlası Genel Görünüş ve Örnek Alınan Bazı Havuzlar.

1.3. HALOFİLİK MİKROORGANİZMALAR

Halofilik mikroorganizmalar, gelişebilmeleri için yüksek miktarda tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyan tuzlu ortamlarda yaşayabilmek için farklı adaptasyonlar geliştirmiş, hem prokaryotik hem de eukaryotik temsilcileri olan bir gruptur. Kushner (1985), mikroorganizmaları gelişebilmeleri için gerekli olan optimum NaCl miktarına göre şöyle sınıflandırmıştır:

- 1) Halofilik olmayanlar; gelişmeleri için %1'in altında NaCl'ye ihtiyaç duyanlar.
- 2) Az Halofiller; gelişmeleri için %1-3 arasında NaCl'ye ihtiyaç duyanlar.
- 3) Orta derecede Halofiller; gelişmeleri için %3-15 arasında NaCl 'ye ihtiyaç duyanlar.
- 4)Aşırı Halofiller; gelişmeleri için %15 'den daha fazla NaCl'ye ihtiyaç duyanlar.

Ayrıca bunların dışında "Halotolerant" olarak adlandırılan bir grup daha vardır. Bunlar tuzun varlığında veya yokluğunda gelişebilen organizmalardır. (Kushner 1985).

Genellikle halofilik mikroorganizmaların çoğunun ılıman veya sıcak iklimli bölgelerden izole edildiği ve bunların bir çoğunun ılımlı termofiller olduğu kabul edilmiştir (İnandık 1985).

Halofiller, ortamdaki yüksek osmotik basınca karşı iki türlü adaptasyon geliştirmişlerdir. Bunlardan birincisi, K^+ , Na^+ veya Cl^- gibi inorganik iyonların yüksek konsantrasyonda hücre içinde birikmesi şeklinde osmozun dengelenmesidir (Da Costa ark. 1998). Bu durum yüksek konsantrasyondaki iyonların varlığında çalışabilen hücre içi enzim adaptasyonlarını gerektirmektedir (Da Costa ve ark. 1998; Oren 2002).

İkincisi ise; farklı mikroorganizmalarda görülen organik osmotiklerin birikmesidir (Galinski 1995). Bu, hücresel proteinlerin kendilerini çevreleyen yüksek tuz konsantrasyonuna karşı bir adaptasyonu değil, hücrenin değişen koşullara hızlı bir adaptasyonudur.

1.3.1. Halofilik Archaea

Halofilik Archaea'larda hücre şekli, diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi kendi hücre duvarları tarafından belirlenir. *Halobacteriaceae* familyasının türleri farklı şekillere sahiptir. Çubuk (*Halobacterium* ve diğerleri), küre (*Halococcus*, *Natronococcus*) ve yassı pleomorfik türleri de mevcuttur. Ayrıca, *Haloarcula japonica* gibi üçgen yada paralelkenar hücreler de bulunur. Böylesi alışılmadık biçimler halofilik Archaea'ların bir turgor basıncına sahip olmamasından kaynaklanmaktadır (Oren 2002b).

Halofilik Archaea'da ekstraselüler kapsüller: Belirli halofilik Archaea türlerinde hücre duvarı dışında polisakkarit kapsül bulunur. Çok miktarda ekzopolisakkarit *Haloferax* genusu tarafından salgılanır. *Haloferax mediterranei* 'nin ekstraselüler kısmının mannozun majör komponenti olduğu ve heteropolisakkarit yapısında olduğu belirtilmiştir. Glukoz, galaktoz, belirlenememiş bazı şekerler, aminoasit şekerleri ve uronik asit tespit edilmiştir ve bunların sülfat bağları içerdikleri belirlenmiştir (Oren 2002b).

Halofilik Archaea'da flagella: *Halobacteriales*'in birçok üyesi flagella yardımıyla hareket eder. Halobacterial flagella sağa dönümlü heliks yapıdadır ve sola dönümlü Bacteria'dan farklıdır. Hareketlilik en fazla *Halobacterium salinarium*'da çalışılmıştır. İzole edilmiş flagellumun SDS poliakrilamid jel elektroforez çalışması sonucunda moleküler büyüklükleri farklı üç proteinin ayrımı yapılmıştır. Bu üç flagella glikoproteinlerle ilişkilidir ve sülfatlanmış oligosakkarit taşırlar. Halofilik Archaea flagellumunun saat yönündeki rotasyonu hücrenin ileri doğru ilerlemesini, saat yönüne ters yapılan rotasyonu ise geriye doğru ilerlemesini sağlar (Oren 2002b).

Halofilik Archaea'da sitoplazmik membran ve lipidler: Sitoplazmik membran, lipid ve proteinlerden oluşur. Besinlerin ve diğer bileşiklerin, iyonların içeri ve dışarı geçişleri, dış çevreden bilgi alan sensörleri, solunum elektron transportu için gerekli olan tüm fonksiyonları içeren yapıdır. Ayrıca retinal iyon pompası bakteriyorodopsin ve halorodopsin birçok halofilik Archaea membranında bulunur (Oren 2002b).

Gaz vezikülleri: Gaz vezikülleri protein alt ünitelerinden yapılmış

silindirik yapılardır. Gaz vezikül proteinleri halofilik Archaea'nın stabilizasyonu için tuza gereksinim duymayan proteinlerden biridir. *Halobacteriaceae*'de gaz vezikülleri basınca karşı hassastır ve düşük basınçta bile parçalanabilir. Gaz veziküllerine sahip olma, tuzlu su yüzeyinde yüzebilme aerobik halofilik mikroorganizmalar açısından avantajlıdır. Çünkü, tuzca doymuş tuzlu sularda oksijen ve diğer gazların çözünürlüğü azdır (Oren 2002b).

Depo materyalleri: Bazı *Halobacteriaceae* üyeleri çok miktarda polihidroksialkonat (PHA) polimeri üretirler. Özellikle *Haloferax mediterranei* ve *Haloarcula marismortui* PHA biriktirmektedir (Oren 2002b).

Kistler ve Endosporlar: *Halorubrum distributum* dinlenme safhası için kalın duvarlı kist benzeri yapılar oluştururlar. Yaygın kültürlerin hücre duvarı ile kistlerin hücre duvarı arasında karşılaştırmalı bir bilgi yoktur. Gerçek endospor oluşumu Archaea'larda şu ana kadar tanımlanamamıştır (Oren 2002b).

1.3.2. Halofilik Bacteria

Halofilik Bacteria'da hücre duvarı: *Halomonas elongata*'nın hücre duvarı hidrofobisitesi açısından farklılık gösterir. Yüzey hidrofobisitesi büyük olasılıkla hücre duvarı yapısı ve sitoplazmik membranın ortak bir fonksiyonudur. Yüksek NaCl konsantrasyonunda yüklü fosfolipidlerin sayıca artışı güçlendirilmiş hidrofilik eğilimi açıklayabilir. Hidrofilik hücre yüzeyi yüksek tuzluluktaki suyun az olduğu ortamlarda hücreyi su molekülü açısından daha çekici hale getirir ve bu sayede hücrenin su kaybetmesini önler. *Halomonas* peptidoglukanının ilginç bir özelliği hidrofobik aminoasit lōsin'in varlığıdır ki bu tüm hücre duvarı hidrofobisitesine katkı yapar (Oren 2002b).

Halofilik Bacteria'da ekstraselüler kapsül: *Halomonas eurihalina* ilginç özellikli bir ekzopolisakkarit üretir. % 42 karbonhidrat (çoğunlukla heksoz) ve %15'i proteindir. Kalan kısmının yapısı ise bilinmemektedir. Polimer oldukça vizkoz ve özellikle asidik pH 'da termostabildir (Oren 2002b).

Halofilik Bacteria'da flagella ile hareket oldukça yaygındır. Özellikle kalın, polar flagella haloalkalifilik fotosentetik sülfür bakterisi *Halorhodospira*

abdelmalehii'de gözlenir (Oren 2002b).

Halofilik Bacteria'da hücre membranında tuz bağımlı değişiklikler fosfolipid tipleri düzeyinde ve lipidlerdeki yağ asiti zincirleri düzeyinde tanımlanmıştır. "Haloadaptasyon" hücre zarfının osmotik strese karşı bir cevabı olarak görülmektedir (Oren 2002b).

Halofilik Bacteria'da polar lipidler çoğu türde bulunan majör polar lipidler fosfatidilkolin (PC) ve fosfatidiletanolamin (PE) dir. Kardiolipin (CL) ve glikolipidler gibi diğer tip lipidler bulunur (Oren 2002b).

Çubuk şekilli gram negatif halofilik bakteriler (*Halomonas*, *Chromohalobacter* vb) membran lipidlerinde genellikle düz zincirli doymuş ve monodoymamış yağ asitlerini (C16:0, 16:1 ve özellikle 18:1) içerirler. Siklopropan yağ asitleri bir çok izolatta tespit edilmiştir. Halofilik Bacteria'da solunum quinonları, hem ubiquinon hem de menaquinon tipte isoprenoid quinonlar olarak tespit edilmiştir (Oren 2002b).

Fotosentetik prokaryotlar fotosentetik aparatın yer aldığı intraselüler membran sistemlerine sahiptir. İntraselüler fotosentetik membranların çok farklılık gösteren şekilleri halofilik anoksijenik fotosentetik bakteriler arasında görülmektedir (Oren 2002b).

Halofilik Bacteria'da gaz vezikülleri: halofilik Archaea'da sıkça görülen gaz veziküllerine, halofilik Bacteria'da nadiren rastlanmaktadır. *Cyanobacteria* 'nın gerçek halofilik temsilcileri gaz vezikülleri içermemektedir (Oren 2002b).

Halofilik Bacteria'da endosporlar: ısıya toleranslı endosporlar bazı halofilik Bacteria grupları tarafından üretilir. *Clostridiaceae*'den *Clostridium halophilum*, *Halanaerobiaceae*, *Halobacteriodaceae*, *Orenia* türleri, *Bacillaceae*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Salibacillus* üyelerinde endospor oluşumu görülmektedir (Oren 2002b).

1.4. Halofilik Mikroorganizmaların İdentifikasyonu

Halobacterial taksonların tanımlanabilmesi için gerekli olan kriterler sırasıyla şöyledir:

Koloni morfolojisi,

Hücre morfolojisi,
 Hareketlilik,
 Pigmentasyon,
 Gram boyama,
 Hücre lizisini önleyen tuz konsantrasyon,
 Büyüme için gerekli optimum NaCl ve MgCl₂ miktarı,
 Büyümenin gerçekleştiği tuz konsantrasyonu aralığı,
 Büyüme için gerekli sıcaklık ve pH ,
 Nitrat varlığında anaerobik büyüme,
 Çeşitli karbonhidratlardan asit oluşumu,
 Tek karbon kaynağında büyüme durumu,
 Katalaz ve oksidaz aktiviteleri,
 İndol oluşumu,
 Nişasta-jelatin-kazein ve tween 80'in hidrolizi,
 Farklı antibiyotiklere duyarlılık,
 Polar lipid karakterizasyonu,
 DNA'nın G+C oranı ve
 16S rRNA nükleotid dizilim bilgisi.

Buna göre, *Halobacteriales* ordosu için günümüzde geçerli olan sınıflandırma üç çeşit veri sonucuna göre yapılmaktadır:

- a) Fenotipik veriler (Hücre morfolojisi, büyüme özellikleri gibi)
- b) Kimyasal veriler
- c) 16S rRNA dizilimi bilgisi (Oren ve ark., 1997).

Fenotipik verilerin eldesi amacıyla yukarıda sayılan temel biyokimyasal testler uygulanmaktadır. Bu testler her ne kadar kendi başlarına yeterli olmasa bile diğer verilerle birlikte ayırt edici hale gelebilmektedirler (Oren ve ark., 1997; Das Sarma 2001; Oren 2001).

Polar lipid analizleri de özellikle genus düzeyinde ayırma olarak sağlamaktadır. Polar lipid analizleri için ince tabaka kromatografisi yöntemi kullanılarak incelenen örneklerde fosfotidilgliserolsülfat (PGS) ve farklı glikolipidlerin varlığı araştırılmaktadır (Oren 1999).

Doğal örneklerden filogenetik olarak bilgi sağlayıcı moleküllerin (tipik

olarak 16S rRNA'ların) PCR yöntemiyle eldesi prokaryotik sınıflandırma üzerine yeni yaklaşımlar getirmiştir. Geleneksel saf kültür teknikleri, örneklemenin yapıldığı ortamdaki mevcut çeşitlilik içinde çok sınırlı sayıdaki bir grubu ortaya koyabilmektedir. Bu nedenle tuzlu ortamlardaki durumun ortaya konması amacıyla moleküler teknikler kullanılarak başarılı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Martinez-Murcia 1995; Arahall ve ark. 1996; Garcia-Martinez 1999; Benlloch ve ark., 2001).

1.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile identifikasyon

Polimeraz zincir Reaksiyonu (PZR) uzunlukları yaklaşık 2 kilobaza (kb) kadar olan DNA ve RNA dizilerinin, seçilerek çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem için gerekli olan ve çoğaltılması istenen dizinin her iki ucunu tanıyan sentetik başlatıcı oligonükleotidler (primerler), zıt ve birbirleriyle çakışan yönlerde ilerleyen enzimatik sentezlerin gerçekleşmesinde kullanılır.

Her döngüde çoğaltılacak DNA dizileri eksponensiyel olarak artar. *Thermus aquaticus*'dan izole edilen, ısıya dayanıklı DNA polimeraz'ın (Taq Polimeraz) kullanılması reaksiyonun otomatik olarak gerçekleştirilmesini sağlar. Reaksiyonun özelliği basit, hızlı ve çok duyarlı olmasıdır. Tek bir hücrede bulunan DNA veya RNA miktarı çoğaltma reaksiyonu için yeterli olur. Bu yöntem DNA'da mevcut mutasyonların ve polimorfizmlerin tanısında ve patojen organizmalara ait DNA'nın varlığını göstermede büyük kolaylık sağlar. Ayrıca temel moleküler biyolojide karmaşık analitik ve sentetik protokollerin kolaylaştırılmasında yararlıdır (Çağlayan 1991).

Genetik özelliklerin ya da gen faaliyetlerinin moleküler seviyede çalışılabilmesi, önemli ölçüde DNA veya RNA moleküllerinin güncel metodlarla analiz edilebilecek miktarda bulunmasına bağlıdır. Örneğin, genlerin klonlanması için az sayıda molekül yeterli olmasına rağmen, analiz edilebilmeleri için uygun hücrelerde çoğaltılarak sayılarının artırılması gerekmektedir. Mevcut moleküler analiz metodları için tahminen 10^5 - 10^6 DNA veya RNA molekülü (gen kopyası) gerekmektedir. Tek bir gen kopyasının analizi ise ancak in-situ hibridizasyon gibi sadece bir kaç özel protokol ile

mümkün olmaktadır. Dolayısıyla yakın zamana kadar temel moleküler biyolojik araştırmada amaç, mevcut metotların duyarlılığını artırmak veya daha az miktarda molekülün analizini sağlayacak yeni yöntemler geliştirmek olmuştur.

PZR, DNA'nın önemli ölçüde saflaştırılmasını gerektirmediği için, nükleik asitlerle çalışmada harcanan zaman ve emeği azaltmakta ve hücresiz klonlama (cell-free molecular cloning) olarak da adlandırılmaktadır (Saiki ve ark. 1988).

PZR'nin Teknik Özellikleri

PZR üç ilkededen oluşur:

1. DNA sarmallarının ısıyla ayrılması (denatürasyon);
2. Sentetik oligonükleotidlerin homolog DNA veya RNA dizilerine bağlanması (primer bağlanması);
3. DNA'nın *in vitro* enzimatik olarak sentezlenmesi.

Çoğaltılması istenen DNA bölgesinin her iki ucunda belli sayıda diziyi tanıyan ve DNA'nın her iki zincirini de tamamlayıcı olan bir başlatıcı oligonükleotid (primer) çifti zıt ve birbirleriyle çakışan yönlerde ilerleyen DNA sentezinin çok sayıda döngüde gerçekleştirilmesinde kullanılır. Her döngüde çift sarmallı DNA, iki yeni çift sarmallı molekülün yapılmasını sağlar. Bu da teorik olarak her döngüde DNA dizilerinin sayısal olarak ikiye katlanmasına yol açar. Böylece DNA kopyalarının sayısı her döngüde eksponensiyel olarak artar.

Her döngü çift sarmallı DNA'nın 91°C-95°C de genellikle 1 dakika denatüre edilmesi ile başlar. Bunu takiben başlatıcı oligonükleotidler açılan DNA sarmallarına bağlanır. Bağlanma reaksiyonunun optimal ısısı G+C miktarı ile doğru orantılıdır (Tindall ve ark 1988). DNA 50-55°C' de 2-5 dakika süreyle sentezlenir. Reaksiyonun başlangıcında başlatıcı oligonükleotid miktarı DNA miktarından 10^8 - 10^{12} kat sitokimetric olarak fazladır. Oligonükleotidlerin bağlanması ve DNA sentezi için uygulanan sıcaklık kullanılan enzime göre değişir. Isıya dayanıklı polimeraz enzimi için bu sıcaklık 58°C ve 72°C arasındadır.

En sık kullanılan enzim, Taq polimeraz diye adlandırılan ve *Thermus*

aguaticus'dan izole edilen ısıya dayanıklı DNA polimerazdır (Saiki ve ark. 1988). Bu enzimin kullanılması çeşitli kolaylıklar sağlamaktadır. Enzim yüksek ısıda sentezi gerçekleştirdiği için, başlatıcı oligonükleotidlerin kısmi benzerlik (homoloji) taşıyan bölgelere yanlış bağlanma olasılığını azaltmakta ve her döngüde yeni enzim ilavesini gerektirmemektedir. Bağlanma reaksiyonundaki hata payı özellikle multigen ailelerinden kaynaklanan gen veya transkriptler çoğaltıldığı zaman önemli olmaktadır. Ayrıca, Taq polimeraz kullanımı otomatik PZR cihazlarının geliştirilmesini mümkün kılmıştır.

Döngü sayısı n ise, teorik olarak çoğaltılan molekül sayısı 2^n 'dir. Böylece her DNA molekülü, 20 döngüde yaklaşık olarak bir milyon DNA molekülü vermektedir. Ancak deney şartlarında gerçekleşen verim her döngü için % 85 civarındadır; bu da 20 döngüde genel verimin 10^6 dan yaklaşık $2,2 \times 10^5$ ($1,85^{20}$)'e düşmesine neden olmaktadır. Döngü sayısı çoğaldıkça verim düşmektedir. Buna sebep hem enzimin tanınması gereken DNA moleküllerindeki artış, hem de tekrar tekrar ısıtma sonucu enzim aktivitesinde görülen düşmedir. Ayrıca eğer ısıya dayanıklı olmayan enzim kullanılmışsa, her döngüde enzim ilave edilmesi reaksiyon ortamını değiştirerek enzimin katalitik aktivitesini etkilemektedir.

PZR çoğaltılacak DNA moleküllerinin çok saf olmasını gerektirmez. Hücre DNA ve RNA'sının tümü veya doğrudan serum örnekleri bu reaksiyon için kullanılabilir.

Çoğaltılan DNA parçası (ürün) genellikle ethidium bromür ile boyanmış agaroz veya poliakrilamid üzerinde gözlenmektedir. Ya da ürün doğrudan filtre üzerine geçirilmekte (Southern veya nokta-emdirme) ve çoğaltılan bölgeyi tanıyan işaretlenmiş oligonükleotidler ile hibridize edilmektedir. Bunlara ilaveten çoğaltılan bölge doğrudan dizi analizinde de kullanılabilir (Saiki ve ark. 1988).

1.4.2. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi

Bakteriyal lipid kompozisyonu ve taksonomik sınıflandırma arasındaki ilişki bakterial identifikasyon amacıyla geniş bir ölçüde kullanılmaktadır. Yağ

asiti profillerine dayanan bakterial sınıflandırmalar nükleik asit homolojisine dayalı sınıflandırmalarla iyi karşılaştırılmış durumdadır. Lipid analizleri metodolojisindeki gelişmeler bir çok bakteri için bu ilişkiyi sağlamıştır. Lipid ekstraksiyonlarının gaz kromatografisi, hücresel yağ asitlerinin belirlenmesi için yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu metod bakteriyal lipidlerin hidrolizasyonu ve ekstraksiyonuna dayanır. Karboksilik grupların metilasyonu yağ asitlerinin metil esterlerini (FAME) üretir ve bunlar gaz kromatografisi (GC) ile analiz edilir. FAME analizleri halofilik bakteriler için de uygulanmıştır. Vreeland ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, çok eski tuz kristalinden izole edilen bir "Permian" bakteri ile bu izolatların modern akrabaları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yağ asit profillerine göre bu organizmaları karşılaştırdıklarında bu yaklaşımın tür düzeyinde ayırım yapmadığı ancak test edilen Bacteria üyeri arasındaki farklılıkları ortaya koyabildiği sonucuna varmışlardır (Vreeland ve ark. 2006).

1.5. Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH)

FISH (Floresan in situ hibridizasyon), nükleik asit dizilerine özgül, floresan işaretli DNA problemleri ile hedefin işaretlenmesi ve floresan mikroskopunda görüntülenmesi prensibine dayanan bir yöntemdir. rRNA hedefli problemlerle floresan in situ hibridizasyon (FISH), bir ön kültüre alma işlemi yapılmadan, epifluoresans ve konfokal lazer tarama mikroskobu kullanarak ya da flow sitometri yöntemleri ile karışık bakteri topluluğunun filogenetik identifikasyonuna izin veren bir boyama tekniğidir (Boone ve ark. 2001). Bakterial identifikasyon, bakteriyal komünite yapısı analizleri, ayrı mikrobiyal popülasyonların kendi habitatlarında zamansal ve mekansal dinamiklerinin araştırılması gibi amaçlar için kullanılabilirler.

Teoride, bakteri hücreesindeki 5S, 16S, ve 23S rRNA'nın birer kopyasını içeren her bir ribozom, hibridizasyon prosedürü boyunca bir prob ile boyanır, her hücrede çok sayıda bulunması nedeniyle de doğal sinyal amplifikasyon sistemi oluşur. Metod temelde bakteriyal küçük alt ünite (16S rRNA) rRNA dizilerinin hızlıca artışına dayanmaktadır (Boone ve ark. 2001).

Daha az olarak büyük alt ünite olan 23S rRNA'yı hedefleyen problemler de oluşturulmuştur. Fakat bu, hali hazırda fazla olmayan 23S rDNA dizi bilgileri yüzünden zorluklar çıkarmaktadır.

