

VAN GÖLÜ PROKARYOTİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN

ARAŞTIRILMASI

Nilgün KAVAK

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos-2013

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No:1209F144

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nilgün Kavak'ın “**Van Gölü Prokaryotik Çeşitliliğinin Araştırılması**” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 01.08.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç.Dr.M.Burçin MUTLU
Üye:	Prof.Dr. Kıymet GÜVEN
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Gökalp İŞCAN
Üye :	Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ
Üye:	Doç. Dr. Tuba İÇA

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

VAN GÖLÜ PROKARYOTİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Nilgün KAVAK

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Mehmet Burçin MUTLU

2013, 139 sayfa

Bu çalışmada, Van Gölü'nün prokaryotik çeşitliliği araştırılmıştır. Van Gölü'nden Merkez, Tatvan, Ahlat ve Edremit kıyılarından örnekler alınmıştır. İzolasyon %2, %3, %5, %10 ve %12 MGM, Alkalın Nutrient Agar, Horikoshi I ve II besiyerleri, Nişasta Kazein Agar, Aktinomiset İzolasyon Agar ve Gliserol Yeast Extract Agar besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir. Besi ortamlarından elde edilen saf kolonilerden 16S rRNA genine spesifik PCR yapılmış ve 16S PCR ürünlerine amplifiye ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA) uygulanmıştır PCR ürünlerinin saflaştırılması ile nükleotid dizisi belirlenmiştir. Farklı örnekleme bölgelerine ait toplam 124 izolattan 40 farklı strain dizilenmiştir. 16S rRNA gen dizileri NCBI'da BLAST programı kullanılarak referans diziler ile karşılaştırılmıştır. BLAST sonuçlarına göre, Van Gölü'nden baskın olarak Bacteria domainine ait *Halomonas*, *Alkalimonas*, *Marinobacter*, *Vibrio*, *Rhodococcus* belirlenmiştir.

Kültür bağımsız yöntemlerden denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) ve Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemleri de popülasyon dinamiklerini çalışmak için uygulanmıştır. DGGE yönteminden elde edilen dizi analiz sonuçlarına göre Bacteria domainine ait *Citrobacter sp.* belirlenmiştir. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) uygulanmıştır. FISH sonuçları ile örneklerde Bacteria üyesi mikroorganizmaların dominant olarak belirlenmiştir ve bazı örneklerde sadece bakteriyel floresan ışımaya alınmıştır. Van Gölü'nün prokaryotik çeşitliliği karakterize edilmiştir ve bazı strainlerin varlığı Türkiye'de ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca alkalifillerle ilgili kapsamlı bir çalışma ülkemizde ilk kez gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Van Gölü, Alkalifiller ARDRA, DGGE, FISH.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION of PROKARYOTIC DIVERSITY

VAN LAKE

Nilgün KAVAK

Anadolu University Graduate School of Sciences

Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

2013, 139 pages

In this study, prokaryotic diversity of Van Lake was investigated. Samples were taken from central, Tatvan, Ahlat and Edremit coasts from Van Lake. Isolation was performed on %2 MGM, %3 MGM, %5 MGM, %10 MGM, %12 MGM, Alkaline Nutrient Agar, Horikoshi I and II Medium, Starch-Casein Agar, Actinomycetes Isolation Agar and Glycerol Yeast Extract Agar. 16S PCR was carried out for pure to colonies on media and amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) was applied the 16S PCR products. The nucleotide sequences of the purified PCR products were sequenced and 40 different strains in 124 isolates for Van Lake were identified. 16S rRNA gene sequences were compared with reference sequences at NCBI using BLAST. According to the BLAST results, *Halomonas*, *Alkalimonas*, *Marinobacter*, *Vibrio*, *Rhodococcus* in Bacteria domain were identified as dominant species.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was performed for studying population dynamics. As result of this gel in sequence analysis *Citrobacter sp.* was identified. Fluorescence in situ hybridization (FISH) was used for water samples. The community was dominated by Bacteria and some water samples showed positive results only with bacterial fluorescent hybridization probes. Prokaryotic diversity of Van Lake was characterized and existence of some strains were showed in Turkey. In addition detailed study about alkaliphiles was showed first time in our country.

Keywords: Van Lake, Alkaliphiles, ARDRA, DGGE, FISH.

TEŞEKKÜR

Çalışma konumun belirlenmesinde bana öncülük eden ve çalışmalarım sırasında bilimsel katkıları ile bana her zaman yardımcı olan, çalışmalarımın her aşamasında beni destekleyen beni yönlendirip tecrübe ve bilgileriyle her türlü yardımı benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tezim süresince bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan ve desteklerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ, Prof. Dr. Kıymet GÜVEN, Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ, Doç. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ ve bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ali Yavuz KILIÇ' a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardım ve dayanışmalarından dolayı Arş. Gör. Dr. Rasime DEMİREL, Arş. Gör. Emine TÜRK, Uzman Erdoğan ÇAKIR, Mustafa KARAKAŞ, Nilgün TUNCEL'e ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına, teşekkür ederim.

Tez yazım sürecinde yardım ve desteklerinden dolayı Özgür POYRAZ' a teşekkür ederim.

Bana her türlü konuda destek olan ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Nilgün KAVAK

Ağustos, 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii

1. GİRİŞ	1
1.1. Alkalifilik Mikroorganizmalar	1
1.1.1. Alkalifiller üzerine erken çalışmalar	2
1.1.2. İzolasyon, yayılım, taksonomi	2
1.2. Morfolojik-Kültürel-Biyokimyasal Özellikleri	3
1.2.1. Gram pozitif bakteriler	6
1.2.2. Gram negatif bakteriler	8
1.2.3. Mayalar ve fungi	10
1.2.4. Diğer özellikler gösteren alkalifiller.....	10
1.3. Alkalifillerin Fizyolojik Özellikleri	12
1.3.1. İç pH	12
1.3.2. Hücre duvarları.....	13
1.3.3. Na ⁺ iyonları ve aktif taşıma	14
1.3.4. Sitoplazmik pH düzenlenmesinin mekanizması.....	15
1.4. Alkalifillerin Biyoteknolojik Önemi	16
1.4.1. Alkalın enzimler	16
1.4.2. Alkalifiller tarafından üretilen metabolitler.....	19
1.5. Alkalın Çevreler	20
1.5.1. Soda gölünün oluşumu	21
1.5.2. Meydana geliş.....	22
1.5.3. Kimya	23
1.5.4. Soda göllerinin meydana gelişi	25
1.6. Dünyadaki Soda Gölleri.....	27
1.6.1. Turkana Gölü.....	27

1.6.2. Mono Gölü	27
1.6.3. Wadi Natrun Gölü	28
1.6.4. Büyük Soda Gölü	28
1.6.5. Lonar Gölü	28
1.7. Van Gölü	29
1.8. Ribozomal RNA.....	34
1.9. Mikrobiyal Kommunité Analizleri.....	35
1.9.1. DGGE(Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi).....	37
1.9.2. Floresan in situ hibridizasyon (FISH)	39
2. MATERYAL VE METOD	41
2.1. Materyal	41
2.1.1. Kullanılan besiyerleri	41
2.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler	45
2.1.3. Çalışmada kullanılan primerler ve proplar	48
2.2. Metod	49
2.2.1. Örneklerin toplanması	49
2.2.2. Örneklerdeki toplam tuz değerinin, pH'ın ve kimyasal özelliklerin belirlenmesi	50
2.2.3. Mikroskopik inceleme	50
2.2.4. Kültüre alma	50
2.2.5. Mikroorganizmaların tanımlanması	51
3. BULGULAR	66
3.1. Örneklerdeki Toplam Tuz Değerlerinin Ve İyonik Kompozisyonlarının Belirlenmesi	66
3.1.1. Örneklerin toplam tuzluluk değerlerinin belirlenmesi	66
3.1.2. Örneklerin pH değerlerinin belirlenmesi.....	66
3.1.3. Örneklerin ICP sonuçları.....	67
3.2. Mikroskopik İnceleme	68
3.3. Su Örneklerinden Archaea Ve Bacteria İzolasyonu Ve Kültüre Alınmaları .	69
3.4. İdentifikasyon.....	73
3.4.1. Nükleik asit analizine dayalı testler.....	73
3.5. Mikrobiyal Kommunité Analizleri.....	92

3.5.1. Su örneklerinden DNA ekstraksiyonu.....	92
3.5.2. Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE)	93
3.5.3. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) boyama.....	97
4.TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER	103
KAYNAKLAR.....	123

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. <i>Bacillus</i> türlerinde peptidoglikan.....	14
1.2. Sitoplazmik pH düzenlenmesinin şematik gösterimi.....	15
1.3. Alkalın ve tuz göllerinin oluşumunun şematik gösterimi.....	25
1.4. Van Gölü Havza Sınırları ve ana akarsular	29
1.5. Van Gölü Lokalizasyonu.....	33
1.6. Van Gölü uydu görüntüsü.....	33
1.7. Kültür bağımlı ve kültür bağımsız moleküler çalışmalarda izlenecek yol.....	36
1.8. FISH akış şeması.....	40
2.1. Van Gölü örnekleme bölgeleri.....	49
2.2. Zymo ZR Fungal/Bacterial DNA kit ile ekstraksiyon işlem basamakları.....	52
2.3. 1 Kb DNA Ladder	56
2.4. 50bp ladder.....	57
2.5. Promega Wizard SV jel ve PCR saflaştırma kiti ile saflaştırma basamakları.....	59
3.1. Gram pozitif kok şeklindeki hücreler.....	68
3.2. Gram negatif uzun basiller şeklindeki hücreler.....	68
3.3. Gram negatif kok şeklindeki hücreler.....	69
3.4. Edremit ve Tatvan örneğinden izolatların alkalın NA ve Horikoshi I besiyerindeki görüntüleri.....	70
3.5. Edremit ve Tatvan örneğinden izolatların Horikoshi I besiyeri ve % 5 MGM' deki görüntüleri.....	70
3.6. Tatvan ve merkez örneğinden izolatların Horikoshi II besiyeri ve % 5 MGM' /deki görüntüleri.....	71
3.7. Merkez ve Edremit örneğinden izolatların alkalın nutrient agar ve % 3 MGM' deki görüntüleri.....	71
3.8. Tatvan örneğinden izolatların aktinomiset izolasyon agardaki görüntüleri...	72
3.9. Edremit ve Tatvan örneğinden izolatların nişasta kazein agar ve aktinomiset izolasyon agardaki görüntüleri.....	72
3.10. Tatvan örneği Bacteria spesifik primer setleri ile 16 S PCR jel görüntüsü.....	74