Bakteriler için FISH, ilk olarak on yılı aşkın bir süre önce tanımlanmış ve mikrobiyal ekoloji çalışmaları için bir dönüm noktası olarak değerlendirilmektedir (Pernthaler ve Amann 2002).

Son yıllarda FISH tatlı sular, kıyı ve açık deniz planktonik habitatlarına ve kıyı sediment örneklerine başarıyla uygulanmıştır. FISH ile belirlenen bakteri fraksiyonlarının, kıyı deniz planktonlarında bulunan aktif hücre miktarı sonuçları ile iyi bir uyum gösterdiği ortaya konmuştur. Proteobacteria'nın farklı alt sınıfları için spesifik problemler tatlı su ve deniz planktonları arasındaki temel farkların ortaya konması için ya da çamur sedimentlerinin mikrobiyal komitelerinin dikey dağılımlarını göstermek için kullanılmıştır (Pernthaler ve ark. 2002).

Ana filogenetik soyların ve bazı bireysel bakteri filotiplerinin mevsimsel dinamikleri göl bakteriyoplanktonlarında çalışılmıştır. Archaeal mevsimsel bulunuşluk ve vertikal dağılımları, Antartik kıyı sularında polinükleotid ve oligonükleotid problemler kullanılarak FISH yöntemi ile ortaya konmuştur (Pernthaler ve ark. 2002).

FISH, predatörlüğün, tatlı su bakteriyoplankton birliktelik kompozisyonunu değiştirebileceğini göstermek için de kullanılmıştır. Aynı zamanda toprak ve atık su muamele sistemlerinde de birçok kullanımı olmuştur (Pernthaler ve ark. 2002).

1.6. Halofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Potansiyelleri

Halofilik mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanları aşağıda sıralanmıştır:

1. Bacteriorhodopsin üretimi,
2. Halorhodopsin üretimi,
3. Polimerik maddelerin üretimi,
4. Besin ve besin endüstrisinde,
5. Enzim üretiminde,

6. Biyolojik sorumlu iyileştiriciler olarak,
7. Petrol eldesinde,
8. Çevre Biyoteknolojisinde.

1. Bakteriorhodopsin üretimi:

Çevrenin oksijen içeriği azaldığı zaman, halofilik Archaea'lar bacteriorhodopsin sentezlerler. Bu ATP sentezine aracılık etme yeteneğine sahiptir. Bacteriorhodopsin güneş ışığını elektiriğe dönüştürmek için kullanılabilir ve bir ATP jeneratörüdür Ayrıca deniz suyunun tuzdan arındırılmasını, kimyasal ve biyosensör olarak kullanımını ve çok hızlı ışık deteksiyonu gibi uygulamaları içerir (Oren 2002c).

2. Halorhodopsin üretimi:

Halorhodopsin kloride (Cl⁻) iyonu için biyosensör olarak kullanılır, ışık yansıma pompası olarak görev yapar. Bu sistem halofilik Archaea'larda kloru (Cl⁻) hücre içine potasyum (K⁺) için anyon olarak pompalar (Oren 2002c).

3. Polimerik Maddelerin üretimi:

Ekstrem halofillerden olan *Haloferax mediterranei* hücre dışı polimerik madde olan β -hidroksibutirat (PHB) ve β -hidroksibutirat'ın kopolimeri olan poly- β -hidroksialkonat (PHA) içerebilirler. Poly- β -hidroksialkonat içerikleri tuzluluğa bağlı olarak kuru ağırlıklarının %19-38' kadar olabilmektedir.

Poly- β -hidroksialkonat biyolojik parçalanabilir plastiklerin üretiminde kullanılır. Böyle termoplastikler (biyolojik polyesterler) polypropilenlere benzer olarak yüksek direnç ve düşük erime sıcaklığı gibi mükemmel özelliklere sahiptirler (Oren 2002c).

4. Besin ve Besin Endüstrisinde:

Besinlerde izole edilen *Micrococcus varians*, salçadan izole edilen *Vibrio costicola* gibi çok sayıda halofilik bakteriler vardır. Pek çok çalışma besinleri kontamine edenleri araştırmak üzere yapılmaktadır. Ayrıca tat vericiler olarak bilinen ticari ürünlerinde üretilmektedir. Mesela Tayland'da "nam pla" denilen fermente edilmiş balık sosu geleneksel olarak iki parça balık ve bir parça deniz tuzu eklenerek yapılır. Karışım konsantre tuzlu su ile kaplanır ve yaklaşık bir yıl fermente olması için bırakılır. *Halobacterium* ve *Halococcus* olarak tanımlanmış olan kırmızı halofilik Archaea'lar yaklaşık üç hafta sonra maksimum yoğunluklarına ulaşırlar ve fermentasyon periyodu boyunca bu durumlarını sürdürürler. Halobakterial proteazlar bu süreçte muhtemelen rol oynamaktadırlar. Archaea metabolizmasınca oluşan ürünlerin bu sosun aromasına katkı yaptığı düşünülmektedir (Oren 2002c).

5. Enzim üretiminde:

Archaeal enzimler, yüksek tuzda görev yaptıkları ve organik çözücülere karşı dirençli oldukları için biyoteknolojik işlemlerde kullanılırlar. Enzimler örneğin; amilaz, gelatinaz, lipaz, DNaz, sellülaz, β -galaktosidaz, katalaz ve kazeinazlar farklı alanlarda kullanılabilenlerdir. Tekstil ve deterjan endüstrisinde kullanılan enzimler enzim endüstrisinin % 65'ini oluşturmaktadır. Endüstri temelli mikrobiyal enzimlerin büyük bir çoğunluğu bakterial proteazlardır ve deterjan katkısı olarak kullanılır. Pek çok deterjan proteaz, amilaz, lipaz ve selülaz enzimleri içerir. Bu enzimler düşük sıcaklıkta enerji tasarrufu sağlarlar. Lipazlar çamaşır ve bulaşık deterjanlarında katı ve sıvı yağları temizleme kapasitesinden dolayı geniş kullanım alanına sahiptir (Oren 2002c).

Ektoin'ler *Halomonas elongata* tarafından üretilen bir maddedir ve enzim düzenleyici olarak kullanılır. Enzimin raf ömrünü ve enzim hazırlama işlemini artırır. Nemlendirme özelliğini arttırmak için cilt kremlerinde kullanılır (Oren 2002c).

6. Biyolojik sorumlu iyileştiriciler olarak:

Halobacterium salinarium 84- kDa proteini üretir. Bu protein kanser hastalarında üretilen C- myconcogene karşı üretilen antibadileri keşfetmek için kullanılır. Bu genetik mühendisliğinde *E.coli* içinde üretilen insan myc proteininden daha pozitif sonuçlar vermektedir (Oren 2002c).

7. Petrol Eldesinde:

Haloferax mediterranei akua sistemlerin reolojik özelliklerini değiştirmek üzere kullanılan hücre dışı polisakkarit üretir. Bu salgı kalınlaştırıcı ve jel maddesi olarak viskoziteyi stabilize eder. Bu polisakkarit pH, sıcaklık ve yüksek tuz konsantrasyonuna karşı dirençlidir ve bu nedenle petrol kuyularından petrol çıkarma işlemini iyileştirmek için kullanılabilir(Oren 2002c).

8. Çevre Biyoteknolojisinde:

Alkalin endüstriyel sular veya tuzlu sulardan biyolojik fosfatın uzaklaştırılması için halofilik bakterilerin kullanılması mümkündür. Biyolojik fosfatı çekmesi için mikroorganizmaların kullanılması önerilmektedir (Garcia ve ark. 2005). *Halomonas sp.*'nin tuzlu fenolik atık suların temizlenmesinde kullanılabilceği gösterilmiştir.

Aromatik bileşiklerle kontamine olmuş tuzcul çevrelerde halofilik bakterilerin katabolik rolünü Garcia ve ark., (2005) araştırmışlardır. Hipersalin Oklahoma büyük tuz düzlüklerinde benzen ve toluenin aerobik parçalanırlılığı test edilmiş ve halofilik mikroorganizmaların parçalamadaki rolü gösterilmiştir (Nicholson ve Fathepure, 2005). Lefebvre ve ark. (2005) deri işleme atık suyunun biyolojik olarak temizlenmesi için halofilik mikroorganizmaları önermişlerdir.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Medyum A

NaCl.....	250 g
KCl.....	5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	5 g
NH ₄ Cl.....	5 g
Yeast Extract.....	10 g
Distile Su.....	1 lt

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

2.1.1.2. Medyum B

NaCl.....	200 g
KCl.....	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	20 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.02 g
Tri-Na- Citrate.....	3 g
Casamino acid.....	7.5 g

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

2.1.1.3. Medyum C

NaCl.....	175 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	20 g
K ₂ SO ₄	5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.1 g
Yeast Extract.....	5 g
Distile Su.....	1 lt

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

2.1.1.4. Medyum D

NaCl.....	206 g
KCl.....	0.37 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	36 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.5 g
MnCl ₂	0.013 g
Yeast Extract.....	5 g
Distile Su.....	1 lt

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

2.1.1.5. Medyum E

NaCl.....	125 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	160 g
K ₂ SO ₄	5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.1 g
Yeast Extract.....	1g

Casamino acid.....	1 g
Starch.....	2 g
Distile Su.....	1 lt

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

2.1.1.6. Medyum Haloarcula

NaCl.....	206 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	36 g
KCl.....	0.37 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,5 g
MnCl ₂	0,013 g
Yeast Extract.....	5 g
Distile Su.....	1 lt

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

2.1.1.7. % 12 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

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

Çözünücüye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 'ı 7.5'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanarak 121 °C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.8. % 18 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

% 30 'luk tuzlu su çözeltisi.....	600 ml
Saf Su.....	367 ml
Pepton.....	5 g
Yeast Ekstrakt.....	1 g

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 'ı 7.5 'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanarak 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.9. % 23 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

% 30 'luk tuzlu su çözeltisi.....	767 ml
Saf Su.....	200 ml
Pepton.....	5 g
Yeast Ekstrakt.....	1 g

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 'ı 7.5 'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanarak 121 °C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.10. % 25 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

% 30 'luk tuzlu su çözeltisi.....	833 ml
Saf Su.....	134 ml
Pepton.....	5 g
Yeast Ekstrakt.....	1 g

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 'ı 7.5 'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanarak 121 °C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.1.11.%25 Deniz Suyu (SW) (g/l)

NaBr.....	0.65 g
HNaCO ₃	0.167 g
KCl.....	5.0 g
CaCl ₂	0.723 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	49.492 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	34.567 g
NaCl.....	195g
Yeast Extrakt.....	5-1 g
Agar.....	20 g

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 °C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodriguez-Valera ve ark. 1985).

2.1.1.12. Nişasta Besiyeri

CaCl ₂ .6H ₂ O.....	0.2 g
KCl.....	2.0 g
Nişasta.....	20.0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	20.0 g
Agar.....	20.0 g
NaCl.....	250.0 g
Distile su.....	1 lt
pH.....	7.0

Kompleks gelişme besiyeri içine çözümlü nişasta ilave edilerek kaynatılır. Nişasta tamamen çözüldükten sonra besiyerinin pH'ı 7.0'ye ayarlanır.121 °C 'de 15 dakika otoklavda steril edilerek steril petri kutularına dökülür.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

2.1.1.1. %25 Deniz Suyu (SW) (g/l)

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

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121 °C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Rodriguez-Valera ve ark. 1985).

2.1.2.2. %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

Çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-Base ile pH 'ı 7.6'ye ayarlanır.Son hacim distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanarak 121 °C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith 2004).

2.1.2.3. TAE 50X (1 litre için)

Tris base.....	242 g
Asetik asit.....	57.1 ml

EDTA (0.5 M pH 8).....100 ml

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

2.1.2.4. TBE 5X(1 lt için)

Tris base.....54 g

Borik asit.....27.5 g

EDTA (0.5 M pH 8).....20 ml

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

2.1.2.5. PBS 10X

NaCl.....80 g

Na₂HPO₄.7H₂O.....11.5 g

KCl.....2 g

KH₂PO₄.....2 g

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 8 'e ayarlanır, 121 °C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve oda sıcaklığında saklanır (Sambrook ve ark 1989).

2.1.2.6. Elektroforez için Yükleme Tamponu (6x)

Ksilensiyanol 0.25 %

Bromofenol blue 0.25 %

Gliserol 30 %

Oda sıcaklığında saklanır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.2.7. In sitü Hibridizasyon Tamponu

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

Hazırlanıp buz üzerine konulur (Anton ve ark.1999).

2.1.2.8. FISH için Yıkama Tamponu

Tris-HCl (1 M pH 8).....	1 ml
NaCl (5M).....	700 µl
EDTA (0,5 M).....	500 µl
mQ su ile 50 ml'ye tamamlanır (Anton ve ark. 1999).	

2.1.2.9. Yağ Asidi Analizi Solüsyonları

Reagent I (Saponifikasyon ayıracı)

Sodyum Hidroksit(ACS).....	45 g
Metanol (HPLC saflıkta).....	150 ml
Deionize Distile Su.....	150 ml

Reagent II (Metilasyon ayıracı)

6.00 N Hidroklorik Asit.....	325 ml
Metanol (HPLC saflıkta).....	275 ml

Reagent III (Ekstraksiyon ayıracı)

Heksan (HPLC saflıkta).....	200ml
Metiltert-butyl eter (HPLC saflıkta).....	200 ml

Reagent VI (Yıkama)

Sodyum Hidroksit (ACS).....10.8 g

Deionize Distile Su.....900 ml

NaCl: 40 g ACS NaCl 100 ml deionize suda çözülmüş, yeterli çökeltme olmayan durumlarda damlatılır (Telefoncu 2003).

2.1. METOD**2.2.1. Örneklerin Toplanması**

Tuzlu su örnekleri Çamaltı Tuzlası'nda bulunan 1.Kısım Tuzla, (9, 10, 14-15, 12,S4 nolu havuzlar) 2.Kısım Tuzla (8,27,Sergen, 23, Yeni Saha 8 nolu havuzlar), 2.Kısım Çöktürme Havuzları (1, 2, 3, 4 nolu havuzlar) ve Yol Kenarı Temmuz 2005 tarihinde alınmıştır. Toprak örnekleri tuzlanın muhtelif yerlerinden Ekim 2005 tarihinde alınmıştır. Su örnekleri 1litrelik cam şişelere, toprak örnekleri ise temiz naylon poşetlere konularak en kısa süre içerisinde soğuk zincirde laboratuara getirilerek analizlerine başlanmıştır.

2.2.1.1 Su örneklerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri

Su örneklerin toplam tuzluluk değerlerinin belirlenmesi amacıyla el refraktometresi (Eclipse) kullanılmıştır. Ölçümler örnekleme anında arazide yapılmıştır.

Su örneklerin pH değerlerinin belirlenmesi için TOA WQC su analiz cihazı kullanılmıştır. Ölçümler örnekleme anında yapılmıştır.

Su örneklerinde Ca, Na, K, Mg ve Mn iyonlarının miktar tayini Perkin Elmer Optical Emission Spectrometer Optima 4300 DV cihazı kullanılarak Anadolu Üniversitesi, Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi (BİBAM)'da yaptırılmıştır.

2.2.1.2. Toprak örneklerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri

Toprak örneklerinin pH, organik madde, %Na ve tuzluluk (EC10³ 25 °C mS/cm kimyasal analizi) T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Eskişehir Toprak ve Ekoloji Araştırmaları Enstitüsü Müdürlüğü'nde yaptırılmıştır.

2.1.2. Su ve Toprak Örneklerinde Canlı Bakteri Sayımı ve İzolasyonu

Örneklerdeki canlı bakteri sayısının belirlenmesi amacıyla %25'lik tuzlu su içerisinde su ve toprak örneklerinin farklı dilüsyonları hazırlanmış ve her bir dilüsyondan 1'er ml Medium E agara yayma ekim şeklinde ekilmiştir. 37 °C'de 3 haftalık inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılarak mililitredeki bakteri sayısı belirlenmiştir. Tüm örnekler için ekimler üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Su ve toprak örneklerindeki Halofilik Bacteria ve Archaea izolasyonu için farklı besiyerleri kullanılmıştır. Su örneklerinden 1'er ml Medium A, Medium B, Medium C, Medium D, Medium E, Medium Haloarcula, %12 MGM agar, %18 MGM agar, %23 MGM agar, %25 MGM agar, %0.5 ve %0.1 yeast ekstrakt içeren %25 "sea water" agar ve aynı besiyerlerinin sıvı ortamlarına ekilerek petripler 37 °C 'de inkübe edilmiştir. Toprak örnekleri ise %25 NaCl içeren su içerisinde 10⁻⁵ 'e kadar seyreltme yapılarak aynı besiyerlerine ekilerek petripler 37 °C'de inkübe edilmiştir. 3-4 haftalık inkübasyon sonrasında oluşan koloniler alınarak arka arkaya yapılan çizgi ekimlerle saf kültürler elde edilmiştir (Oren 1999; Dyall-Smith 2000; Anton ve ark. 2000). Çalışma sırasında elde edilen saf kültürler %15'lik gliserol içerisinde stok edilerek -85 °C 'de muhafaza edilmektedir.

2.2.3.İdentifikasyon

2.2.3.1 Morfolojik ve Biyokimyasal Testler

Gram Boyama

Aşırı derecede halofilik mikroorganizmaların gram boyaması Dussault (1955)'e göre yapılmıştır. Modifiye edilmiş bu boyama yönteminde, lam üzerine yayılan örnek önce %2'lik asetik asit ile 5 dakika muamele edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra %0.25'lik kristal viole ile 3 dakika boyanmış, lugol ile 1 dakika, alkol ile 10 saniye ve son olarak da safranin ile 1 dakika boyanmıştır. Ara yıkama işlemleri için %25'lik NaCl çözeltisi kullanılmıştır (www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook).

İzolatların Farklı Karbon ve Şeker Kaynaklarını Kullanma Durumlarının Belirlenmesi

İzolatların farklı karbon ve şeker kaynaklarını kullanabilme yeteneklerinin belirlenebilmesi amacıyla Medium E besiyerine D- fruktoz, maltoz, sukroz, D- galaktoz, glikoz, L- arabinoz, D+ trehaloz, D+ raffinose, laktoz, mannitol son konsantrasyonu 5g/l olacak şekilde eklenerek inkübasyon sonrası renk değişimleri kontrol edilmiştir (Tindall 1992; Anton ve ark. 2002).

Katalaz Testi

Agarlı SW besiyerindeki koloniler üzerine bir kaç damla %3'lük hidrojenperoksit (H_2O_2) damlatılmıştır. Koloniler üzerinde gaz kabarcıklarının meydana gelmesi pozitif katalaz reaksiyonu, gaz kabarcıklarının gözlenmemesi ise negatif katalaz reaksiyonu olarak değerlendirilmiştir (Harley ve Prescott 1993, Oren ve ark. 1997).

Nişasta Hidrolizi Testi

Kültürler nişasta besiyerine azaltma yöntemiyle ekilir. 37 °C’de 15 gün inkübe edilir. İnkübasyon sonunda nişasta besiyerinde üremiş kùltürlere taze hazırlanmiş lugol çözeltilisi katı besiyeri yüzeyini örtecek miktarda dökülür ve bir kaç dakika temasta bırakıldıktan sonra berrak ve renksiz bölge nişasta hidrolizini, koloniler etrafındaki mavi bölge ise nişasta hidrolizi olmadığını göstermiştir (Harley ve Prescott 1993, Tomlinson ve Hochstein 1976).

2.2.3.2. Antibiyotiklere Duyarlılık Testi

İzolatların farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetlerinin ortaya konması amacıyla SW sıvı besiyerinde 3 hafta inkübe edilerek geliştirilen mikroorganizmalar, katı SW besiyerine kùltürlerin yayma ekimleri yapıldıktan sonra agar yüzeyine Penicillin G (10 U), Gentamicin (30 mg), Ampicillin (10 mg), Chloromphenicol (30 µg), Bacitracin (10 U), Ofloxacin (5µg), Azithromycin (15µg) diskleri konarak petriyeler 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası antibiyotik diskleri etrafındaki inhibisyon zonlarının varlığı kontrol edilerek hassasiyet durumları ortaya konulmuştur (Oren 1999; Anton 2002).

2.2.3.3. PCR ile identifikasyon

16S rRNA Geni Amplifikasyonu İçin İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu

İzmir Çamaltı Tuzlasından izole edilen mikroorganizmaların 16S rRNA geni amplifikasyonları için agar ortamı üzerinde geliştirilmiş olan kùltürlerden tek koloni alınarak 200 µl steril distile su içerisinde konmuş, 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiş ve 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüjün ardından

süpernatant kısmı yeni bir steril tüpe aktarılarak, PCR için buradan 3-5 µl template olarak kullanılmak üzere, -20 °C’de muhafaza edilmiştir (Anton ve ark. 1999; Dyall-Smith 2004).

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

Koloni morfolojisi olarak farklılık gösteren izolatlar seçilmiş, Archaea ve Bacteria spesifik primerler kullanılarak, bunların 16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, 50 µl hacimde son konsantrasyonları 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 200 µM deoksिनुकлеотидтрифосфатлар(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.2 µM primerler, 1 unite Taq DNA polimeraz enzimi ve 3-5 µl template DNA olacak şekilde reaksiyonlar kurulmuştur. 16S rRNA geni amplifikasyonlarında

Bacteria için: AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG ve GGT TAC CTT GTT ACG ACT T,

Archaea için: TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA ve GGT TAC CTT GTT ACG ACT T dizilimindeki primerler kullanılmıştır.

Reaksiyonlar Bio-Rad PTC-100 Peltier Thermal Cycler kullanılmıştır.

Archaea ve Bacteria üyelerinin 16S rRNA genlerinin amplifikasyonları için uygulana reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir;

94 °C 3 dakika (Denatürasyon),

94 °C 30 saniye

50 °C 1 dakika } 30 Döngü

72 °C 1 dakika

72 °C 10 dakika

4 °C Süresiz

Tüm çalışmalar boyunca hem pozitif hem de negatif kontrol reaksiyonları hazırlanmıştır. *Salinibacter ruber* DNA’sı Eubacteria için, *Haloferax*

mediterranaei DNA 'sı Archaea için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontroller DNA içermeyen reaksiyon karışımları ile oluşturulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jellerde gözlenmiştir (Anton ve ark. 1999).