3.11. Tatvan ve edremit 2. Örneklemeler Bacteria spesifik primer setleri ile 16 S PCR jel görüntüsü.....	74
3.12. Tatvan ve Edremit örnekleri aktinomiset izolasyon besiyerlerinden Bacteria spesifik primer setleri ile 16 S PCR jel görüntüsü.....	75
3.13. Van Merkez Bacteria ürünlerinin <i>Hinf I</i> enzimi ile kesimi.....	76
3.14. Van Merkez örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının <i>Hinf I</i> enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası	76
3.15. Ahlat Bacteria ürünlerinin <i>Hinf I</i> enzimi ile kesimi.....	77
3.16. Ahlat örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının <i>Hinf I</i> enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası.....	77
3.17. Edremit Bacteria ürünlerinin <i>Hinf I</i> enzimi ile kesimi.....	78
3.18. Edremit örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının <i>Hinf I</i> enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası.....	78
3.19. Aktinomiset besi yerinden tatvan ve edremit 2.örnekleme Bacteria ürünlerinin <i>Hinf I</i> enzimi ile kesimi	79
3.20. Aktinomiset besi yerinden tatvan ve edremit 2.örnekleme örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının <i>Hinf I</i> enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası.....	79
3.21. Tatvan Bacteria ürünlerinin <i>Hinf I</i> enzimi ile kesimi.....	80
3.22. Tatvan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının <i>Hinf I</i> enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası.....	80
3.23. Merkez örneğinden elde edilen izolatların dağılımını gösteren grafik.....	82
3.24. Tatvan örneğinden elde edilen izolatların dağılımını gösteren grafik.....	86
3.25. Ahlat örneğinden elde edilen izolatların dağılımını gösteren grafik.....	87
3.26. Edremit örneğinden elde edilen izolatların dağılımını gösteren grafik.....	91
3.27. Van Gölü izolatlarının genel dağılımını gösteren grafik.....	92
3.28. Su örneklerinden genomik DNA izolasyonu.....	93
3.29. Su örneklerinden DNA ekstraksiyonu.....	93
3.30. Su örneklerinden elde edilen DNA' lardan Archaea ve Bacteria için DGGE-16S PCR jel görüntüsü.....	94
3.31. Su örneklerinden elde edilen DNA' lardan Archaea ve Bacteria için DGGE-16S PCR jel görüntüsü.....	95

3.32. DGGE jeline yüklenecek 16S PCR ürününün hesaplanması için elde edilen jel görüntüsü (Su örnekleri ve izolatlardan).....	95
3.33. DGGE jel görüntüsü.....	96
3.34. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Edremit örneği.....	98
3.35. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Tatvan (2. örnekleme) örneği (İşaretlenmiş spiral şekilli bakteri hücresi)	98
3.36. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Tatvan (2. örnekleme) örneği (İşaretlenmiş kok şekilli zincir oluşturmuş bakteri hücreleri).....	99
3.37. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Merkez örneği (İşaretlenmiş basil şekilli bakteri hücreleri).....	99
3.38. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Tatvan örneği (İşaretlenmiş spiral şekilli bakteri hücreleri).....	100
3.39. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Merkez örneği (İşaretlenmiş uzun basil şekilli bakteri hücresi).....	100
3.40. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Edremit örneği.....	101
3.41. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Edremit örneği.....	101
4.1. Van Gölü mikrobiolitlerinden elde edilen 16 S rDNA kütüphalesindeki bakteriyel kolonların taksonomik dağılımı.....	109
4.2. Halorhodospira halochloris ‘e ait faz-kontrast mikrografi.....	119
4.3. Halomonas elongata strain 1H9 ‘a ait uzun ve kısa hücre formlarını gösteren faz-kontrast mikrografi.....	119

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Soda göllerinden izole edilen prokaryotları içeren taksonomik gruplar	4
1.2. Soda gölleri ve soda çöllerinin dünyadaki dağılışı.....	21
1.3. Van Gölü morfometrik veriler.....	23
1.4. Van gölü, Nemrut gölü ve deniz suyunun kimyasal kompozisyonu.....	26
1.5. Van Gölü suyunda çözünmüş halde bulunan anyon ve katyonlar.....	32
2.1. Çalışmada Kullanılan Primerler ve Problar.....	48
2.2. Örnekleme bölgeleri ve alınış tarihleri.....	49
2.3. PCR reaksiyonu kurulması.....	53
2.4. 1X OneTaq Quick-Load Master Mix ile PZR reaksiyonu kurulması.....	54
2.5. Fidelitaq Master Mix ile Reaksiyon Kurulması.....	54
3.1. Örneklerin tuzluluk değerleri.....	66
3.2. Örneklerin pH değerleri.....	66
3.3. ICP analiz sonuçları.....	67
3.4. Merkez profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları.....	81
3.5. Merkez profillerinden elde edilen izolatlar ve sayıları.....	82
3.6. Tatvan profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları.....	83
3.7. Tatvan profillerinden elde edilen izolatlar ve sayıları.....	85
3.8. Ahlat profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları.....	86
3.9. Ahlat profillerinden elde edilen izolatlar ve sayıları.....	87
3.10. Edremit profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları.....	88
3.11. Edremit profillerinden elde edilen izolatlar ve sayıları.....	90
3.12. Van gölü profillerinden elde edilen izolatlar ve sayıları (Toplam).....	91
3.13. DGGE bantlarından elde edilen dizi analizi sonuçları.....	96
3.14. DAPI sayım sonuçları.....	102

1. GİRİŞ

Alkalifilik mikroorganizmalar ekstremofilik mikroorganizmaların önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Bu mikroorganizmalar pH 9.0-12.0 aralığında gelişim gösterebilmektedir. Bu organizmalar çoğunlukla nötr topraklar, soda gölleri gibi ekstrem bazik ve tuzlu çevrelerde yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Alkalifilik mikroorganizmalar biyoteknolojinin bazı alanlarında çeşitli potansiyel uygulamalara sahiptir. Bu uygulamaların başında biyoteknolojik açıdan oldukça kullanışlı biyomalzemelerden olan alkalifilik enzimler gelmektedir. Bu gibi çeşitli uygulamalar nedeni ile alkalifilik mikroorganizmalar ilgi çekici hale gelmektedir.

Bu çalışma ile Van Gölü'ndeki prokaryotik çeşitliliğin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda su örnekleri alınarak saf kültür izolasyonu yapılmış ve izolasyon sonrası elde edilen izolatların identifikasyonları moleküler yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Kültür bağımlı çalışmalar yanında moleküler yöntemlerden PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), ARDRA (Amplifiye Edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi), Dizi analizi, DGGE (Denatüre Edici Gradient Jel Elektrofrezisi), FISH (Floresan In situ Hibridizasyon) gibi analiz yöntemleri de kullanılmıştır. Bu çalışma ile ülkemizde Van Gölü prokaryotik çeşitliliği ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

1.1. Alkalifilik Mikroorganizmalar

Alkalifilik mikroorganizmalar nötrlüğün en az 2 pH birimi yukarısında optimum gelişim gösteren organizmalardır.

Alkalitolerant mikroorganizmalar ise pH değeri 9.0'dan daha fazla değerlerde gelişebilen ya da yaşayabilen fakat optimal gelişme nötr veya daha düşük bir değerde gerçekleşen organizmalardır.

Bununla birlikte bazı alkalifiller birden fazla pH optimumu sergilerler. Bazı mikroorganizmalar sodyum iyonlarının varlığı ve yokluğunda gelişim koşullarına bağlı olarak alkalifil veya alkalitolerant olabilir. Ancak alkalifilik terimi pH 9.0 üzerinde optimal veya iyi gelişen mikroorganizmalar için kullanılmaktadır (Horikoshi, 2006).

1.1.1. Alkalifiller üzerine erken çalışmalar

1968 yılında Koki Horikoshi çalışmalarına başladığında alkalifilik bakterilerle ilgili sadece 16 adet bilimsel kayıt bulunmaktaydı.

Japonya'da eski zamanlardan bu yana indigo (çivit) doğal olarak sodyum karbonat varlığında redüklenmektedir. İndigo bitkisinin yapraklarından elde edilen indigo yüksek alkalın koşullarda gelişen bakteriler tarafından redüklenebilmektedir. Bu prosese indigo fermentasyonu adı verilmektedir. Buradaki en önemli faktör pH değerinin kontrolünün sağlanmasıdır. Takahara ve öğrencileri bir indigo topundan indigo redükleyen bakteri izole etmiştir. Daha sonra ise indigo fermentasyonunu alkalifilik *Bacillus* sp. aracılığı ile iyileştirmişlerdir.

Horikoshi ve çalışma arkadaşları 1968'den bu yana çok sayıda alkalifilik mikroorganizma izole etmiştir ve pek çok alkalın enzimi saflaştırmıştır. Alkalın proteazlarla ilgili ilk yayın 1971'de basılmıştır (Horikoshi, 2006).

Bu mikroorganizmalarla ilgili çalışmalar uzun süredir sürdürülmektedir ve enzimoloji, fizyoloji, ekoloji, taksonomi, moleküler ve genetik odaklıdır. Bu mikroorganizmaların endüstriyel uygulamaları geniş ölçüde araştırılmaktadır ve alkalın proteazlar, alkalın amilazlar ve alkalın selülazlar gibi bazı enzimler endüstriyel alanda kullanıma sunulmuştur (Horikoshi, 2006).

1.1.2. İzolasyon, yayılış, taksonomi

Alkalifillerin dağılım ve izolasyonu

Alkalifilik mikroorganizmalar sodyum karbonat, sodyum bikarbonat ve potasyum karbonat içeren alkalın besiyerlerinde izole edilebilmektedir. Bu bileşenler için konsantrasyon aralığı % 0.5 ile %2' dir. Mikroorganizmaların ihtiyacına bağlı olarak besiyeri pH' ı 8.5 ve 11 arasında değişebilmektedir (Horikoshi, 2006).

Besiyeri hazırlanmasındaki en önemli nokta sodyum karbonatın ayrı olarak steril edilmesidir.

Alkalifilik mikroorganizmalar dünyada oldukça yaygındır. Bakterilere ek olarak aktinomiset, fungi, maya ve fajları içeren çeşitli mikroorganizmalar izole edilmiştir. Alkalın pH bölgelerinde olduğu kadar nötral pH bölgelerinde de pek çok mikroorganizma bulunabilmektedir (Horikoshi, 2006).

Kültüre alınması ve saklanması

Kültüre alma koşulları

Alkalifiller için en yaygın kullanılan besiyerleri Horikoshi I ve II 'dir. Alkalifiller gelişim için çeşitli besinlere gereksinim duymaktadır fakat birkaç alkalifilik *Bacillus* straini gliserol, glutamik asit, sitrik asit gibi basit minimal besiyeri içeriğinde gelişebilmektedir.

Alkalifiller için genel kültürasyon sıcaklığı 20-55 °C arasındadır. Bununla birlikte 60-70 °C'de gelişebilen birkaç termofilik alkalifilin bahçe topraklarında bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca alkalın göllerden izole edilen haloalkalifillerin %20 NaCl içeren alkalın çevrelerde gelişebildiği tespit edilmiştir (Horikoshi, 2006).

Koruma

Kısa süreli bir koruma yapılacaksa taze besiyerine ardışık seri pasajlama ile sağlanabilmektedir. Buzdolabında 5-8 °C' de depolama da tercih edilen yöntemlerdendir. Bununla birlikte bazı mikroorganizmalar düşük sıcaklıklara hassastır ve bu yüzden önemli strainlerin muhafazası oda sıcaklığında sağlanmaktadır.

Uzun süreli korumada ise kuru dondurma en çok tercih edilen metoddur. Etkili dondurma % 1 monosodyum glutamat içeren %20 'lik süt tozu kullanılarak sağlanmaktadır. Sıvı nitrojende donmuş halde saklama da sıkça tercih edilmektedir (Horikoshi, 2006).

1.2. Morfolojik-Kültürel-Biyokimyasal Özellikleri

Soda göllerinin prokaryotik gruplarının taksonomisine baktığımızda oldukça çeşitli grupları içerdiği görülmektedir. Hem Archaea hem de Bacteria domaini üyelerini içermektedir. Ancak yapılan çalışmaların geneli incelendiğinde

Bacteria domaini üyelerinin daha baskın olduğu belirlenmiş, özellikle Proteobacteria sınıfına ait üyelerin çeşitliliği dikkat çekmektedir.

Soda göllerinden izole edilen prokaryotik grupların taksonomisinin özeti 1998’de Jones tarafından yeniden oluşturulmuştur ve çizelge 1.1’ de belirtilmiştir. Ekstrem alkalifillerin geniş taksonomik çeşitliliği açıkça görülmektedir.

Çizelge 1.1. Soda göllerinden izole edilen prokaryotları içeren taksonomik gruplar

Eubacteria
Cyanobacteria
Chroococcales
Oscillatoriales
Spirulina spp.
Firmicutes (Gram-positive bacteria)
Actinomyces (high G+C Gram-positive bacteria)
Actinomycetales
Micrococcaceae
Nocardiform actinomyces
Streptomyces
Low G+C Gram-positive bacteria
Bacillaceae
Clostridiaceae
Haloanaerobiales

Çizelge 1.1. (Devamı) Soda göllerinden izole edilen prokaryotları içeren taksonomik gruplar

<i>Proteobacteria</i>
Beta subdivision
Delta subdivision
Gamma subdivision
<i>Ectothiorhodospira</i>
<i>Halomonadaceae</i>
<i>Pseudomonas</i>
<i>Spirochaetales</i>
<i>Spirochaetaceae</i>
<i>Spirochaeta</i>
<i>Thermotogales</i>
<i>Thermopallium</i>
<i>Thermopallium natronophilum</i>
Archaea
<i>Euryarchaeota</i>
<i>Halobacteriales</i>
<i>Halobacteriaceae</i>
<i>Halorubrum</i>
<i>Halorubrum (Natronobacterium vacuolatum)</i>
<i>Natrialba</i>
<i>Natrialba (Natronobacterium) magadii</i>
<i>Natronobacterium</i>
<i>Natronobacterium gregoryi</i>
Unclassified <i>Natronobacterium</i> spp.
<i>Natronococcus</i>
<i>Natronococcus amylolyticus</i>
<i>Natronococcus accultus</i>
Unclassified <i>Natronococcus</i> spp.
<i>Natronomonas</i>
<i>Natronomonas (Natronobacterium) phamonis</i>
<i>Methanomicrobiales</i>
<i>Methanosarcinaceae</i>
<i>Methanohalophilus</i>
<i>Methanohalophilus oregonensis</i>
<i>Methanohalophilus zhilinaeae</i>
<i>Methanohalophilus</i> sp. Z-7936

1.2.1. Gram pozitif bakteriler

***Bacillus* sp.**

Bacillus alkaliphilus'un gelişimi için optimal pH 8.6 ile 10.0 arasındadır. Chislett ve Kushner (1961a, 1961b) pH 10 civarında yüksek alkalın özellikte besiyerinde gelişebilme yeteneğine sahip bir strain tanımlamıştır ve *B. circulans* olarak sınıflandırmıştır.

Takahara ve Tanabe (1960; 1961; 1962) indigo boyası redüksiyonu için kullanılan indigo bitkisinin yapraklarının bulunduğu fiçidan alkalifilik bir strain izole etmişlerdir ve tür ismi *Bacillus alkaliphilus nov. sp.* olarak belirlenmiştir. Bu strainin gelişim için için optimum pH ' ı 10-11.5' tir. Bir başka alkalifilik bakteri bir indigo topundan izole edilmiştir. Bu bakterinin pH 10-10.5 'te iyi geliştiği fakat pH 7-8' de gelişmediği ve *Bacillus alkaliphilus nov. sp.*' ye benzer olduğu belirlenmiştir (Horikoshi, 2006).

1968'den beri pek çok alkalifilik bakteri izole edilmektedir. Bu bakterilerin çoğu gram pozitif, spor oluşturan, hareketli, katalaz pozitif ve aerobik çubuklardır ve bu yüzden *Bacillus* cinsinde sınıflandırılmaktadır.

Fritze, Flossdorf ve Claus (1990) sistematik bir şekilde taksonomik çalışmalar yapmıştır. Taksonomik çalışmalar için 78 alkalifilik *Bacillus* strainin DNA baz kompozisyonu analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda strainler gruplanmıştır. DNA grup A, Guanin+Sitozin (G+C) 34.0-37.5 % mol 17 strain, DNA grup B G+C 38.2-40.8 % mol 33 strain, DNA grup C G+C 42.1-43.9 % mol 28 strain olarak belirlenmiştir (Horikoshi, 2006).

Spanka ve Fritze (1993) 20 alkalifilik *Bacillus* straini izole etmiş ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Yeni izole edilen strainler için *Bacillus cohnii* ismini düşünmüştür.

Nielsen ve ark. (1994) 14 alkalifilin 16 S rDNA'sını analiz etmiştir. 1520 kadar nükleotid ile karşılaştırmalı dizi analizi gerçekleştirmiştir. *Bacillus alcalophilus* DSM 485⁺ ve *Bacillus cohnii* DSM 6307⁺ *Bacillus* cinsine ait 2 alkalifilik temsilci olarak kullanılmıştır. İzolatların çoğu *Bacillus* cinsinin dalları içinde uzak bir filogenetik grubu oluşturan *Bacillus alcalophilus* ile kümelenmiştir.

Nielsen, Fritze ve Priest (1995) çeşitli kaynaklardan izole edilen alkalifilik Bacillus strainlerinin çeşitliliğini rapor etmiş ve 9 yeni tür belirlemiştir. Alkalifilik ve alkalitolerant aerobik endospor oluşturan 107 strain 47 fizyolojik ve biyokimyasal karakteristik ve DNA baz kompozisyonu açısından incelenmiştir (Horikoshi, 2006).

Anaerobik spor oluşturanlar ve oluşturmayanlar

Birkaç uygulama geliştirilmesine rağmen pek çok anaerobik spor oluşturan alkalifil basit prosedürler ile izole edilmiştir. Wiegel ve öğrencileri termofilik özellik gösteren anaerobik alkalifiller izole etmişler ve karakterizasyonlarını gerçekleştirmişlerdir.

Clostridium strainleri soda göllerindeki prokaryotların en iyi temsilcilerindedir. İlk tanımlanan, yeni cins ve tür olarak sonradan sınıflandırılan alkalifik fakültatif anaerobik strain (*Amphibacillus xylanus*) oldukça detaylı çalışılmıştır. Bu ilginç alkalifil, optimum gelişme için yüksek amonyum konsantrasyonuna bağlı olduğundan *B.pasteurii* ile ortak bir kökten geldiği düşünülmektedir. Hücreler amonyumun asimilasyonunu içerebilen glutamat dehidrogenaza sahiptir. *A. Xylanus* sitokramlar, quinon ve katalaz içermez, Na⁺ gradienti için amino asit taşıyan veya şeker birleştiren ileticilere sahiptir ve belirgin bir şekilde amonyum iyonunu harekete geçirmektedir (Dworkin ve ark., 2006).

9 alkalitolerant termofilik bakteri Yellowstone National Park' tan alınan toprak ve su örneklerinden izole edilmiştir. Engle ve ark. (1996) termofilik, alkalifilik obligat anaerop, *Thermobrachium celere* gen. Nov. sp. nov rapor etmişlerdir.

Svetlitsnyi ve ark. (1996) tarafından anaerobik termofilik organoheterotrofik lipolitik alkalitolerant bakterinin 3 straini izole edilmiştir. *Thermosyntropha lipolytica* gen. Nov., sp. nov. Kenya' daki Bogoria Gölü'nden izole edilmiştir. Hücreler hareketsiz, spor oluşturmayan, düz veya hafif kıvrılmış çubuklar şeklindedir. Gelişim için optimum pH aralığı 8.1-8.9 arasındadır (Horikoshi, 2006).

Micrococcus sp.

Hücreler küreler, tek, çiftler halinde ve tetralarda, koloniler sarı renklidir. Kimura ve Horikoshi (1988) alkalifilik psikotrofik bir bakteri straini izole etmiştir. Bu bakteri gram pozitif, katalaz pozitif, spor oluşturmeyen, aerobik koktur.

Kim, Lee ve Kim (1993) alkalın koşullar altında nişastada gelişen *Micrococcus sp.* Y-1'i izole etmiştir. Bu izolat etkili bir şekilde ekstraselüler pullulanaz salgılamıştır. Gelişim ve enzim üretimi pH 6-12 değerleri arasında meydana geldiğinden oldukça alkalifiliktir (Horikoshi, 2006).

Corynebacterium sp.

Kobayashi ve Horikoshi maltoz dehidrogenaz üreten 2 alkalifilik *Corynebacterium* straini izole etmiştir. Aerobik, gram pozitif, spor oluşturmeyen, asit-fast olmayan, katalaz pozitif ve çubuk şekillidirler.

İkeda, Nakajima ve Yumoto (1994) karbon kaynağı olarak n-alkenler içeren besiyeri kullanarak topraktan yeni bir zorunlu alkalifilik bakteri izole etmiştir. İzolat aerobik, hareketsiz, gram pozitif ve metakromatik granül oluşturmaktadır. Asit-fast değildir ve endospor oluşturmamıştır. Testlere göre izolatın *Corynebacterium* cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Horikoshi, 2006).

1.2.2. Gram negatif bakteriler

Pseudomonas sp.

Watanabe ve ark. (1977) topraktan 2 strain izole etmiştir. Strainlerden biri 5.5-9.0 pH aralığında gelişmiştir, optimum pH 8.2 ve 8.7 arasında olduğu saptanmıştır. Diğer strain ise pH 4.5-9.0 aralığında gelişmektedir. Optimum pH 6.6-7.0 arasındadır. Strainlerden biri 37 °C altında sıcaklıklarda gelişen *Pseudomonas nitroreducens*'e benzemektedir. Diğer strain ise 42 °C' de gelişebilmektedir. Buna ilave olarak bu strain glukoz ve ksiloz'dan asit oluşturma dönemlerinde, benzoat asimilasyonunda, NaCl toleransı ve lipaz üretimi açısından farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar yeni tür olmasına izin vermektedir; *P.nitroreducens nov. var. thermotolerans*. Diğer strain ise *P. fragi* olarak tanımlanmıştır.

Dees ve ark. selüloz üreten gram negatif bir bakteri karakterize etmiştir. Metabolik ve fiziksel karakterizasyonu alkalifilik, nonfermentatif, gram negatif, oksidaz pozitif hareketli ve selüloz degrade ettiğini ortaya çıkarmıştır.

Vazquez ve ark.(1995) 34 psikotrofik bakteri izole etmiştir (Horikoshi, 2006).

Flavobacterium sp.

Souza ve ark. (1974) aerobik ve anaerobik alkalifilik bakteriler izole etmiştir. Kaliforniya’da oldukça alkalın kaynaklardan izole edilmiştir. Aerobik bakteri gram negatif, spor oluşturmeyen, hareketli çubuklar ve pH NaOH ile 10,5’e ayarlandığında triptik soy agarda turuncu renkli koloniler oluşturmaktadır. Gelişim için pH aralığı 8.0-11.4’ tür. Optimum pH 9.0-10’ dur. Bu bakteri *Flavobacterium* türü olarak sınıflandırılmıştır (Horikoshi, 2006).

Aktinomisetler

Taber (1959) ilk olarak *Streptomyces caeruleus* olarak tanımlanan alkalın bir *Streptomyces* türü yayınlamıştır. Tür pH 7.2’nin yukarisına ayarlanmış besiyerinde gelişmiş fakat pH 6.9’un altında gelişmemiştir. İyi gelişim pH 8.2’de elde edilmiştir (Horikoshi, 2006).

a) *Streptomyces sp.*

Nakanishi (1974) pH nötral iken gelişim göstermeyen fakat pH 9.0 üzerinde iyi gelişen ve alkalın proteaz üreten *Streptomyces straini* izole etmiştir.