2.2.3.4. Yağ Asidi Analizi

PCR ve antibiyotiklere hassasiyet testi sonucunda Bacteria üyesi olduğu belirlenen izolatlar yağ asidi metil esterlerinin (FAME) analizi için işleme alınmıştır.

Bu amaçla, üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde ve bazı modifikasyonlarla yöntem uygulanmıştır. Test edilecek halofilik mikroorganizmalar SW(%0,1) agarlı besi yerinde 37 °C de 21 gün inkübe edilerek saf koloniler halinde geliştirilmiştir. Geliştirilen izolatlardan yağ asidi analizi için steril bir tüpe 50 mg tartılmıştır. Tartılan her bir izolat saponifikasyon, metilasyon ve ekstraksiyon basamaklarından sonra yağ asitleri elde edilerek standart suşlar ile kıyaslanarak identifikasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Aşağıda bu işlemler ayrıntılı olarak verilmektedir.

1. Saponifikasyon: 1 ml Reagent I'den aktarılıp 5-10 defa vorteksle karıştırılıp 5 dakika 100 °C 'de bekletilmiş tekrar 5-10 defa vortekslenerek 100 °C'de 25 dakika bekletilerek hemen soğutulmuştur.

2. Metilasyon: 2 ml Reagent II ilave edilerek 5-10 dakika vortekslenmiş 80 °C 'de 10 dakika bekletilmiş ve hemen soğutulmuştur.

3. Ekstraksiyon: 1,25 ml Reagent III ilave edilerek 10 dakika yatay karıştırıcıda karıştırılarak alt faz uzaklaştırılmıştır.

4. Yıkama: 3 ml Reagent IV ilave edilerek yatay karıştırıcıda karıştırılmıştır ve üst fazın 2/3'ü yağ asidi analizi için alınmıştır.

Yağ asidi identifikasyonları, Sherlock Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi ile cihaz şartlarına uygun olarak ve TSBA 50 kütüphanesi ile yapılmıştır.

2.2.3.5. Floresan in sitü Hibridizasyon (FISH)

DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilin –dihidroklorur) İle Boyama

Örneklerdeki toplam mikroorganizma sayısının belirlenmesi amacıyla DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) boyaması yapılmıştır. Bunun için, su örneğinin filtrelendiği filtreden küçük bir parça kesilerek üzerine 20 µl DAPI (1µg/ml konsantrasyonda) damlatılmış ve oda sıcaklığında birkaç dakika bekletilmiştir. %96'lık alkol ile birkaç saniye muamele edildikten sonra steril distile su içerisine daldırılarak yine birkaç saniye bekletilmiş ve havada kurutulmuştur. Daha sonra mikroskopta gözlem amacıyla boyanmış olan filtre lam üzerine alınarak lamel ile kapatılmıştır. 100X objektif ile epifluoresan mikroskopta inceleme yapılmıştır (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999; Amann ve ark. 2000).

Çamaltı Tuzlası örneklerinin mikrobiyal kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla, Anton ve ark.'na göre (1999), FISH tekniği uygulanmıştır. Örnekler için kullanılan problemlerin özellikleri Tablo 2. 'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 1. Çalışmada Kullanılan FISH Problemlerinin Özellikleri

Adı	Dizisi (5' >3')	Formamid %'si	Problun Spesifitesi	Referans
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35	Bacteria	(Amanveark., 1990)
Arc915	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	20	Archaea	(Amanveark., 1995)
Non338	ATCCCTACGGGAGGCAGC	35	Negatifkontrol	(Amanveark., 1990)
EHB412	TACGCCCCATAGGGGTGT	35	EHB1 ve EHB2	(Antonveark., 2000)

Fiksasyon

Fiksasyon amacıyla, 1ml su örneğine 200 µl %37'lik Formaldehit (Fluka) eklenerek, 4 °C 'de 1 gece inkübe edilmiştir. Toprak örnekleri için ise 1gr toprak 9 ml distile su içerisinde seyreltilmiştir. Fiksasyon amacıyla, seyreltilmiş toprak örneğine 200 µl %37'lik Formaldehit (Fluka) eklenerek, 4 °C 'de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 10 ml 1X'lik steril PBS eklenerek karışım 0,2 µm por çaplı GTTP Isopore (Millipore) filtreden geçirilmiştir. Filtrenin yıkanması amacıyla tekrar 1X'lik 10 ml PBS filtreden geçirildikten sonra filtreler hibridizasyon işlemine kadar muhafaza edilmek üzere -20 °C 'ye konulmuşlardır (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999).

Hibridizasyon

Her bir hibridizasyon reaksiyonu için bir parça filtre üzerine 18 µl hibridizasyon karışımı ve 2 µl kullanılacak probdan (Tablo 2.1) eklenmiştir. Her bir prob 50ng/µl konsantrasyonda kullanılmıştır. Hibridizasyon işlemi, hibridizasyon buffer ile ıslatılmış kağıt içeren 50 ml'lik plastik tüplerde yapılmıştır. Bu tüpler yatay şekilde hibridizasyon fırınına (Combi-H, FINEPCR, Precision, Ind. Co) yerleştirilerek 2 saat boyunca 46 °C'de inkübe edilmişlerdir. Filtrenin yıkanması için, 48 °C'lik su banyosunda beklemekte olan yıkama solüsyonu içerisine filtreler konularak 15 dakika bekletilmiştir. Sonrasında havada tamamen kurumaları sağlanmıştır. Bu işlemden sonra filtreler DAPI boyaması için hazır hale getirilmiştir (Amann ve ark. 1995; Anton ve ark. 1999).

3. BULGULAR

3.1. Örneklerin Toplanması

Tuzlu su ve tuzlu toprak örnekleri İzmir ili Çamaltı Tuzlasından alınarak, su örnekleri 1 litrelik cam şişelere, toprak örnekleri ise temiz naylon poşetlere konularak en kısa süre içerisinde soğuk zincir ile laboratuvara getirilerek analizlerine başlanmıştır.

3.2. Örneklerdeki Toplam Tuz ve pH Değerlerinin Belirlenmesi

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

Tablo 3.1. Örneklerin Arazide Ölçülen Toplam Tuzluluk ve pH Değerleri

	HAVUZ	HAVUZ	p H	% NaCl
1.Kısım Tuzla				
H1 . 1	9	Kristalize	7,59	%29
H1 . 2	10	Kristalize	7,61	%29
H1 . 3	14-15	Rezerv	7,5	%27,50
H1 . 4	12	Sıcak	7,85	%15
H1 . 5	S4	Soğuk	7,94	%19
2.Kısım Tuzla				
H2 . 6	8	Kristalize	7,45	%29,20

Tablo 3.1.(Devam) Örneklerin Arazide Ölçülen Toplam Tuzluluk ve pH Değerleri

H2 . 7	27	Kristalize	7,56	%30
H2 . 8	Sergen	Rezerv	7,86	%16,20
H2 . 9	23	Sıcak su	8,08	%19
H2 . 10	Yeni Saha 8	Soğuk su	8,5	%6
2.Kısım Çöktürme Havuzları				
Ç . 1	1	Çöktürme havuzu	7,35	%29
Ç . 2	2	Çöktürme havuzu	7,56	%28,20
Ç . 3	3	Çöktürme havuzu	7,33	%29,50
Ç . 4	4	Çöktürme havuzu	7,33	%30
Yol Kenarı			7,30	%15

3.3. Su örneklerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri

Tablo 3.1’de Çamaltı tuzlasından alınan su örneklerinin alındığı havuzlar, havuzların özellikleri ve örneklerin pH, tuzluluk ve diğer fiziksel özellikleri verilmektedir. Su örneklerinin kimyasal analizi Perkin Elmer Optical Emission Spectrometer Optima 4300 DV cihazında yapılmıştır. Örneklerin analizi Anadolu Üniversitesi, Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi (BİBAM)’da yapılmıştır. Su örneklerinin kimyasal analiz sonuçları Tablo.3.2.’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çamaltı Tuzlası Su Örneklerinin Kimyasal Analizi

Örnek alınan istasyonlar	Ca	Na	K	Mg	Mn
H1 . 1	16.91 mg/L	137.3 g/L	11.02 g/L	9.072 g/L	47.62 ppb
H1 . 2	2.184 g/L	75.41 g/L	30.20 g/L	6.080 g/L	2.671 ppb
H1 . 3	64.07 ppm	99.24 g/L	5.171 g/L	7.692 g/L	74.87 ppb
H1 . 4	609.1 mg/L	76.46 g/L	2.271 g/L	4.766 g/L	3.456 ppb
H1 . 5	21,63 ppm	102.5 g/L	5.527 g/L	14.38 g/L	219.7 ppb
H2 . 6	41.50 mg/L	132.5 g/L	6.233 g/L	5.652 g/L	5.051 ppb
H2 . 7	174.8 mg/L	72.12 g/L	2.984 g/L	4.721 g/L	< D.L.
H2 . 8	10.07 mg/L	125 g/L	6.106 g/L	11.22 g/L	8.913 ppb
H2 . 9	19.30 mg/L	135.1 g/L	5.0324 g/L	5.872 g/L	108.7 ppb
H2 . 10	89.2 mg/L	40.56 g/L	518.1 mg/L	785 mg/L	< D.L.
Ç . 1	289.8 mg/L	110.7 g/L	2.289 g/L	4.792 g/L	18.67 ppb
Ç . 2	4.693 mg/L	97.75 g/L	7.385 g/L	18.590 g/L	350.5 ppb
Ç . 3	12 mg/L	173.5 g/L	7.058 g/L	13.44 g/L	11.38 ppb
Ç . 4	13.10 mg/L	105.8 g/L	5.152 g/L	12.36 g/L	56.97 ppb
Yol Kenarı	70.1 mg/L	14.280 g/L	449.1 mg/L	898 mg/L	2 ppb

Ca 317.933 nm, Na 589.592 nm, K 766.490, Mg 285.213 nm, Mn 257.610 n'de çalışılmıştır. Mn için D.L.:1.4 ppb

3.4. Toprak örneklerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri

Toprak örneklerinin pH, organik madde, %Na ve tuzluluk ($EC10^3$ 25 °C mS/cm kimyasal analizi) T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Eskişehir Toprak ve Ekoloji Araştırmaları Enstitüsü Müdürlüğü'nde yaptırılmıştır.

Tablo 3.3. Çamaltı Tuzlası Toprak Örneklerinin Kimyasal Analizi

pH	Organik Madde %	Na	Tuzluluk $EC10^3$ mS/cm	Örnek Alınan İstasyonlar
7,65	1,88	7,52	74,19	Çamaltı Toprak 1
7,60	1,77	9,05	109,57	Çamaltı Toprak 2
7,70	1,45	0,45	20,54	Çamaltı Toprak 3
8,40	0,86	0,89	34,24	Yol Kenarı
8,40	0,99	3,04	79,89	Havuz Tabanı

3.5. Su ve Toprak Örneklerinde Canlı Mikroorganizma Sayımı

Örneklerdeki canlı bakteri sayısının belirlenmesi amacıyla %25'lik tuzlu su içerisinde toprak örneklerinin farklı dilisyonları hazırlanmış ve her bir dilisyondan 1'er ml Medium E agara yayma ekim şeklinde ekilmiştir. Ayrıca su örnekleri de 1'er ml Medium E agara yayma ekim şeklinde ekilmiştir. 37 °C'de 3 haftalık inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılarak mililitredeki bakteri sayısı belirlenmiştir.

Tablo.3.4. Çamaltı su örneklerinin canlı bakteri sayımı

	HAVUZ NO	HAVUZ TİPİ	% NaCl	CANLI BAKTERİ SAYISI (kob/ml)
1.Kısım Tuzla				
H1 . 1	9	Kristalize	%29	2×10^3
H1 . 2	10	Kristalize	%29	$3,2 \times 10^3$
H1 . 3	14-15	Rezerv	%27,50	4×10^3
H1 . 4	12	Sıcak	%1	$3,8 \times 10^4$
H1 . 5	S4	Soğuk	%19	5×10^3
2.Kısım Tuzla				
H2 . 6	8	Kristalize	%29,20	3×10^3
H2 . 7	27	Kristalize	%30	$3,7 \times 10^3$
H2 . 8	Sergen	Rezerv	%16,20	2×10^4
H2 . 9	23	Sıcak su	%19	3×10^4
H2 . 10	Yeni saha 8	Soğuk su	%6	4×10^5
2.Kısım Çöktürme Havuzları				
Ç . 1	1	Çöktürme havuzu	%29	2×10^3
Ç . 2	2	Çöktürme havuzu	%28,20	$1,8 \times 10^3$
Ç . 3	3	Çöktürme havuzu	%29,50	$2,2 \times 10^3$
Ç . 4	4	Çöktürme havuzu	%30	$1,8 \times 10^3$
Yol Kenarı			%15	$1,25 \times 10^3$

Tablo.3.5. Çamaltı Toprak örneklerinin canlı bakteri sayımı

Toprak örnekleri	Tuzluluk EC10 ³ 25 ⁰ C mS/cm	Canlı Bakteri Sayısı
Çamaltı Toprak 1	74,19	2x10 ³
Çamaltı Toprak 2	109,57	1,9x10 ³
Çamaltı Toprak 3	20,54	3x10 ⁶
Yol Kenarı	34,24	2,2x10 ⁵
Havuz Tabanı	79,89	1,3x10 ³

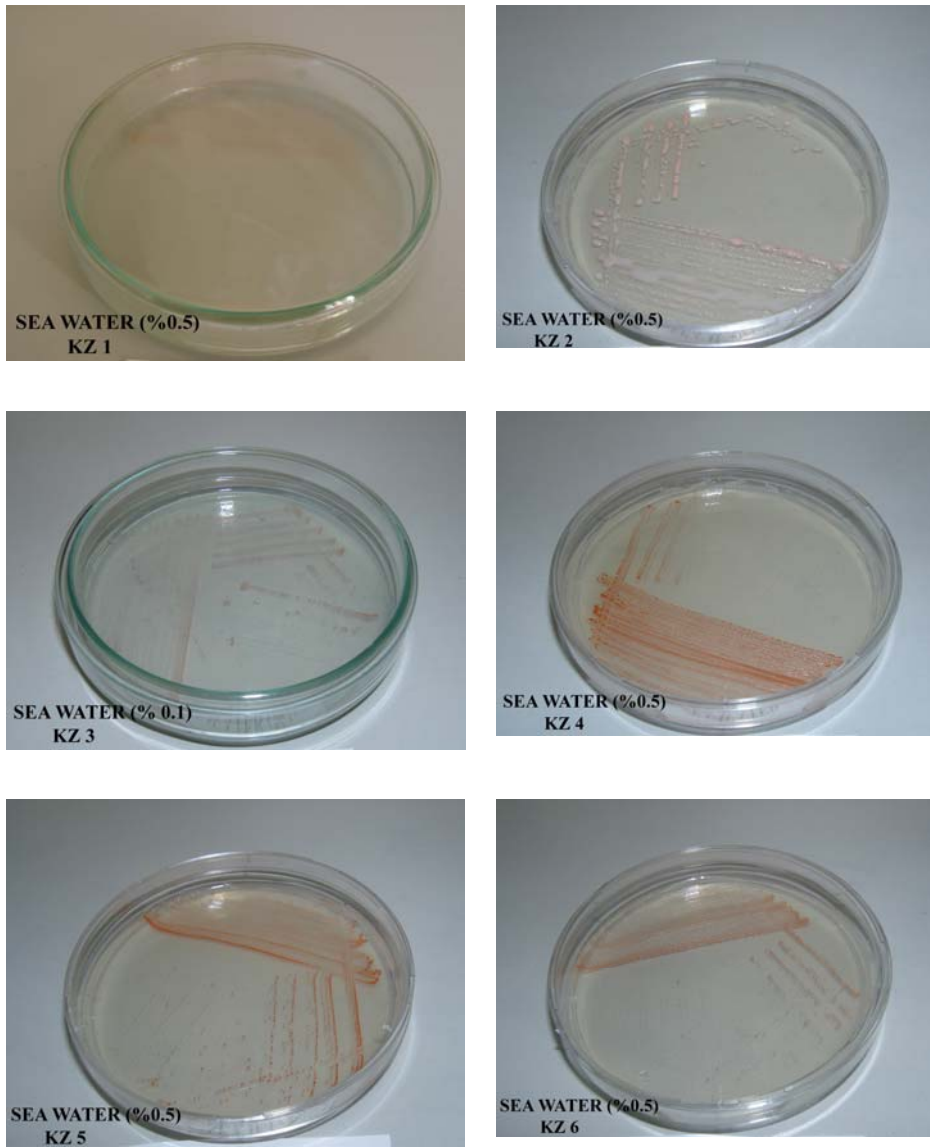
Su örneklerinde 1. kısım tuzlada en düşük canlı bakteri sayısı 2x10³ (9 nolu havuz, % 29 NaCl) ile en yüksek 3,8x10⁴ (12 nolu havuz %15 NaCl) olarak tesbit edilmiştir. 2. kısım tuzlada en düşük canlı bakteri sayısı 3x10³ (8 nolu havuz %29,20 NaCl) ile en yüksek 4x10⁵ (Yeni saha 8 nolu havuz, % 6 NaCl), 2.kısım çöktürme havuzlarında en düşük canlı bakteri sayısı 1,25x10³ (Yol Kenarı %15 NaCl) ile en yüksek 2,2x10³ (3 nolu çöktürme havuzu, %29,50 NaCl) olarak belirlenmiştir. Toprak örneklerinde ise en düşük 1,3x10³ (Havuz Tabanı 79,89 Tuzluluk EC10³ 25⁰C) ile en yüksek 3x10⁶ (Çamaltı Toprak3 20,54 Tuzluluk EC10³ 25⁰C mS/cm) canlı bakteri sayılmıştır.

3.6. Su ve Toprak Örneklerinden Archaea ve Bacteria İzolasyonu

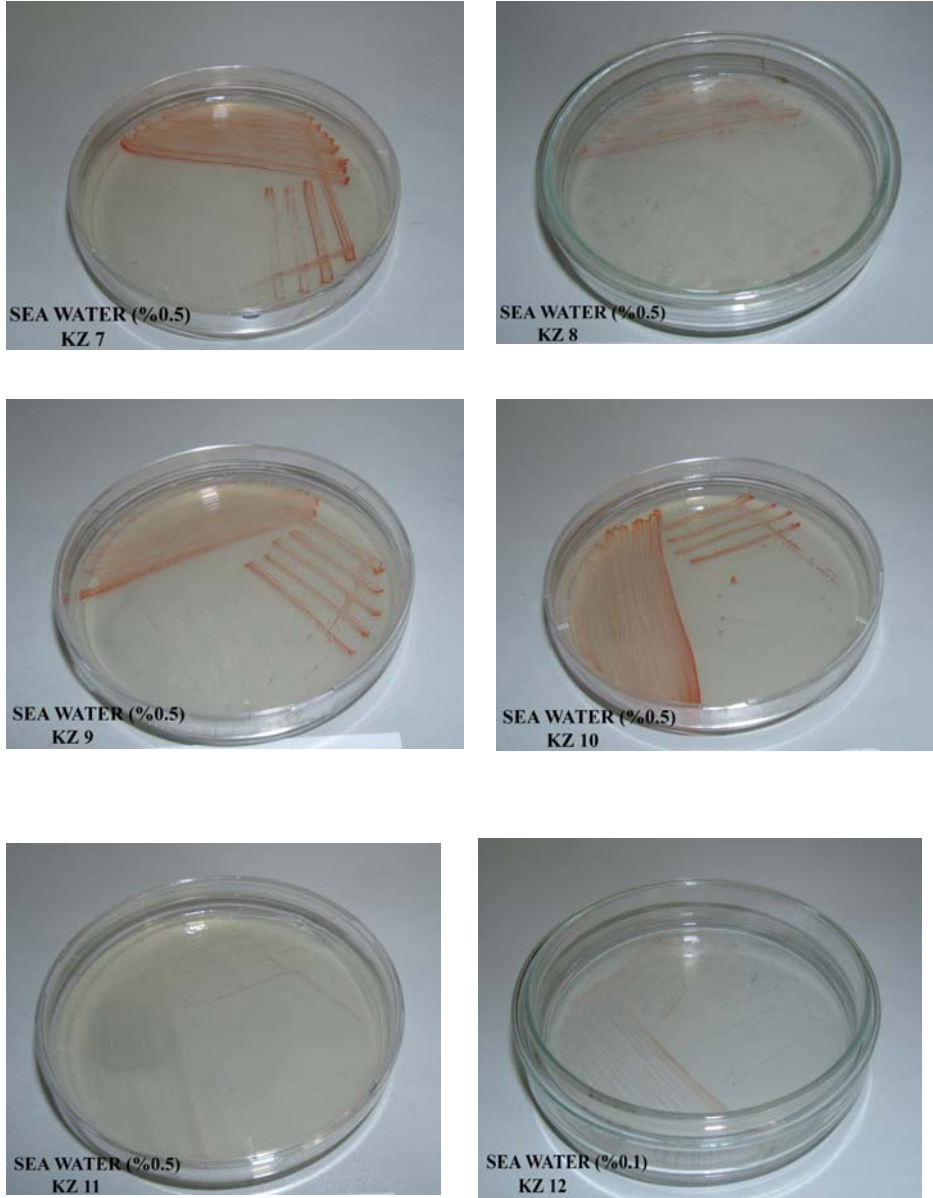
Yapılan denemelerde su örneklerinde Medyum E ve %25 SW besiyerlerinin izolasyon için uygun oldukları belirlenmiş ve bu nedenle izolasyon aşamasında bu besiyerleri kullanılmıştır. Yine farklı besi ortamları (Medyum A,B, C, D, E, Haloarcula, farklı tuz konsantrasyonlarında MG medyumlar)da kültürlerin elde edilmesinde kullanılmıştır.

Toprak örneklerinde ise, Medyum A, B, C, D, E, Haloarcula, %12 MGM ve %23 MGM besiyerleri kullanılarak izolasyon yapılmıştır.