Mikami ve ark. (1984) geniş çapta toprak ve kültür koleksiyonlarında alkalifilik *Streptomyces* türlerini araştırmıştır ve topraktan 20 strain izole etmiştir. Bu strainler pH 9-9.5 arasında alkalın besiyerinde iyi gelişim göstermiştir. pH 7.0 altında az ya da hiç gelişim görülmemiştir (Horikoshi, 2006).

b) *Nocardiopsis sp.*

Japonya’da topraktan izole edilen alkalifilik aktinomiset strainlerinin *Nocardiopsis* cinsine ait olduğu gösterilmiştir. 4 izolat taksonomik özellikleri açısından incelenmiş ve yeni bir alt tür tanımlanmıştır. *Nocardiopsis dassonvillei*, *N.dassonvillei subs. prasina subsp. nov.* Bu organizmalar pH 7 ve 11 arasında gelişebilmişlerdir. En iyi gelişim pH 9-10 arasında elde edilmiştir (Horikoshi, 2006).

1.2.3. Mayalar ve fungi

Aono (1990 a) laboratuvarında alkalitolerant mayaların taksonomik dağılımını çalışmıştır. Maya ve maya benzeri fungilerin gelişimi için üst pH limitini belirlemek için incelemelerde bulunulmuştur. 86 türün 135 straininin pH 10' un yukarısında gelişebildiği saptanmıştır. Bu alkalitolerant strainler mayaların 27 cinsine aittir. 10 cins sadece alkalitolerant türleri içermektedir. Ayrıca Aeono (1992a) *Harsenula* cinsine ait ve birkaç strain için üst pH limitini ölçmüştür. Horikoshi II besiyerinde gelişebilen pekçok filamentli fungi izole edilmiştir ve bazıları pH 5-10 aralığında iyi gelişim göstermiştir (Horikoshi, 2006).

1.2.4. Diğer özellikler gösteren alkalifiller

Siyanobakteriler

Alkalifilik siyanobakteriler oksijen üreten fotosentetik organizmalardır. Bunlar; *Spirulina*, *Cyanospira*, *Synechococcus* ve *Chorococcus*'tur (Dworkin ve ark.2006).

Son zamanlarda birkaç alkalifilik siyanobakteri izole edilmiş ve pH homeostasisi açısından incelenmiştir, ancak endüstriyel uygulama rapor edilmemiştir.

Buck ve Smith (1995) alkalifilik *Synechocystis* sp.'de Na^+/H^+ elektrogenik antiporter rapor etmiştir.

Schlesinger ve arkadaşları (1996) yüksek pH değerlerinde fonksiyon gösterebilmek için sodyuma gereksinim duyan bir diğer alkalifil siyanobakteri olan *Spirulina platenis*'i rapor etmiştir. Kısa süreli fotosentetik oksijen değişimi için 2.5 mM Na^+ gerekli iken pH 10 'da optimal gelişim için 150-250 mM Na^+ gerekmektedir. Tamamen sodyum yokluğu diğer alkalifillerde olduğu gibi sodyum/proton antiporter' ı inaktivitesi sonucu *S.platenis* 'te bozulmaya sebep olmuştur.

Singh (1995) bir alkalifilik siyanobakteriden üreaz saflaştırmıştır ve bazı özelliklerini araştırmıştır. Enzim optimum aktivite pH 7.5' te 40°C' de 120 μm mol /L değerinde bir K_m ile aktivite göstermiştir. Enzimin özellikle Hg^{+2} , Ag^+ ve

Cu⁺² gibi metal katyonlara duyarlı olduğu belirlenmiştir. Hidroksimerküri benzoat ve cetohidroksamik asitin enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği saptanmıştır.

Haloalkalifiller

Halobacteriaceae 43 cins içerisinde sınıflanmaktadır ve son yıllarda tanımlanan tür sayısı artmaktadır.

Halofilik Archaea *Natronobacterium* ve *Natronococcus* cinsine ait olan strainler yüksek pH değeri ile (8.5-11) yüksek tuz konsantrasyonu olan çevrelerde gelişen alkalifillerdir. Bu strainler soda gölleri ve soda çölleri gibi hipersalin-alkalin çevrelerden izole edilmiştir.

McGenity ve Grant (1995) geniş ölçüde *Halobacteriaceae* çalışmıştır ve birkaç *Halobacterium* strainini yeni cins *Halorubrum*' a transfer etmiştir.

Grant ve arkadaşları hipersalin alkalın çevrelerden izole edilen haloalkalifillerle geniş çapta çalışmışlardır. 16S rRNA analizi ile strainlerin sınıflanmasını rapor etmişlerdir. *Natronobacter magadii* ribozomal RNA operonu plamit vektöre klonlanmıştır. Southern analizi *Halobacteria*'nın diğer üyelerine benzer olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Yeni bir haloalkalifilik arkea Magadii Gölü'nden izole edilmiştir. (Muratha ve Grant, 1993). Mikroorganizmanın hücreleri gelişimin durgun fazında gaz vakuelleri içerir ve koloniler parlak pembe renklidir. Adı *Natronobacterium vacuolata* sp. nov. olarak düşünülmüştür (Horikoshi, 2006).

Haloalkalifillerin ekoloji, fizyoloji ve taksonomi çalışmaları Jones ve arkadaşları tarafından derlenmiştir. Soda göllerinden bir seri aerobik kemoorganotrofik bakteri ve Archaea 16S r RNA genleri dizilenmiş ve filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Gram negatif alkalifiller Halomonas//Deleya grubuna ait pek çok izolatu ile, Proteobacteria'nın 3 alt divizyosuna ait bulunmuştur. Gram pozitif alkalifiller ise *Bacillus* grubuna ait pek çok izolatla ve diğerleri *Arthrobacter spp.*' ye ait olmak üzere yüksek % G+C ve düşük % G+C divizyolarında yer almıştır. Alkalifilik Archaea *Natronococcus* ve *Natronobacterium* cinsi üyelerine aittir. Bir anaerobik, termofilik izolat ise Thermotogales içinde yeni bir cinse aittir.

Romano ve ark. (1996) Pantelleria Adası' ndaki Venere Gölü kumundan aerobik haloalkalifilik bakteri izole etmiş ve karakterizasyonunu

gerçekleştirmişlerdir. İzolat %10 NaCl varlığında, 33-35 °C' de ve pH 9.0' da optimal gelişim göstermektedir. Gram negatif, pleomorfik çubuk ve aerobiktir. Polyhidroksi bütirat birikimi yapabilmektedir. Tiamin ve biotin varlığında farklı karbon kaynaklarında gelişebilmektedir. Haloalkalifilik bu strain yeni bir tür olarak Halomonas cinsinde yer alabilmektedir. *Halomonas pantelleriense* isim olarak düşünülmüştür (Horikoshi, 2006).

Metanojenler

Nakatsugawa çeşitli örneklerden birkaç alkalifilik metanojen izole etmiştir. Strainlerden biri Kaliforniya hipersalin Salton Denizi'nden izole edilmiştir. İzolat Arkebacterium'dur ve gram negatif, spor oluşturmeyen, flagellalı anaerobik koktur. Optimum NaCl konsantrasyonu 2.5-3.0 M, optimum pH 8-8.5 ve optimum sıcaklık 30-40°C'dir. Metanogenez 3.5-4 M NaCl varlığında meydana gelmiştir. Metan üretiminden metanol, metilamin, dimetilamin ve trimetilamin çok iyi substratlardır. Diğer strain Japon göl sedimentinden izole edilmiştir. Gram pozitif, pseudosarcina veya koktur. Optimum gelişim için sıcaklık ve metanogenez 8-8.7 M ve 34-42 °C' dir. Hidrojen ve karbondioksit, asetat, metanol ve metilamin gelişim ve metanogenesis için kullanılmıştır. Metanolün gelişim için en iyi substrat olduğu belirlenmiştir (Horikoshi, 2006).

Boone ve ark. (1993) çeşitli tuzlalar ve doğal hipersalin çevrelerden 6 kokoid, halofilik metanojen izole etmiştir. Strainler 40°C civarında ve 0.5-2.5 M NaCl içeren ortamda pH 7 civarında hızlı gelişim göstermiştir (Horikoshi,2006).

1.3. Alkalifillerin Fizyolojik Özellikleri

1.3.1. İç pH

Çoğu alkalifil iyi araştırılmış nötrofilik mikroorganizmalardan farklı olarak pH 10 civarında optimal gelişim göstermektedir. Bu yüzden alkalifilk mikroorganizmaların bu çevrelerde nasıl geliştiğine dair alkalifilik ve nötrofilik mikroorganizmalar arasında yapısal ve fizyolojik açıdan herhangi bir fark var mıdır gibi sorular artmaktadır. Hücre içi sitoplazmik pH hücre içi enzimlerin optimal pH değerlerinden tahmin edilebilir. Örneğin *Micrococcus sp.* strain 31-

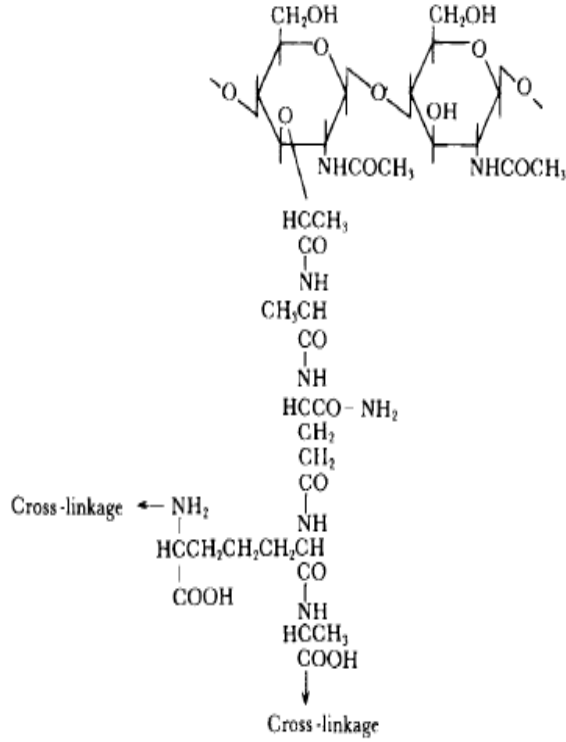
22'den α -galaktosidaz iç pH nötr civarı olduğunda 7.5 optimal katalitik pH değerine sahiptir. Ayrıca alkalifillerdeki hücreden bağımsız protein sentez sistemleri optimal olarak pH 8.2-8.5 değerlerinde aminoasitlerden protein oluşturur (Horikoshi, 2006).

İç pH değerini tahmin etmek için bir başka yöntem hücreler tarafından aktif taşınmayan zayıf bazların hücrelerin içindeki ve dışındaki dağılımını ölçmektir. İç pH değeri, 8-11 arasındaki yüksek dış pH değerlerine rağmen, pH 8 civarında tutulmaktadır. Bu yüzden alkalifilideki anahtar özelliklerden biri hücre içi nötral çevreyi hücre dışı alkalın çevreden ayırtan ve sürdüren hücre yüzeyi ile ilişkilidir (Horikoshi, 2006).

1.3.2. Hücre duvarları

Asidik polimerler: Alkalifilik *Bacillus* strainlerinin protoplastları alkalın ortamlarda stabilitelerini kaybettiğinde hücre duvarının hücreyi alkalın ortamlardan korumada önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Birkaç alkalifilik *Bacillus* spp. hücre duvarı ile nötrofilik *Bacillus subtilis* hücre duvarı karşılaştırılarak araştırmalar yapılmıştır. Alkalifilik *Bacillus* spp.'de peptidoglikana ilave olarak galakturonik asit, glukonik asit, glutamik asit, aspartik asit ve fosforik asit gibi asidik polimerler bulunmaktadır. Peptidoglikan olmayan asidik bileşenlerdeki negatif yükler hücre yüzeyine sodyum ve hidronyum iyonlarını adsorbe kabiliyeti ve hidroksit iyonlarını itme kabiliyeti kazandırabilmekte ve sonuçta hücrelerin alkalın ortamlarda büyümesine yardımcı olabilmektedir (Horikoshi, 2006).