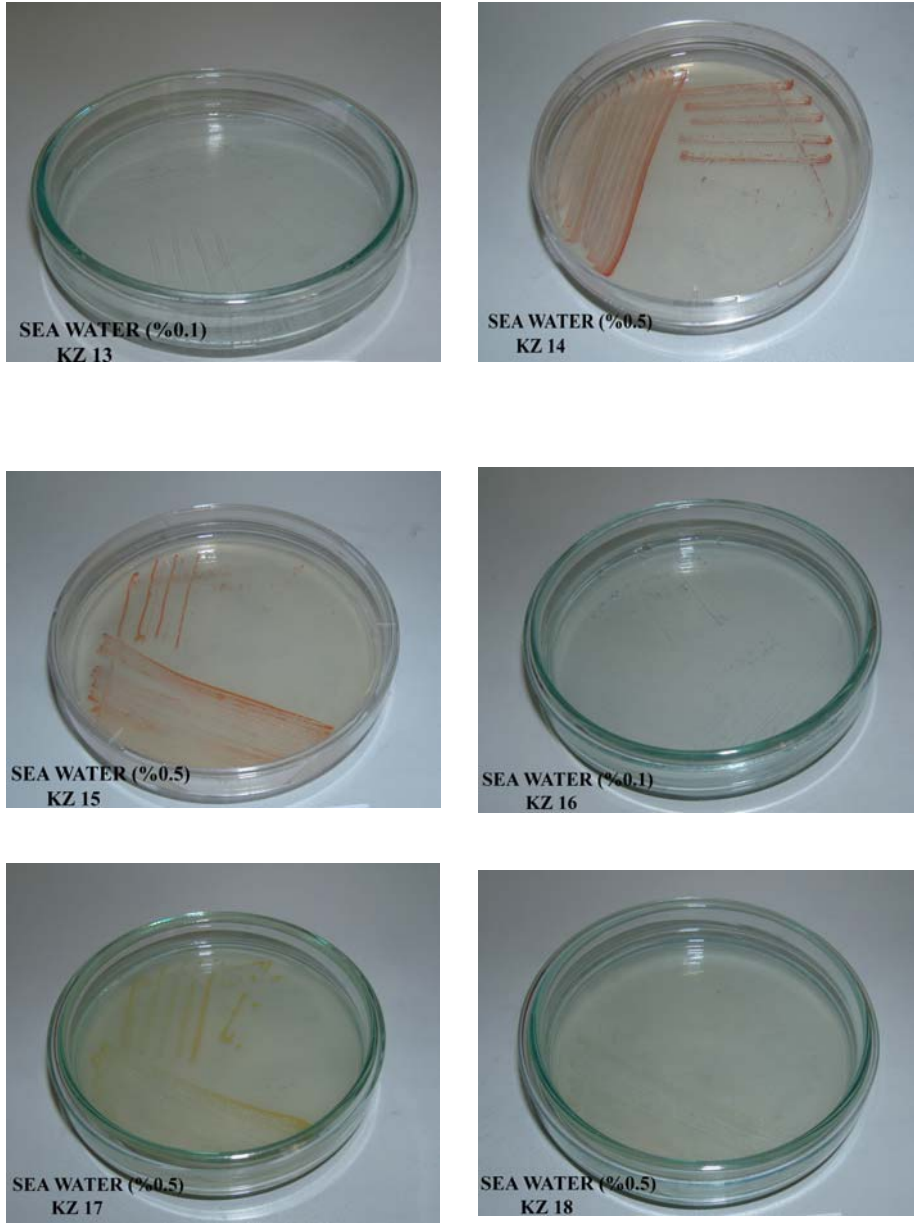
İzolasyon aşamasında renk ve koloni morfolojisi bakımından farklı olduğu düşünülen 34 adet (21 tanesi su örneklerinden, 13 tanesi toprak örneklerinden) izolat seçilerek çalışılmak üzere stoklanmıştır. Aşağıdaki şekil 3.1.'de farklı renk ve şekilli kolonilere sahip bazı izolatların geliştikleri besiyerlerindeki görüntüleri verilmiştir.



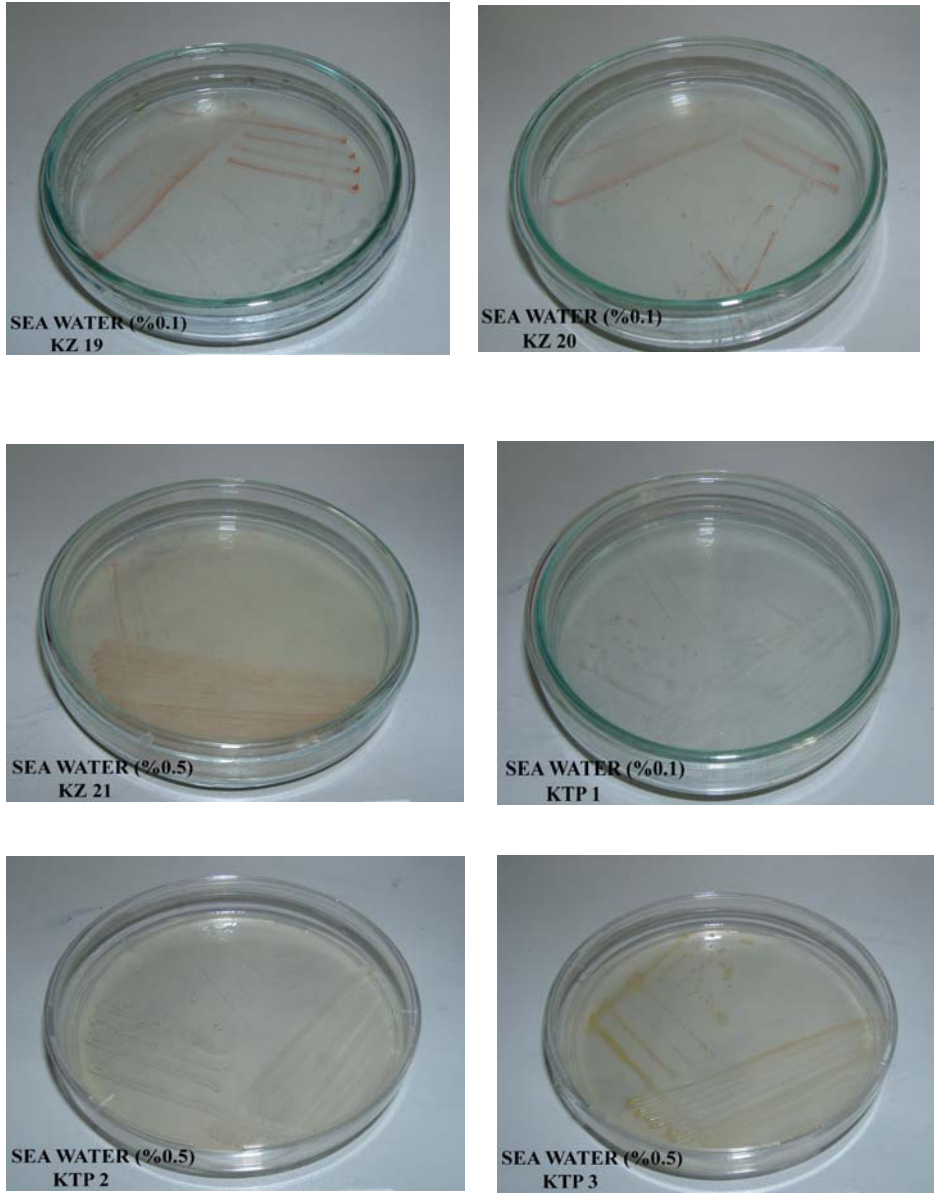
Şekil 3.1. Farklı pigmentasyona sahip izolatların agar üzerindeki görüntüleri



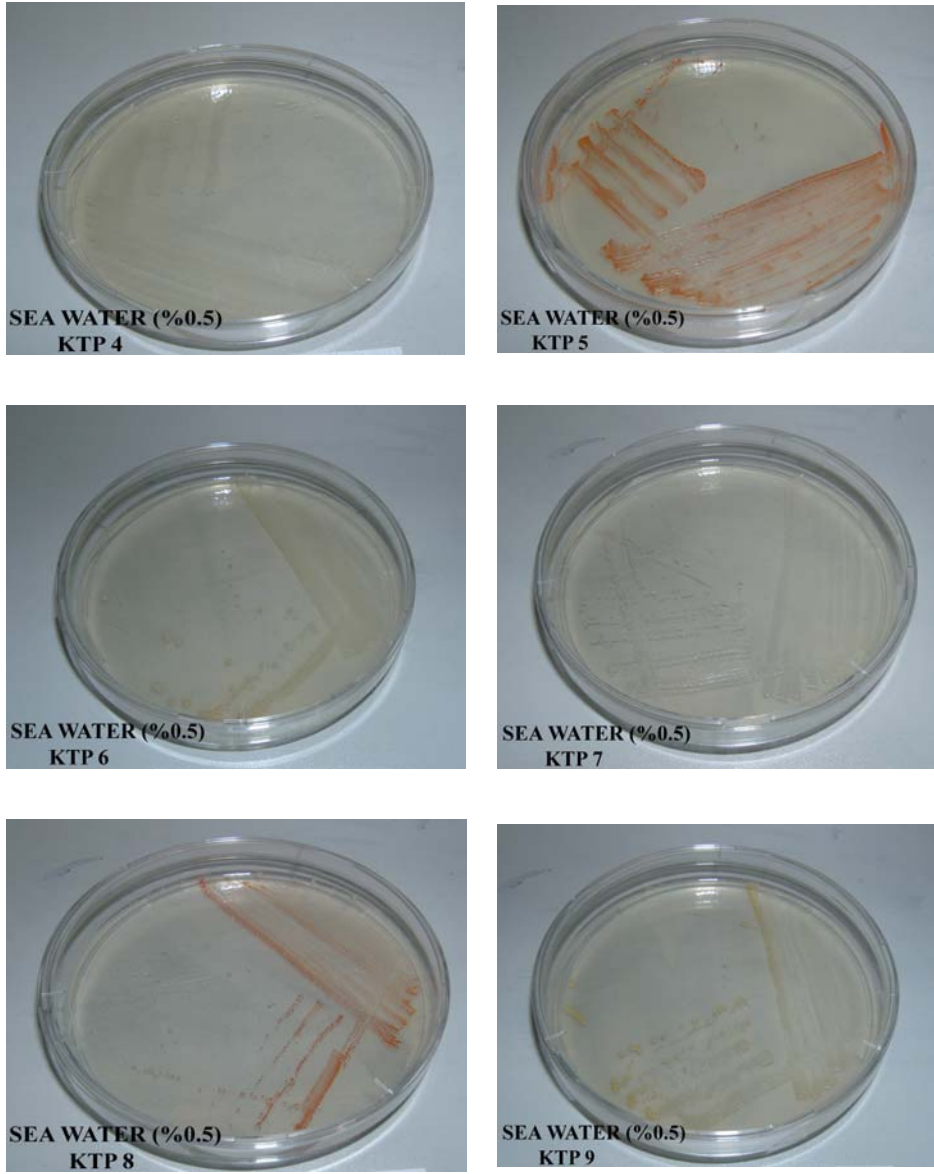
Şekil 3.1(Devam). Farklı pigmentasyona sahip izolatların agar üzerindeki görüntüleri



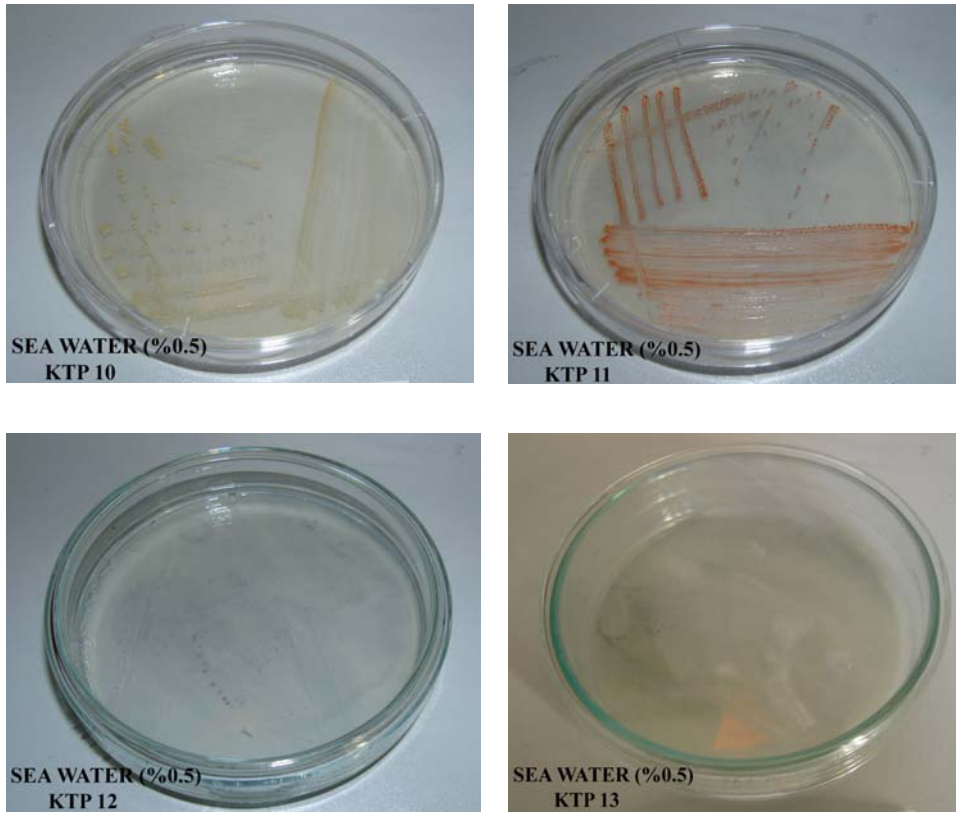
Şekil 3.1(Devam). Farklı pigmentasyona sahip izolatların agar üzerindeki görüntüleri



Şekil 3.1(Devam). Farklı pigmentasyona sahip izolatların agar üzerindeki görüntüleri



Şekil 3.1(Devam). Farklı pigmentasyona sahip izolatların agar üzerindeki görüntüleri



Şekil 3.1. (Devam) Farklı pigmentasyona sahip izolatların agar üzerindeki görüntüleri



Şekil 3.2. Farklı pigmentasyona sahip izolatların sıvı ortamdaki görüntüleri (KZ3 ve KZ11 nolu izolatlar).

3.7. İdentifikasyon

3.7.1 Morfolojik ve Biyokimyasal Testler

Gram Boyama

Gram boyama sonuçlarına göre su izolatlarının hepsi pembe renkli gram negatif (Gr -), toprak izolatlarından 4 tanesi (KTP1, KTP2, KTP6, KTP8) pembe renkli gram negatif (Gr -), 9 tanesi mor renkli gram pozitif (Gr +) boyanmış ve morfolojileri kok, kısa çubuklar, düzensiz üçgenler disk şeklinde hücreler gözlenmiştir. Şekil 3.3. ve şekil 3.4’de modifiye edilmiş Gram boyama sonrası boyanmış hücreler görülmektedir.

Tablo.3.6.Çamaltı Tuzlasında izole edilen izolatların Gram Reaksiyonları, Koloni Morfolojileri ve Pigmentasyonu

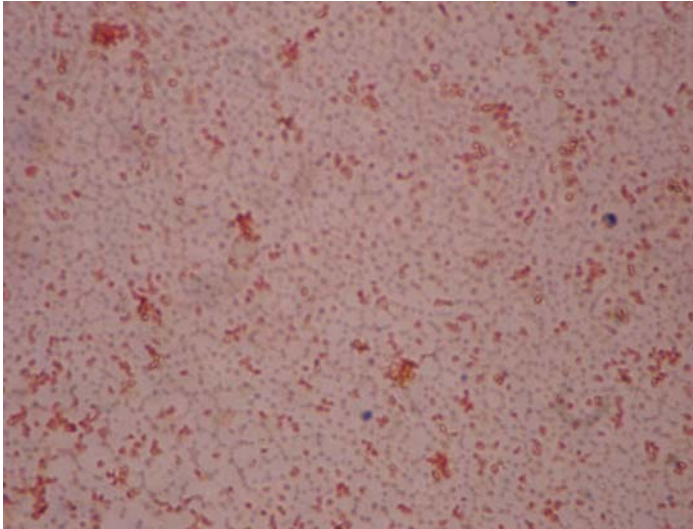
İZOLAT	Gram Reaksiyonu	Koloni Şekli	Pigmentasyon
KZ1	-	Yuvarlak	Pembe
KZ2	-	Yuvarlak	Akıcı-Pembe
KZ3	-	Yuvarlak	Turuncu
KZ4	-	Yuvarlak	Turuncu
KZ5	-	Yuvarlak	Turuncu
KZ6	-	Yuvarlak	Turuncu
KZ7	-	Yuvarlak	Koyu Kırmızı
KZ8	-	Yuvarlak	Koyu Kırmızı
KZ9	-	Yuvarlak	Parlak Kırmızı

Tablo.3.6.(Devam) Çamaltı Tuzlasında izole edilen izolatların Gram Reaksiyonları, Koloni Morfolojileri ve Pigmentasyonu

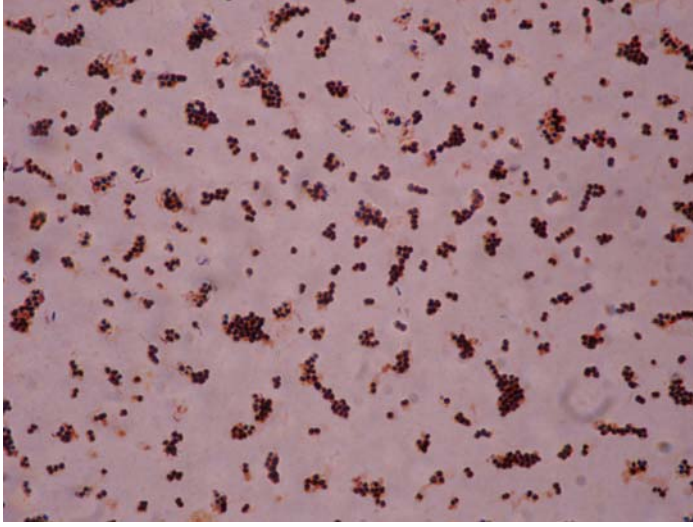
KZ10	-	Yuvarlak	Kırmızı
KZ11	-	Yuvarlak	Krem
KZ12	-	Yuvarlak	Kırmızı
KZ13	-	Yuvarlak	Parlak Krem
KZ14	-	Yuvarlak	Parlak Kırmızı
KZ15	-	Yuvarlak	Turuncu
KZ16	-	Yuvarlak	Krem
KZ17	-	Yuvarlak	Oksit Sarı
KZ18	-	Yuvarlak	Krem
KZ19	-	Yuvarlak	Kırmızı
KZ20	-	Yuvarlak	Kırmızı
KZ21	-	Yuvarlak	Kırmızı
KTP1	-	Yuvarlak	Krem
KTP2	-	Yuvarlak	Krem
KTP3	+	Yuvarlak	Oksit Sarı
KTP4	+	Yuvarlak	Krem
KTP5	+	Yuvarlak	Parlak Turuncu

Tablo.3.6.(Devam) Çamaltı Tuzlasında izole edilen izolatların Gram Reaksiyonları, Koloni Morfolojileri ve Pigmentasyonu

KTP6	-	Yuvarlak	Koyu Krem
KTP7	+	Yuvarlak	Krem
KTP8	-	Yuvarlak	Pembe
KTP9	+	Yuvarlak	Oksit Sarı
KTP10	+	Yuvarlak	Koyu Krem
KTP11	+	Yuvarlak	Krem
KTP12	+	Yuvarlak	Krem
KTP13	+	Yuvarlak	Krem



Şekil 3.3. Modifiye Gram boyama işlemi sonrası Gram negatif olarak boyanmış kok şekilli hücreler (KZ1 nolu izolat)



Şekil 3.4. Modifiye Gram boyama işlemi sonrası Gram pozitif olarak boyanmış kok şekilli hücreler (KTP9 nolu izolat).

İzolatların Farklı Karbon ve Şeker Kaynaklarını Kullanma Durumunun Belirlenmesi

İzolatların farklı karbon ve şeker kaynaklarını kullanabilme yetenekleri ile ilgili test sonuçlarına göre, tüm izolatlar Fruktoz, Maltoz, Sukroz, Galaktoz, Glukoz, Arabinoz, Trehaloz, Raffinoz, Laktoz, Mannitolü kullanabilme yeteneğindedirler. Aşağıdaki fotoğrafta görüldüğü gibi kırmızı renkli tüp kontrol amaçlıdır. Sarı renkli tüpler ise mikroorganizmaların şekeri kullandığını göstermektedir. 34 izolatın bu şekerleri kullandığı görülmüştür.



Şekil 3.5. İzolatların farklı karbon ve şeker kaynaklarını kullanabilme yetenekleri

Katalaz Testi

SW agar besiyerindeki koloniler üzerine bir kaç damla %3'lük hidrojenperoksit (H_2O_2) damlatılmıştır. Besiyeri üzerinde gaz kabarcıklarının meydana gelmesi pozitif katalaz reaksiyonu, gaz kabarcıklarının gözlenmemesi negatif katalaz reaksiyonu olarak değerlendirilmiştir. İzolatların hepsinde gaz kabarcığı gözlenmiş yani pozitif sonuç vermiştir. Katalaz testi sonuçları tablo 3.7.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. Katalaz reaksiyonu sonuçları

İzolat No	Katalaz Reaksiyonu	İzolat No	Katalaz Reaksiyonu
KZ1	+	KZ18	+
KZ2	+	KZ19	+
KZ3	+	KZ20	+
KZ4	+	KZ21	+
KZ5	+	KTP1	+
KZ6	+	KTP2	+
KZ7	+	KTP3	+
KZ8	+	KTP4	+
KZ9	+	KTP5	+
KZ10	+	KTP6	+
KZ11	+	KTP7	+
KZ12	+	KTP8	+
KZ13	+	KTP9	+
KZ14	+	KTP10	+
KZ15	+	KTP11	+
KZ16	+	KTP12	+
KZ17	+	KTP13	+

Nişasta Hidrolizi

Kültürler nişasta besiyerine azaltma yöntemiyle ekilmiştir. 37 °C ‘de 15 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda nişasta besiyerinde üremiş kültürlere lugol çözeltisi katı besiyerini örtecek miktarda dökülmüştür ve bir kaç dakika temasta bırakıldıktan sonra berrak ve renksiz bölge nişasta hidrolizini, koloniler etrafında mavi bölge ise nişasta hidrolizi olmadığını göstermiştir. İzolatlardan (KZ10, KZ11,KZ18,KTP9, KTP13) hariç diğerleri nişasta hidrolizinde pozitif sonuç vermiştir. İzolatların nişasta hidrolizi ile ilgili test sonuçları tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3.8. Nişasta Hidrolizi Testi Sonuçları.

İzolat No	Nişasta Hidrolizi	İzolat No	Nişasta Hidrolizi
KZ1	+	KZ18	-
KZ2	+	KZ19	+
KZ3	+	KZ20	+
KZ4	+	KZ21	+
KZ5	+	KTP1	+
KZ6	+	KRP2	+
KZ7	+	KTP3	+
KZ8	+	KTP4	+
KZ9	+	KTP5	+
KZ10	-	KTP6	+
KZ11	-	KTP7	+
KZ12	+	KTP8	+
KZ13	+	KTP9	-
KZ14	+	KTP10	+
KZ15	+	KTP11	+
KZ16	+	KTP12	+
KZ17	+	KTP13	-

3.7.2. Antibiyotiklere Duyarlılık Testi

SW besiyerine kültürlerin yayma ekimleri yapıldıktan sonra agar yüzeyine Penicillin G (10 U), Gentamicin (30 mg), Ampicillin (10 mg), Chloromphenicol (30 µg), Bacitracin (10 U), Ofloxacin (5µg), Azithromycin (15µg) diskleri konularak petripler 37 °C ‘de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zonlarının varlığı kontrol edilmiştir. 34 izolattan 19

tanesi (KZ1, KZ2, KZ3, KZ4, KZ5, KZ6, KZ7, KZ8, KZ9, KZ10, KZ12, KZ14, KZ15, KZ19, KZ20, KZ21, KTP5, KTP8, KTP11) Penisilin G'ye ve Kloromfenikol'e karşı dirençli olarak bulunmuştur. Penisilin G'ye direnç Archaea'ya ait bir özelliktir. Yine 34 izolattan 15 tanesi (KZ11, KZ13, KZ16, KZ17, KZ18, KTP1, KTP2, KTP3, KTP4, KTP6, KTP7, KTP9, KTP10, KTP12, KTP13) Basitrasin'e duyarlı oldukları belirlenmiştir ki bu da Archaea'ların genel karakteristik özelliklerindedir.

İzolatların farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetleri ile ilgili test sonuçları Tablo 3.9.'da verilmiştir.

Tablo 3.9. İzolatların farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetleri

İzolat No	Penicilin G (10U)	Gentamycin (10 mg)	Ampicillin (10mg)	Cloramphenicol (30 µg)	Bacitracin (10 U)	Ofloxacin (5mg)	Azithromycin (30mg)
KZ1	R	R	R	R	S	R	R
KZ2	R	R	R	R	S	R	R
KZ3	R	R	R	R	S	R	R
KZ4	R	R	R	R	S	R	R
KZ5	R	R	R	R	S	R	R
KZ6	R	R	R	R	S	R	R
KZ7	R	R	R	R	S	R	R
KZ8	R	R	R	R	S	S	R
KZ9	R	R	R	R	S	R	R
KZ10	R	R	R	R	S	R	R
KZ11	S	R	S	S	R	R	R
KZ12	R	R	R	R	S	R	R
KZ13	S	R	S	S	R	S	S
KZ14	R	R	R	R	S	R	R

Tablo 3.9.(Devam) İzolatların farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetleri

KZ15	R	R	R	R	S	R	R
KZ16	S	R	R	S	R	R	S
KZ17	S	R	S	S	R	R	S
KZ18	S	R	S	S	R	S	S
KZ19	R	R	R	R	S	R	R
KZ20	R	R	R	R	S	R	R
KZ21	R	R	R	R	S	R	R
KTP1	S	R	S	S	R	R	R
KTP2	S	R	S	S	R	R	R
KTP3	S	R	S	S	R	R	R
KTP4	S	R	S	S	R	R	R
KTP5	R	R	R	R	S	R	R
KTP6	S	S	S	S	R	R	R
KTP7	S	R	S	S	R	R	R
KTP8	R	R	R	R	S	R	R
KTP9	S	S	S	S	R	S	R
KTP10	S	R	S	S	R	R	R
KTP11	R	R	S	R	S	R	R
KTP12	S	R	S	S	R	R	R
KTP13	S	R	S	S	R	R	S

R: Dirençli S: Hassas



Şekil 3.6. İzolatların farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetlerinin agar üzerindeki görünümü (KTP13 ve KZ4 nolu izolatlar. Ok ile gösterilen KTP13' Penisilin G, KZ4'de ise Basitrasin antibiyotiklerine duyarlı).

3.7.3.Nükleik asit analizine dayalı testler

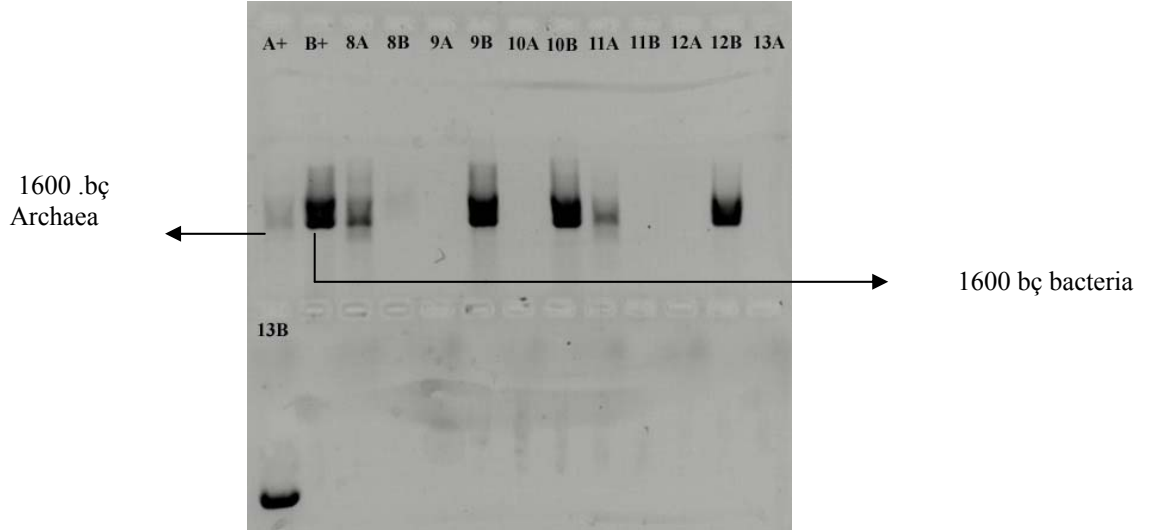
16S rRNA Geni Amplifikasyonu İçin İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada Çamaltı Tuzlası'ndan (İzmir) izole edilen mikroorganizmaların 16S rRNA geni amplifikasyonları için kullanılan distile su içinde homojenizasyon sonrası kaynatma işlemine dayanan yöntemin DNA ekstraksiyonu için yeterli olduğu görülmüştür.

16S rRNA Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (İzolatların Archaea-Bacteria Ayrımının Yapılması)

İzolatların 16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu ve bu sayede Archaea - Bacteria ayrımı için yapılan PCR'lar sonrası elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil 3.7'de 16S rRNA geni ürünleri jelde görülmektedir. Örnek teşkil etmesi amacıyla seçilen bu jel fotoğrafında da görüldüğü gibi her örnek için hem Archaea hemde Bacteria primer setleri ile PCR kurulmuş ve sadece Archaea ürünü veya sadece Bacteria ürünü elde edilerek öncelikle örneğin Archaea veya Bacteria olup olmadığı tespit edilmiştir. Şekildeki jel fotoğrafında da görüldüğü gibi aynı örneğin Archaea ve

Bacteria primer setleri ile yapılan PCR sonrası elde edilen ürünler jelde yan yana yüklenmiştir. A+ ve B+ (A=Archaea, B=Bacteria) pozitif kontroller olarak kullanılmıştır. (Bacteria için pozitif kontrol *Salinibacter ruber*, Archaea için *Haloferax mediterranei* pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.) Sekizinci ve onbirinci örnekler sadece Archaeal primerlerle ürün vermiştir ve net bir şekilde Archaeal 16S rRNA'ya sahip oldukları belirlenmiştir. Dokuzuncu, onuncu ve onüçüncü örnekler ise sadece Bacterial primerlerle ürün vererek Bacterial 16S'e sahip oldukları belirlenmiştir. Örnek olarak verilen jel fotoğrafında 16 S rRNA yaklaşık 1600 bp'lik ürün verdiği için 8A, 9B, 10B, 11A, 12A, 13B şeklinde sonuç alınmıştır. 34 izolattan 19 tanesi (KZ1, KZ2, KZ3, KZ4, KZ5, KZ6, KZ7, KZ8, KZ9, KZ10, KZ12, KZ14, KZ15, KZ19, KZ20, KZ21, KTP5, KTP8, KTP11) Archaea domainine ait 15 tanesi (KZ11, KZ13, KZ16, KZ17, KZ18, KTP1, KTP2, KTP3, KTP4, KTP6, KTP7, KTP9, KTP10, KTP12, KTP13) Bacteria domainine ait olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.7. 16S rRNA geni amplifikasyon ürünleri (A= Archaeal primerleri ile reaksiyon ve B=Bacteria primerleri ile reaksiyon)

Tablo 3.10. 16S rRNA ürünlerine göre izolatların ait oldukları domain (Archaea ya da Bacteria)

İzolat No	Archaea	Bacteria
KZ1	+	-
KZ2	+	-
KZ3	+	-
KZ4	+	-
KZ5	+	-
KZ6	+	-
KZ7	+	-
KZ8	+	-
KZ9	+	-
KZ10	+	-
KZ11	-	+
KZ12	+	-
KZ13	-	+
KZ14	+	-
KZ15	+	-
KZ16	-	+
KZ17	-	+
KZ18	-	+
KZ19	+	-
KZ20	+	-
KZ21	+	-
KTP1	-	+
KTP2	-	+

Tablo 3.10.(Devam) 16S rRNA ürünlerine göre izolatların ait oldukları domain (Archaea ya da Bacteria)

KTP3	-	+
KTP4	-	+
KTP5	+	-
KTP6	-	+
KTP7	-	+
KTP8	+	-
KTP9	-	+
KTP10	-	+
KTP11	+	-
KTP12	-	+
KTP13	-	+

3.7.4. Yağ Asidi Analizi

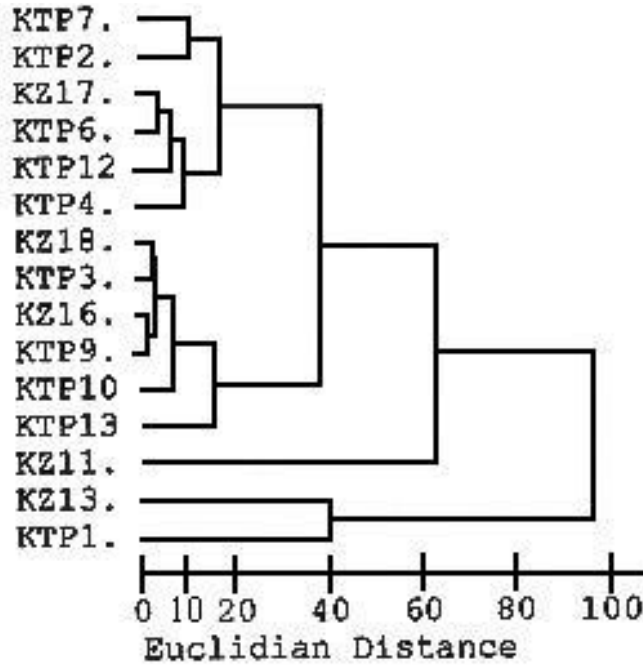
Çamaltı Tuzlası'ndan alınan su ve toprak örneklerinden izole edilen 15 adet Bacteria izolatı için yağ asidi analizi yapılmıştır.

Hücresel yağ asiti profilleri, MIS (Microbial Identification System)'in içerdiği veri tabanına göre analiz edilmiştir. Analize alınan toplam 15 izolattan (KZ11, KZ13, KZ16, KZ17, KZ18, KTP1, KTP2, KTP3,KTP4,KTP6, KTP7, KTP9, KTP10, KTP12, KTP13) 2 tanesi (KTP6, KZ17) *Bacillus halodenitrificans*, 9 tane izolat (KZ16, KZ17, KZ18, KTP3,KTP6, KTP7, KTP10, KTP12, KTP13) *Bacillus sp.*(*Bacillus laevolacticus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus halodenitrificans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus oleronius*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus coalulans*, *Bacillus circulans*) olarak tanımlanırken 5 tane izolat ise (KZ18,KZ16, KTP13, KTP10, KTP9) *Staphylococcus schleiferi* olarak tanımlanmıştır. 3 tane izolatın ise TSBA 50

kütüphanesinde karşılığı bulunamamıştır. Tablo.3.11. ve tablo.3.12.'de TSBA 50 kütüphanesi veri tabanına göre Çamaltı Bacteria izolatlarının identifikasyon sonuçları verilmiştir.

Test edilen izolatların içerdikleri yağ asitlerine göre akrabalık ilişkileri cluster analizi ile belirlenmiştir (Şekil 3.8). Bu gruplarda ortak olarak bulunan yağ asitleri 12:0, 16:0, 14:0 ISO,15:0 ANTEISO, 16.0 ISO, 17.0 ANTEISO, 17:0 ISO olmakla birlikte, 10:0, 12:0 3OH, 14:0, 17:0 CYCLO, 18:1w7c, 18:0, 19.0 CYCLO w8c yağ asitleri ise az sayıdaki izolatta saptanmıştır. En çok rastlanan yağ asidi 15.0 ANTEISO olup, ortalama değeri % 37,28 olarak saptanmıştır.

Oluşan dendograma göre (Şekil 3.8), izolatlar arasındaki Euclidian mesafesi izolatların 8 tanesinde KZ17, KTP6, KTP12, KZ18, KTP3, KZ16, KTP9 ve KTP 10 ve daha altında olduğu için bu izolatların aynı türe ait olabileceği belirlenmiştir. KZ16 (Su izolatu) ile KTP 9 (Toprak izolatu) ve KZ 17 (Su izolatu) ile KTP 6 (Toprak izolatu) su ve toprak gibi farklı ortamlardan izole edilmiş olmalarına karşın aynı türe ait olabilecekleri görülmektedir. Buna karşın, KTP 7, KTP 2, KTP 4, KTP 13, KZ11, KZ 13 ve KTP 1'in farklı cins temsilcileri oldukları varsayılmaktadır.



Şekil 3.8. Yağ asitleri profillerine göre Çamaltı Bacteria izolatları arasındaki benzerlik oranı.

Tablo 3.11. FAME analizine göre Çamaltı Tuzlası Bacteria izolatlarının identifikasyon sonuçları

İzolat	FAME İdentifikasyonu Benzerlik Katsayısı	İdentifikasyon
KTP1	-	TSBA 50 kütübanesinde karşılığı yok
KTP2	0.489	<i>Microbacterium- esteraromaticum</i>
	0.400	<i>Rothia-dentocariosa</i>
	0.387	<i>Curtobacterium</i> <i>-flaccumfaciens-flaccumfaciens</i>
	0.366	<i>Micrococcus-luteus-GC</i> <i>subgroup B (includes ARCC</i>
	0.354	<i>Kocuria-kristinae</i>
	0.349	<i>Microbacterium-</i> <i>barkeri(Aureobacterium,</i> <i>Corynebacterium)</i>
KTP3	0.536	<i>Bacillus-laevolacticus</i>
	0.492	<i>Bacillus-licheniformis</i> <i>(Bacillus subtilis group)</i>
	0.420	<i>Bacillus-subtilis</i>
	0.376	<i>Staphylococcus-schleiferi</i>
	0.376	<i>Bacillus-amyloliquefaciens</i> <i>(Bacillus subtilis group)</i>
KTP4	0.238	<i>Rothia-dentocariosa</i>
	0.147	<i>Microbacterium-flavescens</i> <i>(Aurobacterium,Arthrobacter)</i>

Tablo 3.11.(Devam) FAME analizine göre Çamaltı Tuzlası Bacteria izolatlarının identifikasyon sonuçları

KTP6	0.274	<i>Bacillus-halodenitrificans (48h)</i>
	0.169	<i>Brevibacillus-centrosporus (48h, Bacillus)</i>
KTP7	0.483	<i>Arthrobacterium-globiformis-GC subgroup A (some 48h)</i>
	0.391	<i>Micrococcus-luteus-GC subgroup B (includes ATCC 9341)</i>
	0.318	<i>Paenibacillus-polymyxa (Bacillus)</i>
KTP9	0.355	<i>Bacillus-subtilis</i>
	0.344	<i>Bacillus-licheniformis (Bacillus subtilis group)</i>
	0.284	<i>Bacillus-laevolacticus</i>
	0.276	<i>Staphylococcus-schleiferi</i>
	0.262	<i>Bacillus-pumilus-GC subgroup B</i>
	0.226	<i>Bacillus-amyloliquefaciens (Bacillus subtilis group)</i>
KTP10	0.316	<i>Bacillus-pumilus-GC subgroup B</i>
	0.267	<i>Staphylococcus-schleiferi</i>
	0.240	<i>Bacillus-subtilis</i>
KTP12	0.241	<i>Bacillus-oleronius</i>
	0.208	<i>Bacillus-halodenitrificans (48h)</i>
	0.184	<i>Bacillus-GC group 22 (No 16S match to species)</i>
	0.173	<i>Listeria-grayi (Includes L. Murrayi)</i>
	0.159	<i>Bacillus-atrophaeus</i>

Tablo 3.11.(Devam) FAME analizine göre Çamaltı Tuzlası Bacteria izolatlarının identifikasyon sonuçlar

KTP13	0.227	<i>Bacillus-coalulans</i>
	0.207	<i>Virgibacillus-pantothenticus (Bacillus)</i>
	0.195	<i>Bacillus-laevolacticus</i>
	0.159	<i>Staphylococcus-schleiferi</i>
	0.144	<i>Bacillus-circulans</i>
KZ11	-	TSBA 50 kütübanesinde karşılığı yok
KZ13	-	TSBA 50 kütübanesinde karşılığı yok
KZ16	0.393	<i>Bacillus-subtilis</i>
	0.376	<i>Bacillus- licheniformis</i> (<i>Bacillus subtilis group</i>)
	0.322	<i>Bacillus-amyloliquefaciens</i> (<i>Bacillus subtilis group</i>)
	0.320	<i>Bacillus-laevolacticus</i>
	0.273	<i>Staphylococcus-schleiferi</i>
KZ17	0.478	<i>Bacillus-halodenitrificans (48h)</i>
KZ18	0.592	<i>Bacillus- licheniformis</i> (<i>Bacillus subtilis group</i>)
	0.445	<i>Bacillus-laevolacticus</i>
	0.437	<i>Bacillus-subtilis</i>
	0.402	<i>Bacillus-amyloliquefaciens</i> (<i>Bacillus subtilis group</i>)
	0.362	<i>Staphylococcus-schleiferi</i>

Tablo 3.12. Çamaltı Tuzlası Bacteria izolatlarının %1 ve daha fazla oranda içerdikleri yağ asitlerinin ortalaması ve standart sapması

Yağ Asidi	Ortalama	Standart Sapma
12:0	6,26	0,8
16:0	13,05	2,8
14:0 ISO	10,23	1,2
15:0 ISO	22,69	3,7
15:0 ANTEISO	37,28	2,83
16:0 ISO	10,34	1,05
17:0 ANTEISO	12,08	3,28
17:0 ISO	8,20	0,79
10:0	3,51	3,51
12:0 3OH	12,8	12,8
14:0	1,62	1,62
17:0 CYCLO	4,39	4,39
18:1 w7c	3,3	3,3
18:0	2,51	2,51
19:0 CYCLO w8c	24,34	24,34

3.7.5. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH)

Çamaltı Tuzlasından alınmış su ve toprak örnekleriyle yapılan DAPI boyama ile toplam hücre sayımları tespit edilmiştir. Tablo 3.13’de ve tablo 3.14’de örneklerdeki toplam hücre sayıları (hücre/ml) verilmiştir.

DAPI boyama sonuçlarına göre su örneklerinde 1.Kısım Tuzla H1.1 nolu havuzda $1,39 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml, H1.2 nolu havuzda $1,21 \times 10^7 \pm 0,18$ hücre/ml, H1.3 nolu

havuzda $1,48 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml, H1.4 nolu havuzda $1,19 \times 10^7 \pm 0,18$ hücre/ml, H1.5 nolu havuzda $2,7 \times 10^7 \pm 0,25$ hücre/ml, 2.Kısım Tuzla H2.6 nolu havuzda $2,48 \times 10^7 \pm 0,18$ hücre/ml, H2.7 nolu havuzda $1,52 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml, H2.8 nolu havuzda $2,38 \times 10^7 \pm 0,25$ hücre/ml, H2.9 nolu havuzda $1,21 \times 10^7 \pm 0,19$ hücre/ml, H2 .10 nolu havuzda $1,16 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml, 2. Kısım Çöktürme Havuzlarında Ç.1 nolu havuzda $2,48 \times 10^7 \pm 0,18$ hücre/ml, Ç.2 nolu havuzda $1,38 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml, Ç.3 nolu havuzda $1,56 \times 10^7 \pm 0,25$ hücre/ml, Ç.4 nolu havuzda $1,19 \times 10^7 \pm 0,09$ hücre/ml, Yol Kenarı $0,2 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml olarak bulunmuştur. Toprak örneklerinde ise; Çamaltı Toprak1 $1,2 \times 10^8 \pm 0,08$ hücre/ml, Çamaltı Toprak2 $0,2 \times 10^8 \pm 0,08$ hücre/ml, Çamaltı Toprak3 $1,21 \times 10^8 \pm 0,25$ hücre/ml, Yol Kenarı $2,22 \times 10^8 \pm 0,18$ hücre/ml, Havuz Tabanı $0,3 \times 10^8 \pm 0,25$ hücre/ml olarak bulunmuştur.