Peptidoglikan: Alkalifilik *Bacillus* spp. peptidoglikanları *B. subtilis*' e benzer görünmektedir. Bununla birlikte kompozisyonu nötrofilik *B. subtilis* ile karşılaştırıldığında heksozminlerin ve aminoasitlerin fazlalığı ile karakterizedir. Hidrolizatlarda glukozamin, muramik asit, D- ve L- alanin, D- glutamik asit, mezo diaminopimelik asit ve asetik asit bulunmuştur. Alkalifilik *Bacillus* suşları peptidoglikanları arasında amid içeriğinde bazı farklılıklar bulunsa da yapıdaki farklılık nötrofilik *Bacillus* türlerinde bilinenlere benzerdir (Horikoshi, 2006).



Şekil 1.1. *Bacillus* türlerinde peptidoglikan

1.3.3. Na⁺ İyonları ve aktif taşıma

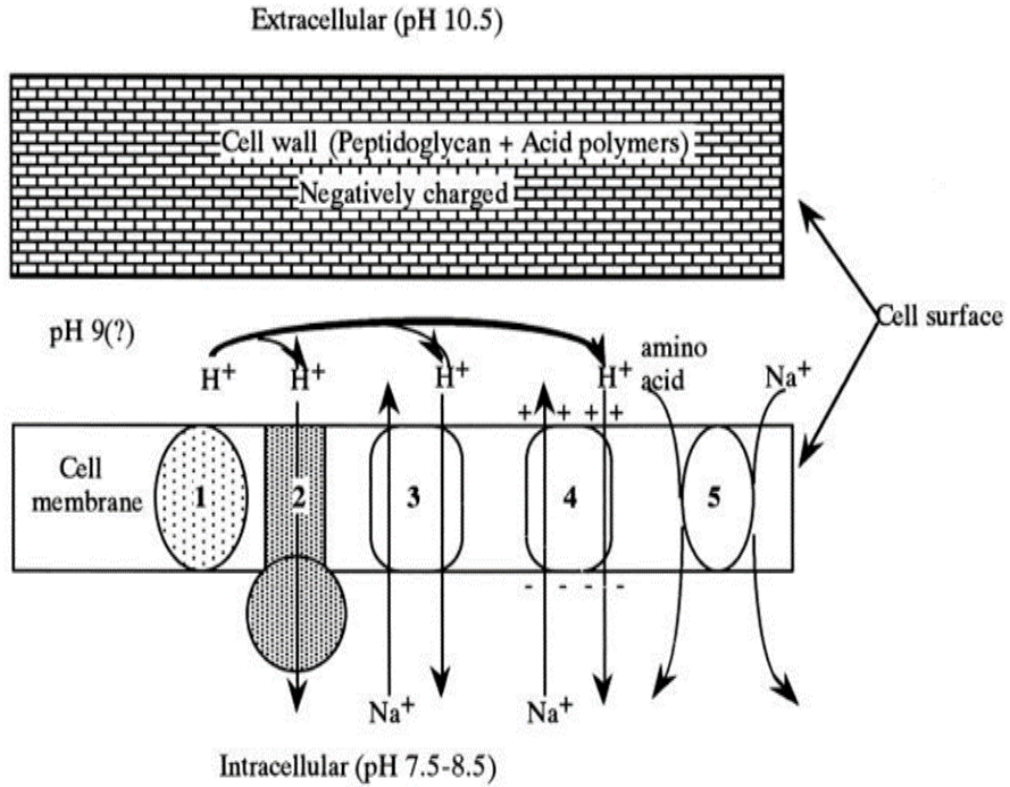
Alkalifilik mikroorganizmalar pH 9-11 civarında gelişim göstermektedirler ve gelişim için Na⁺ iyonlarına gereksinim duymaktadırlar. Çevredeki sodyum iyonlarının varlığı alkalifilik *Bacillus* spp. için membranlar yoluyla etkili çözünen taşınımı için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. Kemiozmotik teoriye göre hücrelerdeki proton itici kuvvet aktif transport zinciri ile veya ATPaz ile ATP metabolizmasından oluşan H⁺ ile oluşturulmaktadır. H⁺ daha sonra çeşitli substratların birlikte taşınımı ile hücrelerin içine yeniden birleştirilir. Na⁺ bağımlı taşıma sistemlerinde H⁺, Na⁺/H⁺ antiporter sistemleri tarafından Na⁺ ile değiştirilir. Böylece oluşan sodyum itici güç ile Na⁺ ile birlikte hücre içine substratlar da hareket eder. Bir test substratı olarak α -aminoizobütirat eklenmesi hücre dışı pH'ı 7'den 9' a kaydırarak 2 kat arttırmıştır ve sodyum iyonları varlığı birleşmeyi önemli derecede artırmıştır. 0.2 N NaCl varlığı yokluğuna oranla 20 kat daha optimum bir birleşme sağlamıştır. K⁺, Li⁺, NH₄⁺, Cs⁺, ve Rb⁺ gibi diğer kationlar ve onların karşı anyonları etki göstermemiştir (Horikoshi, 2006).

1.3.4. Sitoplazmik pH düzenlenmesinin mekanizması

Hücreler pH değerini 10.5' ten 8' e düşürmek için 2 bariyere sahiptir.

Asidik polimerler içeren hücre duvarları negatif yüklü bir matris olarak işlev görür ve hücre yüzeyindeki pH değerini azaltabilir. Plazma zarının yüzeyi muhtemelen pH 9 altında tutulmalıdır. Çünkü plazma membranı alkaline pH değerlerinde stabil değildir.

Plazma membranları pH dengesini aynı zamanda Na^+/H^+ antiporter sistemi, K^+/H^+ antiporter ve ATPaz bağımlı H^+ atılımı ile sağlayabilirler. Çeşitli laboratuvarlardaki önemli antiporterler ile ilgili son çalışmalar pH dengesinin aktif mekanizmasını sağlayan portlerin sayı ve özelliklerini aydınlatmaya başlamıştır (Horikoshi, 2006).



Şekil 1.2. Sitoplazmik pH düzenlenmesinin şematik gösterimi

1.4. Alkalifillerin Biyoteknolojik Önemi

1.4.1. Alkalın enzimler

Alkalın proteazlar: 1971 yılında, Horikoshi alkalifilik *Bacillus* sp. strain 221'de ekstraselüler bir alkalın serin proteazın üretimini bildirmiştir. Bu strain topraktan izole edilmiştir ve subtilisin grubundan farklı bir alkalın proteaz oldukça fazla miktarda üretilmiştir. Saflaştırılmış enzimin optimum pH değeri 11,5 olarak belirlenmiştir ve aktivitenin% 75'i pH 13.0 değerinde devam etmiştir. Daha sonra, iki *Bacillus* straininin (AB42 ve PB12) alkalın proteaz ürettiği bildirilmiştir. Bu strainler PB12 için 50°C ve AB42 için optimum olan 60°C sıcaklıkta geniş bir pH aralığı (pH 9.0-12.0) sergilemiştir. Bu raporlardan anlaşılacağı gibi pek çok alkalın proteaz alkalifilik mikroorganizmalardan izole edilmektedir.

Alkalifilik aktinomisetler tarafından üretilen birkaç alkalın proteaz rapor edilmiştir.

Ayrıca haloalkalifilik Archaea *Natronococcus occultus* kültüründe gelişimin durgun fazında ekstraselüler proteolitik aktivite belirlenmiştir.

Alkalifilik enzimlerin temel uygulama alanı deterjan endüstrisidir. Pek çok alkalın proteazlar alkalifilik *Bacillus* strainleri tarafından üretilmekte ve ticari olarak kullanılmaktadır. Alkalın enzimler dehairing işleminde kullanılmaktadır. Bu işlem pH 8-10 arasında gerçekleşmektedir. Ayrıca Fujiwara ve çalışma arkadaşları X-ray filmlerinden jelatinimsi kaplamayı ayrıştırmak için alkalın proteaz kullanımıyla ilgili bir çalışma bildirilmiştir (Horikoshi, 1999).

Nişasta degrade eden enzimler: İlk alkalın amilaz Horikoshi-II besiyerinde *Bacillus* sp. strain A-40-2 tarafından üretilmiştir. Şimdiye kadar nötrofilik mikroorganizmalarda alkalın amilaz üretime rastlanmamıştır. Ayrıca son zamanlarda *Pseudomonas* sp. KFCC 10818 straininden yeni amilolitik enzim için kodlama yapan bir gen klonlanmış ve nükleotid dizisi tespit edilmiştir. Haloalkalifilik *Natronococcus* sp. Ah-36 straini hücre dışı maltotrioz oluşturan amilaz üretmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar nişasta degrade eden enzimler α -amilaz ve siklomaltodekstrinin glukotferazın fonksiyonel ve yapısal olarak oldukça

benzer olduğunu ortaya çıkarmıştır. Nakamura ve Horikoshi siklomaltodekstrinin glukotransferaz üreten pekçok alkalifilik *Bacillus* straini saptamıştır.

1976 yılında, Nakamura ve ark. *Bacillus* sp. strain 202-1'in bir alkalın pullulanazını keşfetmiştir. Kelly ve arkadaşları *B. halodurans* A-59 (ATCC 21591)'un sıvı kültürde α -amilaz, pullulanaz ve glukotransferazı ürettiğini bulmuştur (Horikoshi, 2006).

Bazı gıda sanayilerinde, düşük sıcaklıklarda aktivite gösteren enzimler gıda işlemede kullanılmak üzere talep edilmektedir. Psikrotrofik bakterilerin bu enzimlerin potansiyel üreticileri olduğu düşünülmektedir. Kimura ve Horikoshi alkalipsikrotrofik strain, *Micrococcus* sp. strain 207' nin ekstraselüler olarak amilaz ve pullulanaz ürettiğini rapor etmiştir (Horikoshi, 1999).

Selülazlar: Piyasada bulunan selülazlar 4 ile 6 pH aralığında optimum faaliyet göstermektedir. Horikoshi ve çalışma arkadaşları ekstraselüler alkalın CMCazlar üreten bakteriyel izolatlar (*Bacillus* sp. strainleri N4 ve 1139) bulmuştur. *Bacillus* sp. strain N-4 (ATCC 21833) farklı pH aralıklarında (pH 5-10) aktivite gösteren çoklu CMCaz üretmiştir. *Bacillus* sp. strain 1139 pH 9'da aktivite gösteren tek bir CMCaz üretmiştir. Park ve arkadaşları ve Damude ve arkadaşları yarı alkalın selülaz üreten alkalifilik *Streptomyces* KSM-9 straini ile çalışmışlardır.

Alkalın selülaz keşfi çamaşır deterjanı katkı maddesi olarak selülazlara yeni bir endüstriyel uygulama alanı oluşturmuştur (Horikoshi, 1999).

Lipazlar: Pek çok alkalın lipazın aktivitesi alkilbenzen sülfat ya da dodesil benzen sülfonat varlığında önemli ölçüde inhibe edilmiştir. Watanabe ve arkadaşları (1977) toprak ve su örneklerinden alkali lipaz üreten mikroorganizmalar için geniş bir tarama yapmıştır. İki bakteriyel strain potansiyel alkali lipaz üretici olarak seçilmiştir. Bunlar *Pseudomonas nitroreducens* nov. subsp. *thermotolerans* ve *P. fragi* olarak tanımlanmıştır. İki lipazın da optimum pH değeri 9.5' tir.