Archaea spesifik prob ile elde edilen FISH sonuçlarına göre 1.Kısım Tuzla H1.1 nolu havuzda %53.8, H1.2 nolu havuzda %56.5, H1.3 nolu havuzda %59.3, H1.4 nolu havuzda %52.6, H1.5 nolu havuzda %50.2, 2.Kısım Tuzla H2.6 nolu havuzda %60.5, H2.7 nolu havuzda %52.9, H2.8 nolu havuzda %52.6, H2.9 nolu havuzda %57.9, H2 .10 nolu havuzda %42.6, 2. Kısım Çöktürme Havuzlarında Ç.1 nolu havuzda %53.9, Ç.2 nolu havuzda %56.7, Ç.3 nolu havuzda %58.9, Ç.4 nolu havuzda %58.4, Yol Kenarı %62.3 olarak bulunmuştur. Toprak örneklerinde ise; Çamaltı Toprak 1 %49.3, Çamaltı Toprak 2 %53.9, Çamaltı Toprak 3 %53.4, Yol Kenarı %48.6, Havuz Tabanı %48.7'sini Archaeal hücreler oluşturmaktadır. Bacteria spesifik prob ile elde edilen FISH sonuçlarına göre 1.Kısım Tuzla H1.1 nolu havuzda %32.2, H1.2 nolu havuzda %22.6, H1.3 nolu havuzda %22, H1.4 nolu havuzda 30.2, H1.5 nolu havuzda %28.3, 2.Kısım Tuzla H2.6 nolu havuzda %21.9, H2.7 nolu havuzda %31.9, H2.8 nolu havuzda %28.2, H2.9 nolu havuzda %57.9, H2 .10 nolu havuzda %41.8, 2. Kısım Çöktürme Havuzlarında Ç.1 nolu havuzda %32.8, Ç.2 nolu havuzda %21, Ç.3 nolu havuzda %21.7, Ç.4 nolu havuzda %22,65, olarak bulunmuştur. Toprak örneklerinde ise; Çamaltı Toprak1 %23.5, Çamaltı Toprak 2 %21.6, Çamaltı Toprak 3 28.1, Yol Kenarı %32.4, Havuz Tabanı %31.2'sini Bacteria üyeleri oluşturmaktadır. Bu da gösteriyor ki Archaeal populasyonlar genel olarak Çamaltı Tuzlası'nın domine eden organizmalardır.

Çalışmamızda EHB problemlerini kullanarak Çamaltı Tuzlası örneklerinde *Salinibacter* varlığı da araştırılmıştır. Buradan elde edilen deney sonuçlarına göre su ve

toprak örneklerinde spesifik hibridizasyon sinyali elde edilmiştir. FISH sonuçlarına göre 1.Kısım Tuzla, H1.2 nolu havuzda %3.9, H1.3 nolu havuzda %2.1, H1.4 nolu havuzda 1.3, H1.5 nolu havuzda %1.2, 2.Kısım Tuzla, H2.7 nolu havuzda %3.6, H2.8 nolu havuzda %0.6, H2.9 nolu havuzda %1.3, 2. Kısım Çöktürme Havuzlarında Ç.1 nolu havuzda %3.5, Ç.2 nolu havuzda 2.8, Ç.3 nolu havuzda %3.9, Ç.4 nolu havuzda %2.9, olarak bulunmuştur. Toprak örneklerinde ise; Çamaltı Toprak1 %4.1, Çamaltı Toprak 3 %3.6, Yol Kenarı %2.7, Havuz Tabanı %3.7'sini *Salinibacter* üyeleri oluşturmaktadır.

Tablo 3.13. DAPI yöntemi ile Çamaltı Tuzlası su örneklerindeki toplam hücre sayıları

	Havuz No	Havuz Tipi	Tuzluluk (%)	Toplam DAPI sayımı/ml \pm SS ^a
1.Kısım Tuzla				
H1 . 1	9	Kristalize	%29	1,39x10 ⁷ \pm 0,08
H1 . 2	10	Kristalize	%29	1,21x10 ⁷ \pm 0,18
H1 . 3	14-15	Rezerv	%27,50	1,48x10 ⁷ \pm 0,08
H1 . 4	12	Sıcak	%15	1,19x10 ⁷ \pm 0,18
H1 . 5	S4	Soğuk	%19	2,7x10 ⁷ \pm 0,25
2.Kısım Tuzla				
H2 . 6	8	Kristalize	%29,20	2,48x10 ⁷ \pm 0,18
H2 . 7	27	Kristalize	%30	1,52x10 ⁷ \pm 0,08
H2 . 8	Sergen	Rezerv	%16,20	2,38x10 ⁷ \pm 0,25
H2 . 9	23	Sıcak su	%19	1,21x10 ⁷ \pm 0,19

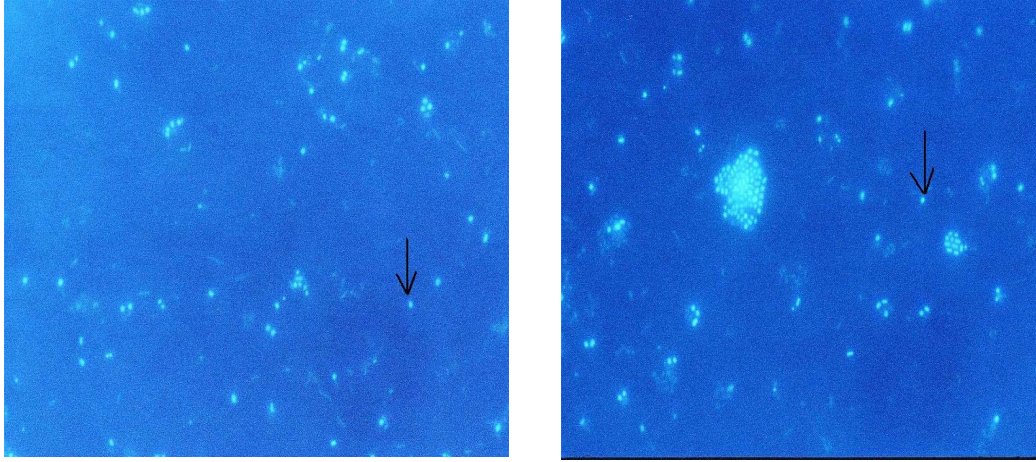
Tablo 3.13.(Devam) DAPI yöntemi ile Çamaltı Tuzlası su örneklerindeki toplam hücre sayıları

H2 . 10	Yeni Saha 8	Soğuk su	%6	$1,16 \times 10^7 \pm 0,08$
2.Kısım Çöktürme Havuzları				
Ç . 1	1	Çöktürme havuzu	529	$2,48 \times 10^7 \pm 0,18$
Ç . 2	2	Çöktürme havuzu	%28,20	$1,38 \times 10^7 \pm 0,08$
Ç . 3	3	Çöktürme havuzu	%29,50	$1,56 \times 10^7 \pm 0,25$
Ç . 4	4	Çöktürme havuzu	%30	$1,19 \times 10^7 \pm 0,09$
Yol Kenarı			%15	$0,2 \times 10^7 \pm 0,08$

SS^a: Standart sapma**Tablo 3.14.** DAPI yöntemi ile Çamaltı Tuzlası toprak örneklerindeki toplam hücre sayıları

Toprak örnekleri	Tuzluluk EC10 ³ 25 ⁰ C mS/cm	Toplam DAPI sayımı/ml+ SS ^a
Çamaltı Toprak 1	74,19	$1,2 \times 10^8 \pm 0,08$
Çamaltı Toprak 2	109,57	$0,2 \times 10^8 \pm 0,08$
Çamaltı Toprak 3	20,54	$1,21 \times 10^8 \pm 0,25$
Yol Kenarı	34,24	$2,22 \times 10^8 \pm 0,18$
Havuz Tabanı	79,89	$0,3 \times 10^8 \pm 0,25$

SS^a: Standart sapma



H1.4 Nolu Havuz

H2.7 Nolu Havuz

Şekil 3.9. Su Örneklerinde DAPI Boyama (Toplam mikroorganizma sayımı)

Çamaltı Tuzlası'ndan alınan su ve toprak örnekleri ile yapılan DAPI boyama ile toplam hücre sayımları, Eub 338 probu ile hibridizasyon sonrası Bacteria, Arc 915 probu ile hibridizasyon sonrası Archaea ve EHB 412 probu ile hibridizasyon sonrası *Salinibacter* sayıları tespit edilmiştir. Tablo.3.15'de örneklerdeki toplam hücre, Bacteria, Archaea ve *Salinibacter* sayıları (hücre/ml) verilmiştir.

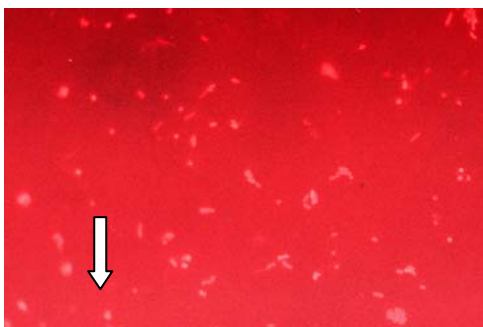
Tablo.3.15. FISH yöntemi ile Çamaltı Tuzlası örneklerindeki Bacteria, Archaea, *Salinibacter* ve toplam hücre sayıları.

Örnek	Tuzluluk (%)	Toplam DAPI sayımı/ml±SS ^a	Eub 338 (%)	Arc 915 (%)	EHB 412 (%)	Tespit Edilenlerin sayım
H1 . 1	%29	1,39x10 ⁷ ±0,08	%32,2	53,8%	-	86%
H1 . 2	%29	1,21x10 ⁷ ±0,18	%22,6	56,5%	3,9%	79,1%
H1 . 3	%27,50	1,48x10 ⁷ ±0,08	%22	59,3%	2,1%	81,3%
H1 . 4	%15	1,19x10 ⁷ ±0,18	%30,2	52,6%	1,3%	82,8%
H1 . 5	%19	2,7x10 ⁷ ±0,25	%28,3	50,2%	1,2%	78,5%
H2 . 6	29,20%	2,48x10 ⁷ ±0,18	21,9%	60,5%	-	82,4%
H2 . 7	30%	1,52x10 ⁷ ±0,08	31,9%	52,9%	3,6%	84,8%
H2 . 8	16,20%	2,38x10 ⁷ ±0,25	28,2%	52,6%	0,6%	80,8%
H2 . 9	19%	1,21x10 ⁷ ±0,19	18%	57,9%	1,3%	75,9%
H2 . 10	6%	1,16x10 ⁷ ±0,08	41,8%	42,6%	-	84,4%
Ç . 1	29%	2,48x10 ⁷ ±0,18	32,8%	53,9%	3,5%	86,7%
Ç . 2	28,20%	1,38x10 ⁷ ±0,08	21%	56,7%	2,8%	77,7%
Ç . 3	29,50%	1,56x10 ⁷ ±0,25	21,7%	58,9%	3,9%	80,6%
Ç . 4	30%	1,19x10 ⁷ ±0,09	22,65	58,4%	2,9%	81,05%
Yol kenarı	15%	0,2x10 ⁶ ±0,08	-	62,3%	-	62,3%

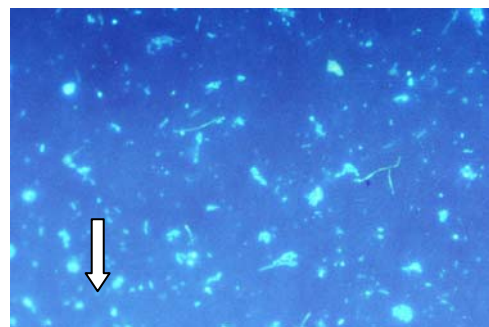
Tablo.3.15. FISH yöntemi ile Çamaltı Tuzlası örneklerindeki Bacteria, Archaea, *Salinibacter* ve toplam hücre sayıları.

Çamaltı		$1,2 \times 10^8 \pm 0,08$	23,5%	49,3%	4,1%	72,8%
Toprak 1	74,19					
Çamaltı		$0,2 \times 10^8 \pm 0,08$	21,6%	%53,9	-	75,5%
Toprak 2	109,57					
Çamaltı		$1,21 \times 10^8 \pm 0,25$	28,1%	53,4%	3,6%	81,5%
Toprak 3	20,54					
Yol		$2,22 \times 10^8 \pm 0,18$	32,4%	48,6%	2,7%	81%
Kenarı	34,24					
Havuz		$0,3 \times 10^8 \pm 0,25$	31,2%	48,7%	3,7%	79,9%
Tabanı	79,89					

SS^a: Standart Sapma

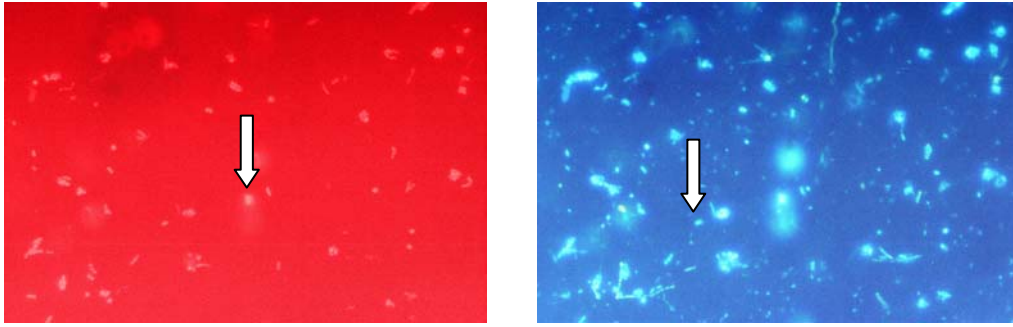


Arc915 (H1.4 nolu havuz)



DAPI (H1.4 nolu havuz)

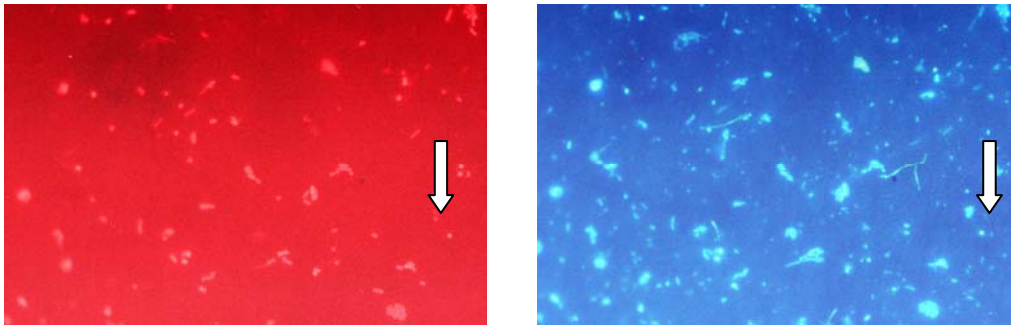
Şekil 3.10. Su örneklerinde Arc915 probu ile hibridizasyon sonrası ışığa veren Archaea hücreleri (ok ile işaretlenmiş olan Archaea ve sağda da aynı görüntü alanının DAPI boyaması H1.4 nolu havuz örneğinde).



Eub 338 (H2.7nolu havuz)

DAPI (H2.7nolu havuz)

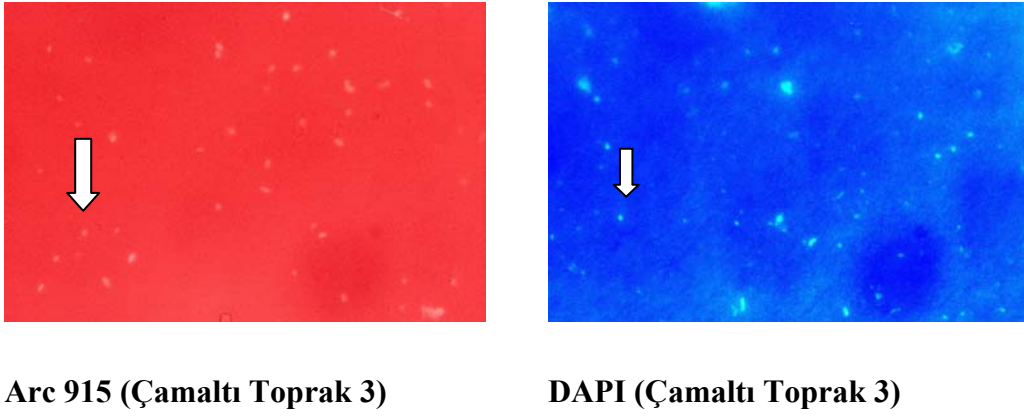
Şekil 3.11. Su Örneklerinde Eub 338 probu ile hibridizasyon sonrası ışığa veren Bacteria hücreleri (Ok ile gösterilmiş olan Bacteria) ve sağda aynı görüntünün DAPI boyaması.



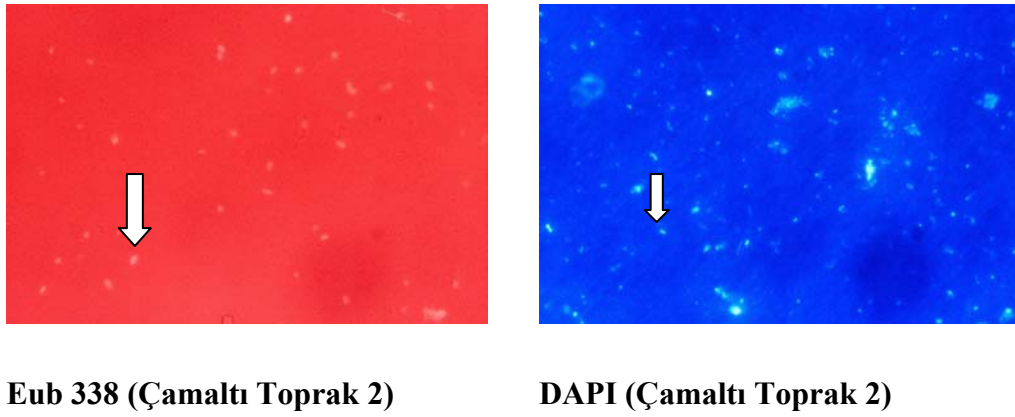
EHB 412 (H1.4 nolu havuz)

DAPI (H1.4 nolu havuz)

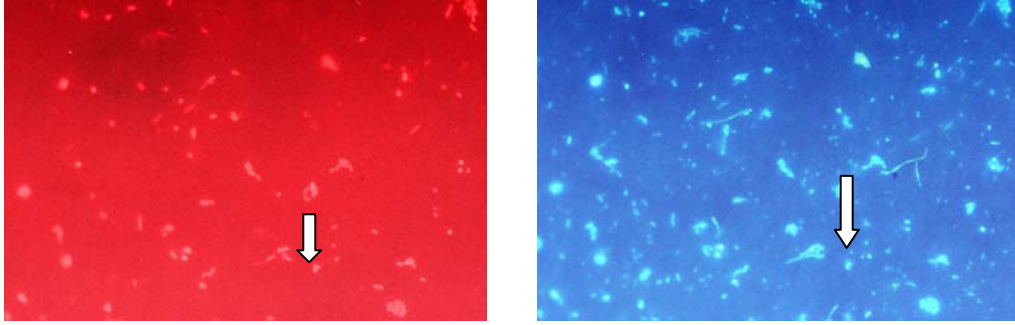
Şekil 3.12. Su Örneklerinde EHB 412 probu ile hibridizasyon sonrası ışığa veren *Salinibacter* hücreleri (Çubuk şekilli *Salinibacter*) ve aynı görüntü alanının DAPI boyaması (H1.4 nolu havuz)



Şekil 3.13.Toprak örneklerinde Arc 915 probu ile hibridizasyon sonrası ışına veren Archaea hücreleri ve sağda aynı görüntü alanının DAPI boyaması (Çamaltı Toprak 3)



Şekil 3.14.Toprak örneklerinde Eub 338 probu ile hibridizasyon sonrası ışına veren Bacteria hücreleri ve sağda aynı görüntü alanının DAPI boyaması (Çamaltı Toprak 2)



EHB 412 (Yol kenarı)

DAPI(Yolkenarı)

Şekil 3.15. Toprak örneklerinde EHB 412 probu ile hibridizasyon sonrası ışığa veren *Salinibacter* hücreleri (Çubuk şekilli *Salinibacter*) ve aynı görüntü alanının DAPI boyaması (Yol kenarı).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Aşırı derecede halofilik bakteriler, ekstrem koşullara uyum sağlamış özel yapıları nedeniyle biyoteknoloji alanında uğraşan bir çok araştırmacının ilgisini çeken organizmalardır. Aşırı derecedeki tuzluluğa dayanıklı enzimleri, tuzluluğa karşı geliştirdikleri stratejiler, olumsuz şartlarda enerji üretimine imkan sağlayan özel proteinlerinin varlığı ve bunlar gibi kendilerine has olan özellikleri, onların biyoteknoloji alanında son derece önemli özellikler olarak görülmesine yol açmaktadır. Bu nedenle aşırı derecede halofilik bakterilerin tanımlanması ve hücre yapılarının belirlenmesi gerekmektedir. Hipersalin (aşırı derecede tuzlu) çevreler sınıfına giren ve ülkemizin tuz ihtiyacını karşılamada büyük payı olan İzmir Çamaltı Tuzlası'nın sahip olduğu halofilik mikroorganizmaların tanımlanarak ortaya konması hem biyoteknolojik potansiyelleri nedeniyle, hem de ülkemiz halofilik prokaryot florasının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Çamaltı Tuzlası'nda bulunan prokaryotların tanımlanması üzerine daha önceden yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma bu alandaki boşluğu kapatmak, Çamaltı tuzlası halofil prokaryot (Bacteria/Archaea) yoğunluğunu belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Dünyada çok benzeri olup, hipersalin (aşırı derecede tuzlu) çevreler sınıfına giren ve ülkemizin ikinci büyük gölü olan Tuz Gölü'nde bulunan mikroorganizmalar ve bunların farklı yöntemler ile karakterizasyonları üzerine daha önceden yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Yalçın 2000; Kallı 2000; Birbir ve Sesal 2003; Özcan 2004, Mutlu 2006). Ayrıca ülkemiz tuzlarından olan Ayvalık Tuzlası'ndaki ekstrem halofilik Archaea izolatlarının karakterizasyonu hakkında da çalışmalar bulunmaktadır (Oren 2002 b).

Yalçın (2000) çalışmasında Tuz Gölü'nden izole ettiği 12 adet aerobik halotolerant ve halofilik izolat ile çalışmış ve izolatlardan bazılarını *Bacillus circulans* ve *Bacillus licheniformis* olarak tanımlamıştır.

Kallı (2000) yaptığı çalışmada Tuz Gölü'nden izole ettiği 18 adet aşırı halofilik bakterinin çeşitli biyokimyasal ve antibiyotiklere duyarlılık testlerini gerçekleştirmiş ve sonuç olarak bu izolatların *Halobacterium* cinsine ait Archaea olabileceğini bildirmiştir.

Birbir ve Sesal (2003) yaptıkları çalışmada Tuz Gölü'nden izole ettikleri 82 izolattan 32 adetini incelemeye almışlar ve bunların optimum gelişim gösterdikleri tuz, pH ve sıcaklık derecelerini rapor etmişlerdir. Ayrıca bu izolatların çeşitli biyokimyasal testlerini yapmışlar ve sonuç olarak Tuz Gölü'nün aşırı derecede halofilik bakteriler için uygun bir ortam olduğunu bildirmişlerdir.

Oren (2002 b) yaptıkları çalışmada Türkiye'nin Kuzeydoğusunda bulunan Ayvalık Tuzlası'ndan 7 ekstrem strain izole etmişlerdir. İzole edilen strainler antibiyotik duyarlılığı, hücre ve koloni morfolojisi, kazain hidrolizi, nişasta, jelatin, tween 20 ve tween 80, oksidaz ve katalaz aktivitesi yönünden test edilmiştir. Tüm strainlerin Archaea domainine ait olduğu bulunmuştur. İnce tabaka kromatografisi ile polar lipidlerin karakterizasyonunda tüm izolatlar fosfotidilgliserol (PG)'ün fitanildieter türevlerini fosfotidilgliserofosfat 8PGP-Me)'in metil ester ve fosfotidilgliserosülfat (PGS) içermektedir. 4 izolat glikolipid olarak triglisosil dieter, diğer üçü sülfürlenmiş diglikosil dieter'sahip oldukları bildirilmiştir. Tüm izolatlar plazmitlerin varlığını araştırmak için agaroz jel elektroforezle incelenmiştir. 4 izolatın da büyüklüğü 13,8 kbp'dan 15,3 kbp arasında değişen plazmite sahip oldukları bildirilmiştir. İzolatların fenotipik özellikleriyle SDS-PAGE protein profilleri arasındaki korelasyonun düşük olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda Gram boyama'da su örneklerinden elde edilen izolatların hepsi pembe renkli gram negatif (Gr -), toprak izolatlarından 4 tanesi (KTP1, KTP2, KTP6, KTP8) pembe renkli gram negatif (Gr -), 9 tanesi mor renkli gram pozitif (Gr +) boyanmış ve morfolojileri kok, kısa çubuklar, düzensiz üçgenler disk şeklinde hücreler gözlenmiştir. Yapılan katalaz testinde izolatların hepsinde pozitif sonuç vermiştir. İzolatlardan (KZ10, KZ11,KZ18,KTP9, KTP13) hariç diğerleri nişasta hidrolizinde pozitif sonuç vermiştir. İzolatların farklı karbon ve şeker kaynaklarını kullanabilme yetenekleri ile ilgili test sonuçlarına göre, tüm izolatlar Fruktoz, Maltoz, Sukroz, Galaktoz, Glukoz, Arabinoz, Trehaloz, Raffinoz, Laktoz, Mannitolü kullanabilme yeteneğindedirler.Daha önceki çalışmalarımızda ayırdıcı bir sonuç alınamaması nedeniyle (Mutlu 2006), bu çalışmada izolatların lipid karakterizasyonu yapılmamıştır.

Antibiyotiklere duyarlılık testleri de halofilik bakterilerin domain ayırımında kullanılmış olan yöntemlerdendir (Oren 2002). Aşırı derecede halofilik Archaea üyelerinin hepsi Penisilin G'ye direnç göstermektedir. Bu durum Archaea/Bacteria ayırımında kullanılabilecek basit ve ucuz bir yöntem olarak görülmektedir. Birbir (2003) ve Mutlu (2006) çalışmalarında Tuz Gölü izolatlarının Archaea olanlarının hepsinin Penisilin G 'ye dirençli olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da PCR ile 19 adet Archaea ve 15 adet Bacteria olarak ayırımı yaptığımız izolatlardan Archaea olarak bulunan izolatların aynı zamanda penisiline dirençli olduğu görülmüştür. 34 izolattan 19 tanesi (KZ1, KZ2, KZ3, KZ4, KZ5, KZ6, KZ7, KZ8, KZ9, KZ10, KZ12, KZ14, KZ15, KZ19, KZ20, KZ21, KTP5, KTP8, KTP11) Penisilin G'ye dirençli oldukları görülmüştür. Penisilin G'ye direnç Archaea'ya ait bir özelliktir. Yine 34 izolattan 15 tanesi (KZ11, KZ13, KZ16, KZ17, KZ18, KTP1, KTP2, KTP3, KTP4, KTP6, KTP7, KTP9, KTP10, KTP12, KTP13) Basitrasin'e duyarlı oldukları belirlenmiştir ki bu da Archaea'ların genel karakteristik özelliklerindedir. Bu sonuçlar da antibiyotiklere duyarlılık ve PCR testinin doğrulayıcı özellikte olduğunu göstermektedir.

16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılarak diziliminin ortaya çıkarılması da taksonomik çalışmalarda geçerliliği çok yüksek olan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. PCR ile 16S rRNA 'ya spesifik primerlerle çevresel örneklerdeki mikrobiyal populasyonların analizi mümkün olmaktadır. Üstelik bu yöntemde kültive edilemeyen türlerin belirlenmesi de mümkün olmaktadır. Bu nedenden dolayı oldukça etkili bir yöntemdir ve son zamanlarda daha sık kullanıldığı görülmektedir(Anton, Oren 2002). Çalışmamızda da izolatlarımızdan elde ettiğimiz DNA'lar 16S rRNA için spesifik olan primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edilerek izolatları Archaea/Bacteria ayırımı yapılmıştır. Çamaltı Tuzlası su örneklerinden 16 adet (KZ1, KZ2, KZ3, KZ4, KZ5, KZ6, KZ7, KZ8, KZ9, KZ10, KZ12, KZ14, KZ15, KZ19, KZ20, KZ21) Archaea 5 adet(KZ11, KZ13, KZ16, KZ17, KZ18) Bacteria, toprak örneklerinden ise 3 adet Archaea (KTP5, KTP8, KTP11) ve 11 adet Bacteria ,(KTP1, KTP2, KTP3, KTP4, KTP5, KTP6, KTP7, KTP9, KTP10, KTP12, KTP13).

Bakteriyal lipid kompozisyonu ve taksonomik sınıflandırma arasındaki ilişki bakteriyal identifikasyon amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Yağ asidi profillerine dayanan bakterial sınıflandırmalar nükleik asit homolojisine dayalı sınıflandırmalarla iyi karşılaştırılmış durumdadır. Lipid analizleri metodolojisindeki gelişmeler bir çok bakteri için bu ilişkiyi sağlamıştır. Lipid ekstraksiyonlarının gaz kromatografisi, hücresel yağ asitlerinin belirlenmesi için yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu metod bakteriyal lipidlerin hidrolizasyonu ve ekstraksiyonuna dayanır. Karboksilik grupların metilasyonu yağ asitlerinin metil esterlerini (FAME) üretir ve bunlar gaz kromatografisi (GC) ile analiz edilir. Tüm örnek hazırlama süresi 60-70 dakikadır ve FAME ekstraksiyonlarının kromatografik analizi bir örnek için yaklaşık 20 dakika sürmektedir (Basile ve ark. 1995). FAME analizleri halofilik bakteriler için de uygulanmıştır. Vreelad ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, çok eski tuz kristalinden izole edilen bir “Permian” bakteri ile bu izolatların modern akrabaları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yağ asit profillerine göre bu organizmaları karşılaştırdıklarında bu yaklaşımın tür düzeyinde ayırım yapmadığı ancak test edilen Bacteria üyeri arasındaki farklılıkları ortaya koyabildiği sonucuna varmışlardır. Bizim çalışmamızda da hücresel yağ asiti profilleri, MIS (Microbial Identification System)’in içerdiği veri tabanına göre analiz edilmiştir. Analize alınan toplam 15 izolatın 2 tanesi (KTP6, KZ17) *Bacillus halodenitrificans*, 9 tanesi (KZ16, KZ17, KZ18, KTP3, KTP6, KTP7, KTP10, KTP12, KTP13) *Bacillus sp.* (*Bacillus laevolacticus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus halodenitrificans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus oleronius*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus coalulans*, *Bacillus circulans*) olarak tanımlanırken 5 tanesi de (KZ18, KZ16, KTP13, KTP10, KTP9) *Staphylococcus schleiferi* olarak tanımlanmıştır. 3 tane izolatın ise TSBA 50 kütüphanesinde karşılığı bulunamamıştır. İdentifikasyon sonuçları TSBA 50 kütüphanesi ile veri tabanındaki muhtemel karşılaştırmaları yapmaktadır. Bu sonuçlar kesin olmayıp sadece en yakın olasılığı bildirmektedir. Kesin identifikasyon mutlaka DNA dizi analizi sonuçlarına göre yapılmalıdır.

Test edilen izolatların içerdikleri yağ asitlerine göre akrabalık ilişkileri cluster analizi ile belirlenmiştir. Bu gruplarda ortak olarak bulunan yağ asitleri

12:0, 16:0, 14:0 ISO, 15:0 ANTEISO, 16.0 ISO, 17.0 ANTEISO, 17:0 ISO olmakla birlikte, 10:0, 12:0 3OH, 14:0, 17:0 CYCLO, 18:1w7c, 18:0, 19.0 CYCLO w8c yağ asitleri ise az sayıdaki izolatta saptanmıştır. Vreeland ve ark.(2006), Permian devri izolatların günümüz modern halofilik Bacteria üyelerine oranla daha az 14:0; and 15:0 iso yağ asitlerini buna karşı daha fazla 16:1 x7c alcohol ve 16:1 x11c yağ asitlerini içerdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada en çok rastlanan yağ asidi 15.0 ANTEISO (ortalama 37,28)'dur. Bu bulgu Vreeland ve ark.'nın bulgusuna yakınlık göstermektedir.

Oluşan dendograma göre gruplar içerisindeki izolatlar arasındaki mesafe izolatların tamamına yakın kısmında 10 ve daha altında olduğu için bu izolatların aynı türe ait olabileceği belirlenmiştir. KZ16 (Su izolatu) ile KTP 9 (Toprak izolatu) ve KZ 17 (Su izolatu) ile KTP 6 (Toprak izolatu) arasındaki mesafeye bakıldığında aynı türe ait olabileceği görülmüştür.

Çok havuzlu solar tuzlalar deniz suyu tuzluluğundan “halit” doygunluğuna kadar tuzluluğun farklı görüntülerini sunarlar. Her bir havuzdaki tuz konsantrasyonu göreceli olarak sabit tutulur ve mikrobiyal kominite yoğunlukları genellikle yüksektir. Tüm dünyadaki tuzlalar yapay ve birbirine benzer olmalarına rağmen, besin durumları, suyun çekilme zamanları ve iklim koşullarına bağlı olarak farklılık gösterirler. NaCl'nin doyduğu ve halitin biriktiği kristalize havuzlardan halofilik Archaea'nın bir çok türü izole edilmiştir. İzolatlar *Haloferax mediterranei*, *Haloferax gibbonsi*, *Haloferax denitrificans*, *Halogeometricum borinquense*, *Halococcus saccharolyticus*, *Haloterrigena thermotolerans*, *Halorubrum saccharovororum*, *Halorubrum coriense*, *Haloarcula hispanica* ve *Haloarcula japonica*'nın tip strainlerini içerirler. İsrail Eilat ve Amerika Birleşik Devletleri Newark'taki kristalize havuzlardan alınan tuzlu su örneklerinden, L-Arjinin varlığında anaerobik zenginleştirme ortamlarında *Halobacterium salinarium* geliştirilebilmiştir. İspanya Alicante yakınlarındaki tuzla havuzlarında *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Haloferax* ve *Halobacterium* yüksek sıklıkta elde edilmiştir. Elde edilen koloni sayısı toplam prokaryotik varlığın yalnızca küçük bir kısmıdır (Oren 2002c).

NaCl'nin doyma noktasında olduğu çevreler sıklıkla yoğun mikrobiyal kominiteleri içerir. Predasyon olmayışı ve genellikle yüksek besin düzeyleri

sonucunda hücre yoğunluklarının mililitrede 10^7 - 10^8 hücre ve daha fazla olması olağan bir durumdur(Oren 2002). Bizim çalışmamızda da su örneklerinde yapılan DAPI boyamaları ile mililitrede 10^7 hücre yoğunluğu tespit edilmiştir. Çamaltı Tuzlası toprak örneklerinde ise mililitrede 10^8 hücre yoğunluğu tespit edilmiştir.

Su örneklerinden elde edilen kültür edilebilen koloni sayıları 10^3 - 10^5 hücre/ml, toprak örneklerinden elde edilen kültür edilebilen koloni sayıları ise 10^3 - 10^6 olarak saptanmıştır. Oysa DAPI boyamaları ile su örneklerinde mililitrede 10^7 , toprak örneklerinde 10^8 'lık hücre varlığını ortaya koymuştur. Aradaki fark elimizdeki besi yerleri ile kültür edemediğimiz mikroorganizmalardan kaynaklanmaktadır. Kültür edilemeyen mikroorganizmaların gelişimine uygun besi yerlerinin tasarlanması ilerisi için ayrı bir çalışma konusunu oluşturmaktadır.

Insitu prokaryotik çeşitliliğin moleküler metodlar kullanılarak çalışılması geçtiğimiz son 10-15 yılda giderek popüler hale gelmiştir ve temel olarak 16S rRNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak amplifikasyonu ve dizi analizine dayanmaktadır. Mikrobiyal çeşitliliğin çalışılmasında belirli bir takım moleküler metodlar kullanmak uygundur ve uygulanacak metodun seçimi amaca ve analiz edilecek örnek miktarına bağlı olarak değişebilmektedir. Mikrobiyal çeşitlilik üç farklı düzeyde biyolojik çeşitliliğe gönderme yapmaktadır: tür içi (genetik) çeşitlilik, tür sayısı (türler) çeşitliliği ve kommünite (ekolojik) çeşitliliği (Ovreas ve ark. 2003).

Tür çeşitliliği iki bileşenden oluşur, birincisi bulunan tür sayısıdır ve tür zenginliği olarak gösterilebilir. İkinci bileşen ise bu tür içindeki bireylerin dağılımıdır ve “eşitlik” ya da “dengeli olabilirlik” olarak tanımlanır. Bu nedenle, çeşitlilik çok yaygın olarak hem bilgi içeriğini hem de bu bilgilerin toplam örnekler içerisindeki dağılımını tanımlar. Bakterial sistemlerde eşitlik genellikle bilinmeyendir. Çünkü bireysel hücreler çok nadir olarak tür düzeyinde identifiye edilirler. Kommünite DNA'sının geniş çaplı analizi, bakteriyal kommünitelerin toplam genetik çeşitliliği hakkında bilgi sağlamaktadır (Ovreas ve ark. 2003).

Mikrobiyoloji moleküler çağa girmiş durumdadır. Hemen hemen her ay yeni bir bakteriyal genom yayınlanmaktadır ve artık yeni izole edilen bir mikroorganizmanın sınıflandırılmasına en azından bir nükleik asit dizisinin belirlenmesi ve bunun karşılaştırılması ile başlanmaktadır. Açıkça bu amaçla en

çok kullanılan molekül Bacteria ve Archaea'daki 16S rRNA olan, ribozomun küçük alt ünitesidir. Nükleik asit dizi bilgilerini elde etmede temelde 2 teknik kullanılır. Birincisi, dizinin çıkarılmasını takiben karşılaştırmalı dizi analizi ve ikinci olarak da nükleik asit problemleri ile hibridizasyondur.

Birinci durumda, tek iplikli nükleik asit parçaları olarak tanımlanabilecek nükleik asit problemleri, kendi komplementlerine spesifik olarak bağlanma yeteneği gösterirler. Bu süreç ile hibridizasyon adı verilen probun ilgili hedef moleküle bağlandığı durum gerçekleşir. Çoğu durumda bu olay hedef moleküle bağlanmanın gözlenmesi için tespit edilir bir "etiket" in kullanılmasını da içerir.

Orijinal olarak DeLong ve ark. (1989) tarafından tanımlanmış olan, fikse edilmiş toplam bakteriyal hücrelerin floresan işaretli rRNA hedefli oligonükleotidler kullanılarak insitu identifikasyonu, son zamanlarda bakteriyolojide bir çok uygulamaya sahiptir. Ribozomal RNA in situ hibridizasyon için tek hedef değildir fakat, açık bazı nedenlerden dolayı en yaygın olanıdır. Stabilitesi ve yüksek sayıdaki kopyaları rRNA'yı mRNA 'dan daha kolay bir hedef yapmaktadır (Amann ve Schleifer 2001).

Floresan insitu hibridizasyondaki (FISH) temel adımlar; mikroorganizmaların fiksasyonu, spesifik problemlerle hibridizasyon, bağlanmamış problemlerin yıkama ile uzaklaştırılması ve hibridizasyon deteksiyonu şeklinde özetlenebilir. İn situ hibridizasyonda bu temel adımların herbirinin, ekstrakte edilmiş hedef nükleik asitlerin spesifik ve hassas deteksiyonu için, gözden geçirilmesi gerekmektedir. Bununla beraber birkaç ek husus da özellikle hatalı negatif sonuçlardan kaçınmak anlamında kritiktir.

Bunlar sırasıyla;

- a) Hedef hücrelerin nükleik asit problemleri için geçirgenlikleri (permeabilizasyonları):

Başarılı bir insitu hibridizasyonun ön koşulu prob molekülünün hedef moleküle ulaşabilmesidir. Bunun için hücre duvarı, membranlar ve varsa kapsül materyali ya da ekstraselüler polimerik maddeler gibi hücre komponentlerinin probun içeri girebilmesi için geçirgen olması gerekir. Bu yaklaşım içerisinde, oligonükleotidler polinükleotidlerden ve 1 kDa'dan daha düşük moleküller ağırlıktaki küçük

floresan “etiket”ler horseradish peroksidaz gibi büyük enzim etiketlerinden çok daha iyidirler (Amann ve Schleifer 2001).

Membranlar genel olarak standart oligonükleotidlere geçirgen olmadıkları için bir fiksasyon adımını gerektirirler. Fiksasyon genellikle örneğin aldehit solusyonları (paraformaldehit, formalin) veya denatüre edici alkol ile muamelesi ile gerçekleştirilir. Bu adım aynı zamanda hücreleri de öldürür.

Kalın duvarlı Gram pozitif bakteriler Gram negatiflere göre farklı fiksasyon protokollerine ihtiyaç duyarlar. Bununla birlikte probun difüzyonu prob ile hedef arasındaki mesafe nedeniyle belirli bir zaman gerektirir. Bu nedenle büyük agregatların sonikasyon gibi etkenlerle ayrılması sağlanmalıdır.

b) Prob hedef bölgesinin in situ uygunluğu:

rRNA hedefli floresan in situ hibridizasyon (FISH) ilk uygulandığından beri bazı hedef bölgelerin diğerlerine göre daha güçlü sinyal verdiği görülmüştür. Denatüre edilmiş ekstrakte nükleik asitler için moleküllerin tamamıyla tek iplikli ve farklı hedef bölgelerinin farklı proplar açısından eş uygunlukta olduğu varsayılır. Fakat bu rRNA hedefli oligonükleotidlerle gerçekleştirilen in situ hibridizasyon için böyle değildir. Burada hedef moleküller ribozomun birleşik parçalarıdır ve hala hücre içindedirler. Hem rRNA proteinleri hem de rRNA-rRNA etkileşimleri hedef bölgenin uygunları etkileyebilmektedir. İşte bu da *E.coli* 16S rRNA ‘sında 10 nükleotidden az bir yeri hedef alan 200 floresan etiketli oligonükleotidin, tamamıyla aynı hücreler üzerinde çok farklı floresan boyama kapasiteleri göstermesinin sürpriz olmadığı gerçeğini ortaya koymaktadır (Amann ve Schleifer 2001).

İyi seçilmiş uygun bir hedef bölge insitu identifikasyonda çok kritik olan ve hassasiyeti belirleyen floresan sinyalin oldukça parlak olmasını sağlar. rRNA molekülleri ve ribozomların yapısı korunmuş olduğundan dolayı *E.coli* 16S rRNA’sının in situ uygunluğun hedef bölgelerin seçimi için yardımcı olmalıdır. Fakat farklı türler arasında in situ uygunluk varyasyonları olduğu da unutulmamalıdır. Bu nedenle yeni dizayn edilmiş bir prob denenirken insitu sinyal seviyesinin düşük olduğu görülürse, bu problemin hücre ile ya da prob ile ilgili olup olmadığının anlaşılması için, iyi bilinen ve güçlü floresan veren (Eub338

gibi) bir probun aynı şartlarda denenmesi tavsiye edilmektedir (Amann ve Schleifer 2001).

İn situ hibridizasyon sensitivitesinin artırılması: İn situ hibridizasyonunun sensitivitesi söz konusu olduğunda, bireysel hücrelerin bile identifiye edilebilir olmasının gerektiğinin farkına varılmalıdır. Deniz sedimentleri 10^9 hücre/cm³ içerirler ve çok yüksek oranda da otofluoresan özellikte partiküllere sahiptirler. Böyle durumlarda deteksiyon limiti %0,1 den ya da 10^6 hücre/cm³'den daha iyi olmayabilir. Bununla beraber, daha temiz bir su örneği ve doğru ekipmanlarla, bu durumu <1 hücre/cm³ seviyesine çıkarmak da mümkündür.

Sık karşılaşılan başka bir problem de çevreden gelen bakteriyal hücrelerin floresan oligonükleotid problarla hibridizasyon sonrası düşük sinyale sahip olmalarıdır. Son yıllarda, teknik gelişmeler daha duyarlı FISH çalışmalarının yapılmasını sağlamaktadır. Bunlar CY3 gibi daha duyarlı floresan boya, daha duyarlı ve güçlü kameraların kullanımını içermektedir (Amann ve Schleifer 2001).

Biz çalışmamız da CY3 etiketli problar ve nispeten güçlü kamera sistemleri kullanılarak hassasiyeti yüksek sonuçların eldesini sağlamış bulunmaktayız.

Polinükleotid DNA probları ile FISH ve spesifik oligonükleotidlerle FISH tanımlanmış durumdadır. Bakteriyal identifikasyon, bakteriyal komünite yapısı analizleri, ayrı mikrobiyal popülasyonların kendi habitatlarında zamansal ve mekansal dinamiklerinin araştırılması gibi amaçlar için kullanılabilirler.

Bakteriler için FISH, on yılı aşkın bir süre önce ilk olarak tanımlanmıştır ve mikrobiyal ekoloji çalışmaları için bir dönüm noktası olarak değerlendirilmektedir (Pernthaler ve Amann 2002).

Son yıllarda FISH tatlı sular, kıyı ve açık deniz planktonik habitatlarına ve kıyı sediment örneklerine başarıyla uygulanmıştır. FISH ile belirlenen bakteri fraksiyonlarının, kıyı deniz planktonlarında bulunan aktif hücre miktarı sonuçları ile iyi bir uyum gösterdiği ortaya konmuştur. Proteobacteria'nın farklı alt sınıfları için spesifik problar tatlı su ve deniz planktonları arasındaki temel farkların ortaya konması için ya da çamurlu sedimentlerinin mikrobiyal komünitelerinin dikey dağılımlarını göstermek için kullanılmıştır.