Bushan ve arkadaşları (1994) katı faz fermentasyonundan alkalifilik *Candida* türlerinden bir lipaz üretildiğini bulmuştur. Bu mikroorganizmadan lipazın optimum pH' ı 8.5 ve sıcaklık optimumu 40 °C' dir (Horikoshi, 1999).

Ksilanazlar: Alkalifilik bakterilerden bir ksilanaz izolasyonunu açıklayan ilk çalışma Horikoshi ve Atsukawa tarafından 1973 yılında yayınlanmıştır. *Bacillus sp.* C-59-2 straininden saflaştırılan ksilanaz enzimi pH 6' dan 8' e değişen optimal pH sergilemiştir.4 termofilik alkalifilik *Bacillus* straini W1 [JCM2888], W2 [JCM2889], W3, ve W4 ksilanaz üretmiştir. W1 ve W3 strainlerinin enzim işlevi için optimum pH 6 ve W2 ve W4 strainleri için optimum pH 6 ve 7 arasında bulunmuştur.

Alkali-işlenmiş ahşap hamuru çevreye zarar veren klorin içeren kimyasal işlemler yerine biyolojik ksilanazlar tarafından ağartılabilmektedir. Bu konuda termostabil alkali ksilanazlar için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır ve daha sonraları jeotermal alanlardan izole edilmiştir ve çeşitli alkalifillerden pekçok termostabil alkalik ksilanazlar üretilmektedir (Horikoshi, 1999).

Pektinazlar: Alkalifilik *Bacillus sp.* strain P-4-N tarafından üretilen alkalik endopoligalakturonaz üzerine ilk yayım 1972 'de yapılmıştır. Pektik asit için enzim işlevi için optimum pH 10 olarak belirlenmiştir. Fogarty ve arkadaşları (1977) *Bacillus sp.* strain RK9 tarafından endopoligalakturonat liyaz rapor etmiştir. Asit-çözünür pektik asite karşı enzim aktivitesi için optimum pH değeri 10,0 olarak belirlenmiştir. Daha sonra alkali pektinazın potansiyel uygulamalarına ilişkin birçok makale yayınlanmıştır. Bu enzim kullanımı ile geleneksel metod ile üretilen kağıttan daha yüksek kaliteli, kağıt üretilebilmektedir. Pamuk liflerini yumuşaklaştırma ve yeni bir atık arıtımı geliştirmede kullanılabilirliği ile ilgili araştırmalar bulunmaktadır (Horikoshi,1999).

Kitinazlar: Tsujibo ve arkadaşları (1992) alkalifilik *Nocardiosis albus subsp. prasina* OPC-131'den kitinaz izole etmişlerdir. İzolat 2 tip kitinaz üretmiştir. Birinin optimum pH değeri 5 diğerinin ise 7 olarak tespit edilmiştir. Bhushan ve Hoondal (1998) alkalifilik, kitinaz üreten *Bacillus sp.* strain BG-11' i izole etmiştir. Saflaştırılmış kitinazın optimum pH değeri 7.5 ile 9 aralığında sıcaklık ise 45-55°C aralığında saptanmıştır. Enzim pH 6-9 arasında ve 50 °C sıcaklıkta 2 saatten fazla stabilite göstermiştir (Horikoshi,1999).

1.4.2. Alkalifiller tarafından üretilen metabolitler

2-Fenilamin: Hamasaki ve arkadaşları (1993) alkalifilik *Bacillus sp.* strain YN-2000 hücrelerinden oldukça fazla miktarda 2-fenil etilamin sentezlediğini saptamıştır. Bu amin hücre gelişimi boyunca besiyerinde sentezlenmiştir.

Karotenoidler: Aono ve Horikoshi (1991) alkalifilik *Bacillus sp.* strainleri A-40-2, 2B-2, 8-1 ve 57-1 hücrelerinin sarı pigment ürettiğini rapor etmiştir ve bunların triterpenoid karotenoidler olduğu saptanmıştır.

Sideroforlar: Gascoyne ve arkadaşları (1991) demir, galyum, alüminyum biriktiren siderofor üreten bakteri izole etmiştir.

Kolik asit türevleri: Kimura ve arkadaşları (1994) topraktan kolik asit içeren besiyerinde iyi gelişen bir alkalifilik *Bacillus* straini izole etmiştir. Kolik asitin 7- α ve 12- α hidroksil grupları 72 saat kültürasyon ile %100'e varan dönüşüm oranıyla keto gruplarına dönüşmüştür.

Organik asitler: Alkalifillerin kültürasyonu sırasında, kültür ortamının pH değeri organik asitlerin üretimiyle belirgin şekilde azalmaktadır. Paavilainen ve arkadaşları (1994) alkalifilik basiller tarafından üretilen organik asitlerin karşılaştırmalı analizini yapmışlardır. 4 basil, *Bacillus sp.* strain 38-2 (ATCC 21783), *B. alkalophilus* subsp. *halodurans* (ATCC 27557), *B. alcalophilus* (ATCC 27648), ve *Bacillus sp.* strain 17-1 (ATCC 31007), çeşitli %1'lik şekerlerin ve şeker alkoller gibi ilgili bileşenlerin varlığında kültive edilmiştir. Formik asit sadece bir strain tarafından üretilirken asetik asit tüm strainler tarafından üretilmiştir. İzobütirik, izovalerik, α -oksoizovalerik, α -okso-bmetilvalerik, α -oksoizokarpik, fenilasetik asitin orta miktarları üç alkalifil tarafından oluşturulmuştur (Horikoshi,1999).

Antibiyotikler ve enzim inhibitörleri: Alkalifiller yeniden keşfedildiğinden beri, birçok Japon ilaç firması antibiyotik üreten yeni mikroorganizmalar izole etmek için alkalın besiyeri kullanmayı denemiştir. Bazıları bulunmuş ve rapor edilmiş olmasına rağmen ticari olarak kullanımda değildir.

İlk rapor Sato ve arkadaşları tarafından 1980 yılında 1907 yılında alkalın besiyerinde topraktan izole edilen *Paecilomyces lilacinus*'ta rapor edilmiştir. Yeni antibiyotikler sadece alkalın koşullarda üretilmiştir.

Bahn ve arkadaşları (1998) alkalifilik *Corynebacterium* sp. strain YUA25-1'den yeni bir aldoz redüktaz inhibitörü YUA001'i izole etmiştir. YUA001'in moleküler formülü $C_{13}H_{19}NO_2$ olarak belirlenmiştir. Bileşik bazı gram negatif ve pozitif bakteriler, maya ve funguslara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip değildir.

Bu antibiyotiklerin dışında pek çok bileşik tespit edilmiş ve ilaç firmaları tarafından incelenmiştir. Ancak alkalifilik mikroorganizmalar tarafından antibiyotiklerin doğrudan üretiminde zayıf bir nokta vardır. Birçok antibiyotik alkalın koşullar altında kararsızdır ve üretilen antibiyotiğin kültürasyonu sırasında tahrip olması oldukça mümkündür. Bununla birlikte bazı alkalifiller özellikle aktinomisetler biyoaktif bileşiklerin iyileştirilmesi için bir strateji sunan, özel şartlar altında nötral besiyerinde gelişebilir (Horikoshi,1999).

1.5. Alkalın Çevreler

Alkalın çevreler alkalinitenin oluşma şekline bağlı olarak birkaç değişik kategoride yer alabilmektedir. Hepsi alkalın pH devamlılığını sağlamak için ve CO_2 'nin tamponlama etkisine karşı kimyasal veya mikrobiyal olarak sürekli bir prosese bağlıdır.

Amonifikasyon ve sülfat redüksiyonu gibi toprak mikrobiyal prosesleri nadiren de olsa pH 10 üzerinde stabil pH değerlerinin sürdürülmesine ortam oluşturmaktadır. Ancak bu tip alkalın ortamlar besin desteği kesilmedikçe sınırlanmış ve kısa süreli olabilmektedir. Çimento yapımı ($Ca(OH)_2$), madencilik işlemleri, kağıt ve kağıt hamuru üretimi (NaOH) ve yiyecek işleme gibi proseslerle insanların çeşitli endüstriyel aktiviteleri genellikle pH değeri 11'in üzerinde olan yüksek alkalın çevre örneklerini oluşturmaktadır. Silikat minerallerinin aşınması gibi doğal jeokimyasal işlemler pH 11 civarında alkalın su örnekleri oluşturabilmektedir. Alkalinitenin silikat dekompozisyonu tarafından oluşturulması muhtemel olan volkanik alanlarda ve alkalın sıcak havuzlarda pH değeri 9,5'a kadar rapor edilmiştir (Jones ve ark.1998).

Soda gölleri ve soda çölleri ise doğal olarak oluşan alkalın çevrelerdir. Bu tip çevreler dünyada en yüksek stabil pH' a sahip çevreleri temsil etmektedir. Karbonat minerallerinin oldukça fazla miktarda oluşu pH 11.5' ten büyük değerler

oluşturabilmektedir. Bu çevreler geniş ölçüde yayılmış olmasına rağmen, genellikle ulaşılması güç kıta iç kesimlerinde konumlanmışlardır. En çalışılmış soda gölü Doğu Afrika Rift Valley'dir (Jones ve ark.1998).

1.5.1. Soda gölünün oluşumu

Çok özel bölgeler de olsa soda gölleri, dünya çapında oluşur: bunların aktif tektonik ve volkanik bölgeler ile ilişkili olduğu görülmektedir. Pek çok bilinen soda gölü Doğu Afrika yarığı boyunca Doğu Afrika' da oluşmuştur. Alkali göllerin bir başka tanınmış grubu, örneğin Searles Gölü gibi bazıları fosil olan, batı ABD'de meydana gelmiştir. Daha az bilinen göller Avustralya, Afganistan, Türkiye ve dünyadaki diğer yerlerdeki göllerdir (Reitner ve Thiel, 2011).

Çizelge 1.2. Soda gölleri ve soda çöllerinin dünyadaki dağılışı

Kuzey Amerika	
Kanada	Manito Gölü
USA	Alkali Vadisi, Albert Gölü, Lenore Gölü, Sabun Gölü, Büyük Soda Gölü, Owens Gölü, Mono Gölü, Searles Gölü, Deep Springs, Rhodes, Marsh, Harney Gölü, Yaz Gölü, Sürpriz Vadisi, Piramit Gölü, Walker Gölü, Ragtown Soda Gölleri
Orta Amerika	
Meksika	Texcoco Gölü
Güney Amerika	
Venezuela	Langunilla Vadisi
Şili	Antofagasta
Avrupa	
Macaristan	Feher Gölü
Yugoslavya	Pecena Slatina
Rusya	Kulunda Bozkır, Tanatar Gölleri, Karakul, Araxes plain, Chita, Barnaul, Slavgerod
Asya	
Türkiye	Van Gölü, Salda Gölü
Hindistan	Lonar Gölü, Sambhar Gölü

Çizelge 1. 2. (Devamı) Soda gölleri ve soda çöllerinin dünyadaki dağılışı

Çin	Qinngai Hu, Sui-Yuan, Heilungkiang, Kirin, Jehol, Chahar, Shansi, Shensi, Kansu, Chahannor Gölü ; Zabuye Gölü; Bange Gölü; Baer Gölü; Wudunao Gölü; Hamatai Gölü
Afrika	
Libya	Fezzan Gölü
Mısır	Wadi Natrun
Etiyopya	Aranguadi Gölü, Kilotes Gölü, Abiata Gölü, Shala Gölü, Chilü Gölü, Hertale Gölü, Metahara Gölü
Sudan	Dariba gölleri
Kenya	Bogoria Gölü, Nakuru Gölü, Elmentieta Gölü, Magadi Gölü, Simbi Gölü, Sonachi Gölü
Tanzanya	Natron Gölü, Embagi Gölü, Magad Gölü, Manyara Gölü, Balangida Gölü, Bosotu Krater Gölleri, Kusare Gölü, Tulusia Gölü, El Kekhooito, Momela Gölleri, Lekandiro Gölü, Reshitani Gölü, Lgarya Gölü, Ndotu Gölü, Kuzey Rukwa Gölü
Uganda	Katwe Gölü, Mahega Gölü, Kikorongo Gölü, Nyamunuka Gölü, Munyanyange Gölü, Murumuli Gölü, Nunyampaka Gölü
Çad	Bodu Gölü, Rombou Gölü, Dijikare Gölü, Momboio Gölü, Yoan Gölü
Avustralya	
Avustralya	Corangamite Gölü, Kırmızı Kaya Gölü, Werowrap Gölü, Chidnup Gölü

1.5.2. Meydana geliş

Soda kazanımı olan göllerin iki farklı tipi görünmektedir. Büyük göllerin çoğu tektonik hareketler veya volkanik barajlar tarafından exorheik akış yönünde kapatılan endorheik bölgelerdeki çöküntülerdir. Dökülen alan ve göl yüzey alanı arasındaki oran büyüktür. Dünya üzerindeki en büyük sodalı göl Doğu Anadolu'daki Van Gölü'dür.