Ana filogenetik soyların ve bazı bireysel bakteri filotiplerinin mevsimsel dinamikleri göl bakteriyoplanktonlarında çalışılmıştır. Archaeal mevsimsel bulunuşluk ve vertikal dağılımları, Antartik kıyı sularında polinükleotid ve oligonükleotid prob lar kullanılarak FISH yöntemi ile ortaya konmuştur.

FISH, predatörlüğün, tatlı su bakteriyoplankton birliktelik kompozisyonunu değiştirebileceğini göstermek için de kullanılmıştır. Aynı zamanda toprak ve atık su muamele sistemlerinde de birçok kullanımı olmuştur (Pernthaler ve ark. 2001).

Bu çalışmamızda Çamaltı Tuzlası su ve toprak örneklerinin Archaea, Bacteria ve *Salinibacter* spesifik Cy3 etiketli prob lar kullanılarak FISH analizleri ilk kez gerçekleştirilmiştir. Her örnek için DAPI boyamaları ile paralel olarak gerçekleştirilen FISH deneyleriyle, örneklerdeki toplam hücre sayıları, Archaea, Bacteria ve *Salinibacter* sayıları tespit edilmiştir. DAPI boyama sonuçlarına göre su örneklerinde 1.Kısım Tuzla H1.1 nolu havuzda $1,39 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml, H1.2 nolu havuzda $1,21 \times 10^7 \pm 0,18$ hücre/ml, H1.3 nolu havuzda $1,48 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml, H1.4 nolu havuzda $1,19 \times 10^7 \pm 0,18$ hücre/ml, H1.5 nolu havuzda $2,7 \times 10^7 \pm 0,25$ hücre/ml, 2.Kısım Tuzla H2.6 nolu havuzda $2,48 \times 10^7 \pm 0,18$ hücre/ml, H2.7 nolu havuzda $1,52 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml, H2.8 nolu havuzda $2,38 \times 10^7 \pm 0,25$ hücre/ml, H2.9 nolu havuzda $1,21 \times 10^7 \pm 0,19$ hücre/ml, H2 .10 nolu havuzda $1,16 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml, 2. Kısım Çöktürme Havuzlarında Ç.1 nolu havuzda $2,48 \times 10^7 \pm 0,18$ hücre/ml, Ç.2 nolu havuzda $1,38 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml, Ç.3 nolu havuzda $1,56 \times 10^7 \pm 0,25$ hücre/ml, Ç.4 nolu havuzda $1,19 \times 10^7 \pm 0,09$ hücre/ml, Yol Kenarı $0,2 \times 10^7 \pm 0,08$ hücre/ml olarak bulunmuştur. Toprak örneklerinde ise; Çamaltı Toprak1 $1,2 \times 10^8 \pm 0,08$ hücre/ml, Çamaltı Toprak2 $0,2 \times 10^8 \pm 0,08$ hücre/ml, Çamaltı Toprak3 $1,21 \times 10^8 \pm 0,25$ hücre/ml, Yol Kenarı $2,22 \times 10^8 \pm 0,18$ hücre/ml, Havuz Tabanı $0,3 \times 10^8 \pm 0,25$ hücre/ml olarak bulunmuştur.

Archaea spesifik prob ile elde edilen FISH sonuçlarına göre 1.Kısım Tuzla H1.1 nolu havuzda %53.8, H1.2 nolu havuzda %56.5, H1.3 nolu havuzda %59.3, H1.4 nolu havuzda %52.6, H1.5 nolu havuzda %50.2, 2.Kısım Tuzla H2.6 nolu havuzda %60.5, H2.7 nolu havuzda %52.9, H2.8 nolu havuzda %52.6, H2.9 nolu havuzda %57.9, H2 .10 nolu havuzda %42.6, 2. Kısım Çöktürme Havuzlarında Ç.1 nolu havuzda %53.9, Ç.2 nolu havuzda %56.7, Ç.3 nolu havuzda %58.9, Ç.4 nolu havuzda %58.4, Yol Kenarı %62.3 olarak bulunmuştur. Toprak örneklerinde

ise; Çamaltı Toprak 1 %49.3, Çamaltı Toprak 2 %53.9, Çamaltı Toprak 3 %53.4, Yol Kenarı %48.6, Havuz Tabanı %48.7'sini Archaeal hücreler oluşturmaktadır. Bacteria spesifik prob ile elde edilen FISH sonuçlarına göre 1.Kısım Tuzla H1.1 nolu havuzda %32.2, H1.2 nolu havuzda %22.6, H1.3 nolu havuzda %22, H1.4 nolu havuzda 30.2, H1.5 nolu havuzda %28.3, 2.Kısım Tuzla H2.6 nolu havuzda %21.9, H2.7 nolu havuzda %31.9, H2.8 nolu havuzda %28.2, H2.9 nolu havuzda %57.9, H2 .10 nolu havuzda %41.8, 2. Kısım Çöktürme Havuzlarında Ç.1 nolu havuzda %32.8, Ç.2 nolu havuzda %21, Ç.3 nolu havuzda %21.7, Ç.4 nolu havuzda %22,65, olarak bulunmuştur. Toprak örneklerinde ise; Çamaltı Toprak1 %23.5, Çamaltı Toprak 2 %21.6, Çamaltı Toprak 3 28.1, Yol Kenarı %32.4, Havuz Tabanı %31.2'sini Bacteria üyeleri oluşturmaktadır. Bu da gösteriyor ki Archaeal populasyonlar genel olarak Çamaltı Tuzlası'nın domine eden organizmalardır.

Çalışmamızda EHB problemlerini kullanarak Çamaltı Tuzlası örneklerinde *Salinibacter* varlığı da araştırılmıştır. Buradan elde edilen deney sonuçlarına göre su ve toprak örneklerinde spesifik hibridizasyon sinyali elde edilmiştir. FISH sonuçlarına göre 1.Kısım Tuzla, H1.2 nolu havuzda %3.9, H1.3 nolu havuzda %2.1, H1.4 nolu havuzda 1.3, H1.5 nolu havuzda %1.2, 2.Kısım Tuzla, H2.7 nolu havuzda %3.6, H2.8 nolu havuzda %0.6, H2.9 nolu havuzda %1.3, 2. Kısım Çöktürme Havuzlarında Ç.1 nolu havuzda %3.5, Ç.2 nolu havuzda 2.8, Ç.3 nolu havuzda %3.9, Ç.4 nolu havuzda %2.9, olarak bulunmuştur. Toprak örneklerinde ise; Çamaltı Toprak1 %4.1, Çamaltı Toprak 3 %3.6, Yol Kenarı %2.7, Havuz Tabanı %3.7'sini *Salinibacter* üyeleri oluşturmaktadır.

Çalışmamızda DAPI boyamaları ve spesifik problemlerle hibridizasyon deneyleri sonrası epifluoresan mikroskopta yapılan incelemeler esnasında kare şekilli Archaeal hücrelere de sık rastlanmıştır.

Sonuç olarak;

Bu çalışma ile klasik yöntemle petrielerde izole edilen canlı bakteri sayısının su örneklerinde 10^3 - 10^5 hücre/ml, toprak örneklerinde ise 10^3 - 10^6 hücre/ml arasında değiştiği ancak DAPI boyamaları ile Çamaltı Tuzlası'ndaki toplam hücre sayısının su örneklerinde 10^7 hücre/ml, toprak örneklerinde 10^8 hücre/ml civarında olduğu ortaya konmuştur.

Bu çalışmada toplam 34 adet prokaryot izole edilmiş ve bunlar saflaştırılarak kültür koleksiyonumuza dahil edilmiştir. PCR ile, Bacteria ve Archaea spesifik primerler kullanılarak 19 izolatın Archaea 15 izolatın ise Bacteria üyesi olduğu belirlenmiştir.

Yağ asidi metil esterleri (Fatty Acids Methyl Esthers) (FAME)'nin gaz kromatografi ile analizi Bacteria domaini üyelerinin karakterizasyonunda kullanılabilen etkili bir yöntemdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre Bacteria domainine ait olduğu belirlenen 15 adet izolatın yağ asidi metil esterlerine göre karakterizasyonu laboratuvarımızda sahip olduğumuz MIDI sistem ile belirlenmiştir. 2 izolat *Bacillus halodenitrifica*, 9 izolat *Bacillus sp*(*Bacillus laevolacticus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus halodenitrificans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus oleronius*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus coalulans*, *Bacillus circulans*) olarak tanımlanırken 5 tanesinde (KZ18, , KZ16, KTP13, KTP10, KTP9) *Staphylococcus schleiferi* olarak tanımlanmıştır. 3 tane izolatın ise TSBA 50 kütübanesinde karşılığı bulunamamıştır.

Bu çalışma ile Çamaltı Tuzlası örnekleri ilk defa komünite düzeyinde in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılarak çalışılmış ve Archaeal populasyonların daha baskın oldukları belirlenmiştir. *Salinibacter ruber*'in varlığı FISH ile tespit edilmiştir ve bundan sonraki aşamada kültürel yöntemlerle izolasyonu ve saf kültür haline getirilmesi için çalışılacaktır.

Bu çalışmada, kültürel yöntemle izole edilmiş olan 34 izolatın PCR yöntemi ile Archaea/Bacteria ayrımı yapılabilmektedir. Ancak ayrımı yapılan bu izolatlar cins ve tür seviyesinde tanımlanamamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda DNA dizi analizi ile saf kültür halindeki 34 izolatın identifikasyon işlemleri tamamlanacaktır.

Ayrıca, Çamaltı Tuzlası'ndan izole edilmiş bu mikroorganizmaların biyoteknolojik potansiyellerinin araştırılması bundan sonraki çalışmaların konusunu oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Abbott, C. M., McMahon, C. J., Whitehouse, D. B., Povey, S. (1988) "Prenatal Diagnosis of Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Using Polymerase Chain Reaction," *Lancet*, **1**,763-764.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A. (1990), *Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1919-1925.
- Amann, R. L., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995), "Phylogenetic identification of individual Microbial cells without cultivation." *Microbiol. Rev.* **59**, 143169.
- Amann, R.Y., Ludwig, W. (2000), "Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology." *FEMS Microbiology Reviews.* **24**,555-565.
- Ana Britaninca Ansiklopedisi (1990), Ana Yayıncılık Sanat Ürünleri San. Tic.A.Ş., Cilt No:21, 247-250, İstanbul.
- Anonim (2000),*Tekel Tuz Sanayii Müessesesi Müdürlüğü Dergisi*,1-14 Çamaltı Mevkii Çiğli- İzmir.
- Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F., Amann, R.(1999), *Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds*. *Environ. Microbiol.* **1**, 517-523.
- Anton, J., Rossello-Mora, R., Rodriguez-Valera, F., Amann, R. (2000), *Extremely halophilic Bacteria in crystallizer ponds from solar saltens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3052-3057.
- Anton, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodriguez-Valera, F., Aman, R., Rossello-Mora, R. (2002), *Salinibacter ruber gen. Nov., sp. Nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltem crystallizer ponds*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 485-491.

- Arahal, D. R., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Volcani, B. E., Ventosa, A. (1996), *Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences*. *App. Environ. Microbiol.* **62**, 3779-3786.
- Benlloch, S., Acinas, S. G., Anton, J., Lopez-Lopez, A., Luz, S.P., Rodriquez-Valera, F. (2001), *Archaeal Biodiversity in crystallizer ponds from asolar saltem: culture versus PCR*. *Microb. Ecol.* **41**, 12-19.
- Birbir, M., (1991), *Deri Endüstrisinde Kullanılan ve İşlenmiş Sığır Derilerinde Derinin Kalitesine Etki Eden Mikroorganizmaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu*, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Birbir, M., Kallı, N., Johansson, C. (2001), *Morphological Characteristics and Sensitivity of Halophilic Isolates to Antibiotics, Plants of the Balkan Peninsula: In to the Milleum*, Ed: Gözükırmızı, N., 45-54.
- Birbir, M., Sesal, C., (2003), "Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Salt Lake". *Turk J. Biol.* **27**, 7-22.
- Boone, D. R., Casstenholz, R. W., Garrity, G. M. (2001), (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2^{od}. Edn. New York. Spinger.
- Ciferri, O. (1983), "Spirulina, the edible microorganism." *Microbiol. Rev.*, **47**, 551-78.
- Çağlayan, S.H., (1991), "Polimeraz Zincir Reaksiyonu:Nükleik Asitleri Çoğaltma Tekniği ve Uygulama Alanları".*Doğa- Tr. J. of Biology*, **15**,9-21.
- Da Costa, M. S., Santos, H., Galinski, E. (1998), "An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea." *Adv. Bioch. Engin. Biotech.* **61**, 117-153.
- DasSarma, S., Arora, P. (2001), "Halophiles. Encyclopedia of Life Sciences, Encyclopaedia International", **16**, *Manufactured in the by American Book-Stratford Pres, Inc.*, New York, 131-135.

- Dyall-Smith, M., (2004), *Halohandbook*, [http/ www. microbiol. unimelb. edu.au /staff / mds/HaloHandbook](http://www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook).
- Encyclopaedia Britannica (1963), Universal copyright Conversions by Encyclopaedia Britannica, Inc. Printed, USA, **16**, 193-200.
- Galinski, E. (1995), "Osmoadaptation in bacteria." *Adv. Microb. Physiol.* **37**,272-328.
- Garcia- Martinez, J., Acinas, S. G., Anton, A. I., Rodriguez- Valera, F. (1999), "Use of 16S-23S ribosomal genes spacerregion in studies of prokaryotic diversity", *J. of Mic. Methods*, **36**, 55-64.
- Garcia, M. T., Ventosa, A., Mellado, E. (2005), "Catabolic versatility of aromatic compound- degrading halophilic bacteria", *FEMS Microbiology Ecology*. **54**,97-109.
- Grant, W. D., Kamekura, M., McGenity T. J., Ventosa, A. "Class III. Halobacteria class. nov." In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, Garrity, G. M. Eds.; The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 294-334.
- Good, V.A., Hartman, P.A. (1970), "Properties of the amylase from *Halobacterium halobium*". *J. Bacteriol.*, **104**, 601-3.
- Gunde-Cimerman N., Zalar, P., de Hoog S., Plemenitas, A. (2000), "Hypersalinewaters in salterns natural ecological niches for halophilic black yeast." *FEMS Microbial. Ecol.* **32**,235-240.
- Hayes, W., (1974), *The Genetics of Bacteria and Their Viruses*, 2nd Edn. Blackwell, Oxford,193-199.Hinteregger, C., Stereichsbier, F., (1997), *Halomonas sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water*. *Biotechnology Letters* **11**,1099-1102.
- İnandık, H. (1955), *Türkiye Gölleri*, İstanbul Üniversitesi Yayını, **44**, İstanbul.
- Javor, B. (1984), *Growth Potential of Halophilic Bacteria Isolated from Solar Salt Environments: Carbon Sources and Salt Requirement*, *Applied Environmental Microbiology*, **48**, 352-360.

- Javor, B., (1989), "Hypersaline Environments, In Microbiology and Biochemistry," Spinger- Verlag.
- Kamekura, M. (1986), "Production and function of enzymes of eubacterial halophiles." *FEMS Microbial. Rev.*, **39**, 145-50.
- Kallı, N. (2000), *Tuz Gölü'nden İzole Edilen Aşırı Halofilik Bakterilerin İzolasyon ve İdentifikasyonlarının Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kim, H.S., Smithies, O. (1988), *Recombinant Fragment Assay for Gene Targetting Based on the Polimerase Chain Reaction*, *Nucleic Acids Res.*,**16**, 8887-8903.
- Koday, S. (1999), *Tuz Gölü Tuzlaları Marmara Coğrafya Dergisi*, **2**, 128-149.
- Kushner, D. (1985), *The Halobacteriaceae*. P. 171-214. En C. Woese and Wolfe, S(ed.), *The Bacteria.*, **8**, Academic Pres, London.
- Kushwara, S.C., Kates, G., Rodriguez-Valera, F., Kushner, D. J. (1982), "Polar Lipids of AnExtremely Halophilic Bacterial Strain (R-4) Isolated from Salt Ponds in Spain", *Biochemistry and Biophysics Acta*, **711**, 19-25.
- Lefebvre, O., Vasudevan, N., Moletta, R. (2005), *Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reaktor*, *Water Research* **39**,1471-1480.
- Macintyre, F. (1970), "Why the Sea is Salt", *Scientific American*, **223**, 104-109.
- Martinez-Murcia, A., Acinas, S. G., Rodriguez-Valera, F. (1995), "Evaluation of prokariotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments." *FEMS Microbiol. EcoL.* **17**, 247-255.

- Mc Conlogue, L., Brow, M.A.D., Innis, M. A. (1988), "Structure- Independent DNA Amplification By PCR Using 7-Deaza-2'-Deoxyguanosine, Nucleic Acids" *Res.*, 16: 9869.
- Mutlu, M.B. (2006), *Tuz Gölü Bakterilerinin Karakterizasyonu ve Mevsimsel Dağılımı*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Nicholson, C.A, Fathepure, B.Z., (2005), "Aerobic biodegradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma". *FEMS Microbiology Letters* **245**,257-262.
- Onishi, H. (1970), "Halophilic amylase from a moderately halophilic Micrococcus" *J. Bacteriol.*, **109**, 570-4.
- Oren, A. (1990), "The use of protein synthesis inhibitors in the estimation of the contribution of halophilic archaeobacteria to bacterial activity in hypersaline environments". *FEMS Microbiology Ecology* **73**, 187-192.
- Oren, A. (1990b), "Estimation of the contribution of halobacteria to the bacterial biomass and activity in solar salterns by the use of bile salt". *FEMS Microbiology Ecology*. **73**, 41-48.
- Oren A. (1993), "Ecology of Extremely Halophilic Microorganisms", "In the Biology of Halophilic Bacteria", Vreeland, R.H.; Hochstein, L.I. Eds.; *FI: CRS Pres, Boca Raton*, 23-54.
- Oren, A., Duker, S., Ritter, S. (1996), "The polar lipid composition of Walsby's square bacterium." *FEMS Microbiol. Let.* **138**, 135-140.
- Oren, A., Ventosa, A., Grant, W.D. (1997), "Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 233-238.
- Oren, A.(1999), "Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments", *CRC Pres, Boca Raton*, London.

- Oren, A., Litchfield C. D. (1999b), "A procedure for the enrichment and isolation of Halobacterium". *FEMS Microbiology Letters*, **173**, 353-358.
- Oren, A., Rodriguez-Valera, F. (2001), "The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds". *FEMS Mikrobiol. Ecol.* **36**, 123-130.
- Oren, A. (2002 a), "Halophilic microorganism and their environments". *Kluwer Academic Publishers*. Dordrecht.
- Oren, A. (2002 b), "Halophilic Microorganisms and their Environments". Dordrecht: Kluwer Scientific Publishers.
- Oren, A. (2002c), "Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria". *FEMS Microbiol. Ecol.* **39**, 1-7.
- Pernthaler A., Pernthaler, J. ve Amann R. (2002), *Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria*. *App. Environ. Microbiol.* **68**, 3094-3101.
- Porter- Jardon, K., Rosenberg, E.I., Keiser, J.F., Gross, J. D., Ross, A. M., Nasim, S., Garrett, C. T. (1990), *Nested Polymerase Chain Reaction Assay for the Delection of Cytomegalovirus Overcomes False Positives Caused By Contamination With Fragmented DNA*, *J. Med. Virology*, **30**, 85-91.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A. (1981), *Characteristics of the Heterotrophic Bacterial Populations in Hypersaline Environments of Different Concentrations*, *Microb. Ecol.* **7**, 235-243.
- Rodriguez-Valera, F., Vensota, A., Juez, G., Imhoff, J. F. (1985), *Variation of Environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern*, *Microb. Ecol.* **11**, 107-115.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985), *Enzymatic Amplification of β -Globin genomic*

- Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia*, **230**, 1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.(1988), *Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA With a Thermostable DNA Polymerase*, **239**, 487-494.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T. (1989), “Molecular cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press”, *Cold Spring Harbor*, New York.
- Telefoncu, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., Pazarlıoğlu, N. (2003), *Biyoinformatik I, Yağ Asit Profillerine Göre Mikroorganizmaların Tanısı ve Karakterizasyonu*, İzmir.
- Tindall, B.J.(1988), *Prokaryotic Life in the Alkaline, Saline, Athalassic Environment. In Halophilic Bacteria*, ed., F. Rodriguez – Valera, CRC Press Boca Raton (Florida), **1**, 31-67.
- Tindall, B.J. (1992), *The Family Halobacteriaceae. In: The Prokaryotes. A Handbook of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, Vol. 1 (Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H., Eds.), pp. 768-808. Springer-Verlag, New York.
- Valera, F. (1988), *Characteristics and Microbial Ecology of Hypersaline Environments*, In *Halophilic Bacteria*, **Vol.1** CRS Press, Boca Raton, 3-30.
- Valera, F. R. (1993) *Introduction to Salina Environments*, In the *Biology of Halophilic Bacteria*, Vreeland, R. H., Hochstein, L.I., Eds.; FI: CRS Press, Boca Raton, 1-24.
- Valera, F.R., Ventosa, A., Juez, G., Imhoff, J. F. (1985), *Variation of Environmental Features and Microbial Populations With Salt Concentrations in a Multi-Pond Saltern*, *Microbial Ecology*, **11**, 107-115.

- Vreeland, R. H. (1993), *Taxonomy of Halophilic Bacteria*, In the Biology of Halophilic Bacteria, Vreeland, R.H. ; Hochstein, L. I. Eds.;FI: CRS Pres, Baco Raton, 105-134
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W. H., Lowenstein, T., Satterfield, C., Ventosa, A. (2006), *Fatty acid and DNA analyses of Permian bacteria isolated from ancient salt crystals reveal differences with their modern relatives* , *Extremophiles* **10**,71-78.
- Wong, C., Dowling, C., Saiki, R. K., Higuchi, R.G., Erlich, H. A., Kazazian, Jr. H.H., (1987). *Characterization of β -Thalassemia Mutations Using Direct Genomic Sequencing of Amplified Single Copy DNA*, *Nature*, **330**,384-386.
- Yalçın, F., (2000), *Characterization of Bacterial Isolates from Salt Lake*, Yüksek Lisans Tezi, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Tehnical University, Ankara.