Soda göllerinin diğeri sınıfı volkanik kraterler veya kalderalarda oluşur. Bunların tipik olarak herhangi bir yan kolları yoktur ve beslenme alanı ve göl yüzey alanı arasındaki oran düşüktür (Reitner ve Thiel, 2011).

Çizelge 1.3. Van Gölü morfolometrik verileri

Toplam havza alanı	16.096 km ²
Toplam karışan alan	12.574 km ²
Göl yüzeyi	3.522 km ²
Göl hacmi	576 km ³
Maksimum derinlik	451 m
Yıllık su değişimi	3.78 km ³
Göl seviyesinin yüksekliği	1.648

1.5.3. Kimya

Alkalinite su veya herhangi bir solüsyondaki nötralizasyon kapasitesinin bir ölçüsüdür. Bu asit-nötralizasyon kapasitesinin ölçüsü suyun ani pH değişikliklerine karşı nasıl tamponlama yaptığını ifade etmektedir.

Soda gölleri 10.5 aşan pH ve > 150 meq / l arasında alkaliniteye ulaşabilirler. En alkaline su kütlelerinin bazıları Kenya'daki Magadi Gölü ve Kaliforniya'daki Mono Gölü'dür. Van Gölü 9.7 pH ve 151 meq / l arasında bir alkaliniteye sahiptir. Bunlar yüksek alkali göllerin örnekleridir (Reitner ve Thiel,2011).

Van Gölü ve Nemrut Gölü karşılaştırıldığında, iki göl tüm kendi yüzey ve dip örnekleri açısından çok farklı değildir, diğeri bir deyişle, bunlar nispeten iyi karıştırılmıştır. Herşeyden önce iletkenlik toplam çözünmüş tuzların kaba bir ölçüsünü verir. Toplam çözünmüş tuz oranları deniz suyunda yaklaşık 35 g/l, Van Gölü'nde 22 g/l civarında ve Nemrut Gölü'nde sadece 440 mg/l civarındadır. Bu

durumda Nemrut Gölü, bir "tatlı su" göl olarak sınıflandırılmış olacaktır. Fakat bu sadece kriterlerden bir tanesidir. Soda gölü kriteri hesaplanırken örneğin toplam alkalinite/ $Mg^{+} + Ca^{+}$ Van Gölü için 16.65 ve 16.85 (sırasıyla 0 ve 440 metre), Nemrut Gölü için 3.11 ve 3.18 (sırasıyla 10 ve 150 m) ve deniz suyu için 0.018 bulunmuştur. Bu oran bize Van Gölü'nün tipik bir soda gölü olduğunu göstermektedir. Fakat aynı zamanda deniz suyu çözülmüş karbonattan çok daha fazla Mg^{+} ve Ca^{+} iyonlarına sahipken Nemrut Gölü toprak alkali iyonlarından 3 kat daha yüksek alkaliniteye sahip olmasıyla bir soda gölüdür. Nemrut Kraterinin önemli ölçüde düşen pH' ı dışında her iki gölün kimyasal kompozisyonunun derinlikle değişmediği görülmüştür. Van Gölü, yüksek alkaliniteden dolayı beklendiği gibi çok yüksek bir pH değerine sahiptir. Ancak Nemrut Krater Gölü, deniz suyu ile aynı hafif alkali pH'ya sahiptir. Buradaki verilerden suyun CO_2 basıncı hesaplanmıştır (PHREEQE; Parkhurst et al.,1990 kullanılarak) ve 380 ppm olan atmosferinkiyle karşılaştırıldığında krater gölünün diğer örneklere göre daha çok daha yüksek PCO_2 değerine sahip olduğu bulunmuştur. Bu durum Van Gölü almazken Nemrut Gölü'nün yeraltı kaynaklarından volkanik CO_2 aldığını belirtmektedir (Reitner ve Thiel, 2011).

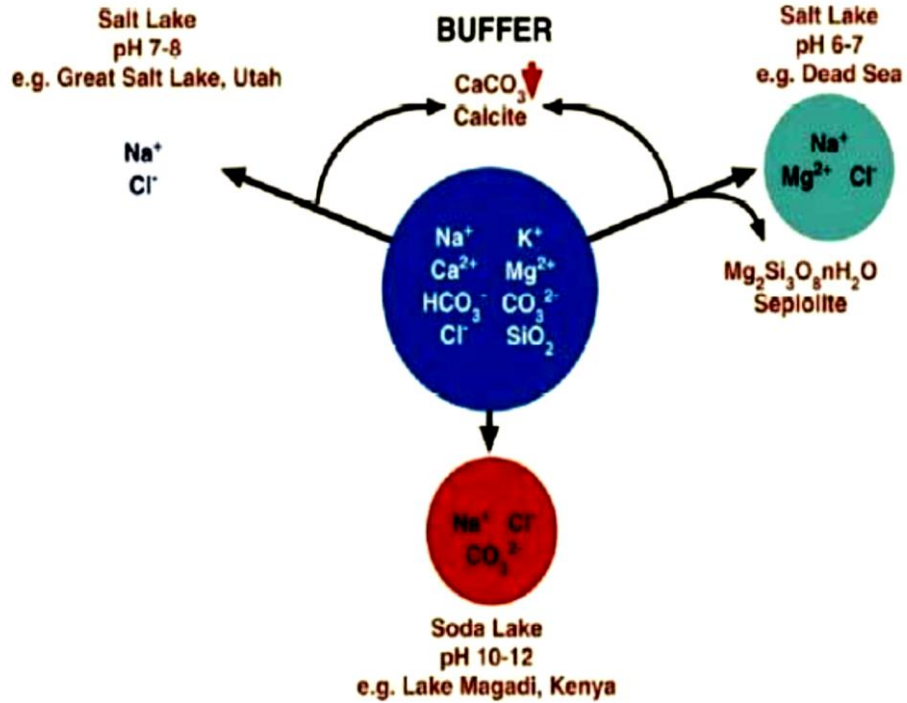
PHREEQE ayrıca mineral ile ilgili olarak su doyma durumunun hesaplanması için de olanak sağlamaktadır. Doyma endeksi (SI), iyon aktivite ürününün logaritmasının belirli bir mineralin sürekli çözünürlüğüne bölünmesi olarak tanımlanır. Örneğin; kalsit için

$$SI_{kalsit} = \log ([Ca^{+2}] * [CO_3^{-2}] / K_{kalsit})$$

Eğer su doymamışsa negatif bir SI değeri elde edilir, doymuş ise SI değeri 0 olarak bulunur ve eğer aşırı doymuşsa pozitif bir SI değeri elde edilir. Nemrut dışındaki tüm örnekler kalsit aragonit ve dolomit bakımından aşırı doygunluk göstermektedir. Van Gölü ve deniz suyu arasındaki temel fark karbonat aşırı doygunluğudur. Van Gölü'nde aragonit presipitasyonu olurken deniz suyu aşırı doymuş olmasına rağmen kendiliğinden birikim olmaz. Deniz suyununun aşırı doygunluğu organizmaların enzimatik biyomineralizasyonunun yoğunluğundan düşük tutulmasının aksine soda göllerinde yüksek alkaliniteden dolayı bu durum görülmez (Reitner ve Thiel,2011).

1.5.4. Soda göllerinin meydana gelişi

Burada bahsedilen veriler soda kimyasının çeşitli iklimsel, jeolojik ve morfolojik olarak ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Kimyası sudaki iyonların oranları ile ilişkilidir. Soda göllerinin durumunda, ölçüt $TA / (Mg + Ca)$ oranıdır. Plaka sınırları boyunca soda gölleri dağılımlarından açıktır ki bu oran muhtemelen taze volkanik kayaların olduğu alanlarda artış göstermektedir. Burada, biyojenik CO_2 ve / veya volkanik CO_2 , taze silikatlar ile reaksiyona girebilir ve gerekli oranlarda, Na, K, Mg ve Ca harekete geçirmektedir. Krater gölleri ve hidrotermal sistem içinde devam eden ayrışma veya terminal göllerde devam eden buharlaşma olgun soda gölü kimyası oluşumuna ve mikrobiolit gelişimini sağlayacak $SI=1$ civarında $CaCO_3$ aşırı doygunluğuna olanak tanıyacaktır. Bununla birlikte bu sadece geniş bir tablodur. Satonda ve Kauhako krater göllerine bakıldığında alkalinitenin yükselmesine sebep olan ikinci bir durum saptanmıştır. Bu sülfat redüksiyonudur (Reitner ve Thiel, 2011).



Şekil 1. 3. Alkalin ve tuz göllerinin oluşumunun şematik gösterimi

Çizelge:1.4. Van Gölü, Nemrut Gölü ve deniz suyunun kimyasal kompozisyonu

Göl/Derinlik	pH	PCO ₂ ppmv	Alkal. meq/l	Cl meq/l	SO ₄ meq/l	Na meq/l	Mg meq/l	Ca meq/l	Cond µS/cm	SI _{Cc}	SI _{Ara}	SI _{Dol}
Deniz suyu yüzeyi	8.24	363	2.33	546	56.6	468	106.2	20.6	ca. 48,000	0.59	0.44	1.96
Van 3 m	9.74	309	151.2	160	48.9	338	8.870	0.210	26,000	1.14	0.99	4.09
Van 440 m	9.88	257	155.6	166	50.9	348	9.06	0.174	26,700	1.06	0.91	3.81
Nemrut 10 m	8.27	1,240	4.61	0.43	0.22	3.67	0.52	0.96	456	0.37	0.22	0.43
Nemrut 150 m	6.89	28,600	4.77	0.45	0.25	3.80	0.53	0.97	469	-1.11	-1.27	-2.59

1.6. Dünyadaki Soda Gölleri

1.6.1. Turkana Gölü

Turkana Gölü ya da eski adıyla Rudolf Gölü, Afrika'nın doğusunda Büyük Rift Vadisinin üzerinde yer alan irili ufaklı birçok gölden birisidir. Kenya'nın kuzeybatısına düşer ve dünyanın en büyük kalıcı çöl gölü ile yine dünyanın en büyük alkalın gölüdür ([http://tr.wikipedia.org/wiki/Turkana_Gölü](http://tr.wikipedia.org/wiki/Turkana_G%C3%B6lü)).

312 kilometre uzunluğundaki Turkana Gölü, birkaç nehir tarafından beslenmektedir. Ancak dışarıya çıkışı olmayan gölün bugünkü su seviyesinin, uzun zaman önce bugünkünden yaklaşık 180 metre daha yukarıda olduğu tahmin edilmektedir. Kuzeybatı ucundaki, yine bugün tümüyle kurumuş olan bir kaynaktan suyu Nil'e çekilmiş olsa da, esas olarak iklimsel değişiklikler nedeniyle su seviyesinin düştüğü bilinmektedir.

Gölü çevreleyen volkanlardan yüzyıllar önce çok büyük miktarlarda püsküren kil ve lavın suyla yıkanması, bunun sonucunda da sodyum karbonat (deterjan olarak kullanılan soda) dahil, çeşitli mineral tuzların birikerek kalın bir tortu meydana getirmesi, Turkana'nın bir başka zenginliğini oluşturur (<http://www.dunyaharikalari.com/afrikada/turkana-golu>).

1.6.2. Mono Gölü

Mono Gölü Kuzey Amerika'nın Kaliforniya eyaletinde yer alan hipersalin, alkalın bir göldür. Bu gölün pH değeri 9.8, tuzluluk oranı ise 84-94 g/l'dir. Mono Gölü'nün anoksik alt katmanı yüksek pH'lı toksik inorganik bileşikler olan sülfür ve amonyum biriktirir ve bu koşullar gölde bulunan mikroorganizmaların aktivitelerini ve ekolojilerini etkilemektedir. Mono Gölü suyunda mevcut Na^+ oranı 29.5 g/l, K^+ oranı 1.5 g/l, Cl^- oranı 17.6 g/l, $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$ oranı 30.1 g/l'dir (Humayoun ve ark., 2003).

Mono Gölü'nde yüksek arsenik konsantrasyon varlığı belirlenmiş ve bu konsantrasyona dayanıklı iki yeni *Bacillus* türü olan *Bacillus arsenicoselenatis* ve

Bacillus selenitireducens izole edilmiştir. Moleküler kültür bağımsız çalışmalar ile birlikte gölde nitrifiye edici bakterilerin varlığı tespit edilmiştir (Oren 2002a).

1.6.3. Wadi Natrun Gölü

Wadi Natrun Gölü Mısır' da yer almaktadır, Nil nehrinden beslenen, deniz seviyesinden 23 metre aşağıda yer alan alkali bir göldür. Gölün pH değeri 11' dir.

Sodyum, potasyum gibi elementler gölün temel katyonları iken magnezyum, kalsiyum gibi divalent katyonların oranı yüksek pH' da çözünme problemi nedeniyle çok düşüktür (Oren, 2002a).

Wadi Natrun Gölü ötrofik bir sistemdir. İnorganik ve organik bileşikleri oldukça yüksektir. Fosfat konsantrasyonu 116-6830 μM , nitrat konsantrasyonu 53-237 μM , amonyum konsantrasyonu 2-461 μM ve çözülmüş organik karbon konsantrasyonu ise 136-1552 μM ' dır (Oren, 2002a).

1.6.4. Büyük Soda Gölü

Büyük Soda Gölü Nevada Fallon yakınlarında yer almaktadır. Dar littoral zon ve dik bir alt yamaca sahip olan kapalı havza krateri kaplamaktadır. Yüzey alanı 1.6 km^2 ' dir. Ortalama derinlik 26 metredir ve gölün merkezine yakın maksimum derinlik ise 65 metredir. Yüzey tabakasındaki tuzluluğu 26g/l, pH ise 9.7' dir (Oremland ve ark., 1988).

Bu göl meromiktiktir. Kemoklin yaklaşık 40 metrededir. Hem özel iletkenlik hem de tuzluluk değerleri yansıtmaktadır. Kemoklinin altında bir redox gradienti oluşmaktadır (Bywaters ve ark., 2010).

1.6.5. Lonar Gölü

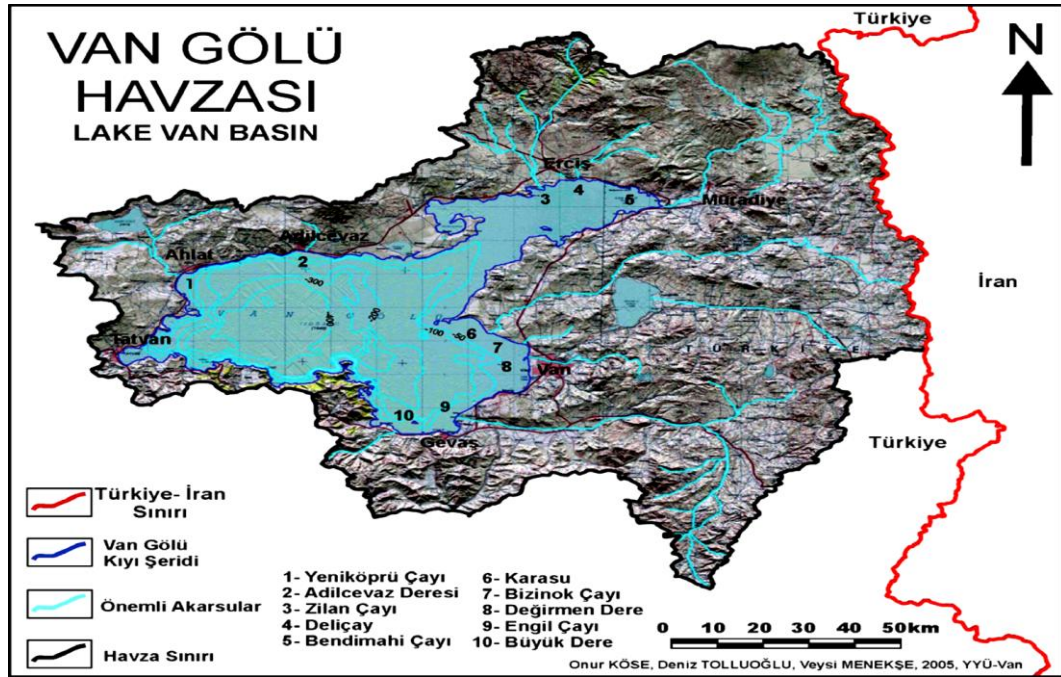
Hindistan' daki alkalın Lonar Gölü benzersiz bir ekosistemdir ve bazaltik kayaç üzerinde meteorit etkisiyle oluşmasıyla dünyada merak uyandırmaktadır. En uzun çapı ölçüsü 1875 metre ve en kısa çap ölçüsü 1787 metre olan hemen hemen daire şeklinde bir oluşumdur. Derinliği 135 metredir.

pH değeri 10-10.5 arasındadır. Yüksek alkalinite sodyum karbonatın yüksek konsantrasyonundan ileri gelmektedir (Kanekar ve ark., 2008).

1.7. Van Gölü

1649 metre yükseklikte yer alan Van Gölü' nün, Muş–Van Depresyonu' nun ortasında Kuaterner' de Nemrut Dağı' nın püskürmeleri sonucunda meydana gelen Nemrut lav seti ile bu depresyonların birbirinden ayrılması ve volkanik setin ardında suların birikmesiyle oluştuğu kabul edilmektedir (Erinç 1953).

Van Gölü, 3713 km²' lik alanı ile Türkiye' nin en büyük gölü olması özelliğini taşımasının yanı sıra aynı zamanda yeryüzündeki en büyük soda gölüdür. Kapalı göller arasında da hacim bakımından (607 km³) dördüncü sırayı almaktadır. Van Gölü' nün güneybatı ucundaki Tatvan koyu ile kuzeydoğu ucundaki Erciş körfezi arasındaki uzun eksen 130 km, kuzeybatıdaki Ahlat koyu ile güneydoğudaki Gevaş koyu arasındaki eksen ise 80 km kadardır. Gölün kenarındaki en alçak yer Reşadiye doğusunda bulunmaktadır ve 1800 m yüksekliğindedir. Gölün doğu kısmı batı kısmına göre daha sığdır. En sığ kısmı Van koyu ile Erciş körfezidir. Derinlik bu kesimlerde 50 m civarındadır. Ahlat ile Adilcevaz arasında ise 450 m derinlik ölçülmüştür (Çiftçi ve ark. , 2008).



Şekil 1.4. Van Gölü Havza Sınırları ve ana akarsular (Köse, ve ark., 2005'ten).

Zamansal açıdan bakıldığında Van Gölü'nde üç tür seviye değişiminin olduğu ortaya çıkmaktadır. Bunlar; mevsimsel seviye değişimleri, yıllar arasında görülen seviye değişimleri ve uzun yıllık seviye değişimleri olarak belirtilebilmektedir. Mevsimsel seviye değişimleri, bütünüyle yağış ve sıcaklığın yıl içerisindeki durumunun kontrolünde gelişmektedir.

Havzada göle boşalan akarsular karlı-yağmurlu bir rejime sahip olup, maksimum yağış ilkbaharda minimum yağış ise yaz mevsiminde düşmektedir. Kış aylarında yağışın çoğunlukla kar şeklinde olması ve akışa geçerek göle ulaşmaması nedeniyle göl seviyesinde fazla bir değişiklik olmaz. İlkbahardan itibaren bir taraftan yağışların artması, diğer taraftan sıcaklıkların artmasına bağlı olarak havzadaki kar erimelerinin artması seviyede hızlı bir yükselmeye neden olmaktadır (Yıldız ve Deniz, 2005).

Genel olarak, Van Gölü'nde Nisan-Mayıs devresindeki hızlı yükselmeyi Temmuz-Kasım devresindeki alçalma takip etmektedir. En yüksek seviyeye çoğunlukla 10-25 Haziran tarihleri, en düşük seviyeye ise 25 Eylül-25 Aralık tarihleri arasında ulaşmaktadır. Göldeki seviyenin maksimuma erişmesi bazı yıllarda Ağustos ayına sarmaktadır. Haziran ayından itibaren yağışların kesilmesi ve kar erimelerinin sona ermesi ile birlikte sıcaklıkların ve buharlaşmanın da artması göl seviyesinde düşüşlere neden olmaktadır. Gölün su seviyesinde gözlenen dikkat çekici bir değişim de farklı periyotlar içerisinde meydana gelen iniş ve çıkışlardır. Örneğin 1944-1949 yılları arasında göl seviyesi yüksek, 1960-1967 arası düşük, 1968-1974 arası yüksek, 1975-1987 arasındaki uzun dönemde düşük, 1988-1995 yılları arasında ise yine yüksek bir periyodun gerçekleştiği görülür. Bu tür değişimlerin büyük ölçüde yağış, sıcaklık ve buharlaşmanın kontrolünde geliştiğini söylemek mümkündür. Genel olarak, ortalamanın üzerinde yağışın düştüğü ve buharlaşmanın az olduğu yıllarda seviye yükselmekte, yağışın az buharlaşmanın fazla olduğu yıllarda ise seviye alçalmaktadır (Yıldız ve Deniz, 2005).

Gölde bazı dönemlerde önemli ölçüde düşüşler veya yükselmeler görüldüğü de, 56 yıllık (1944-2000 yılları arası) ortalamalara göre yükselme miktarı ile düşme miktarı arasında yükselme yönünde her yıl 3.7 cm lik bir fark oluşmaktadır. Yine yıllık ekstremelere bakıldığında en fazla yükselmenin 1988

yılında (102 cm), en az yükselmenin ise 1961 yılında (18 cm) gerçekleştiği görülür.

Uzun yıllık değişimler açısından incelenecek olursa, gerek 1944 yılından itibaren gölde yapılan seviye ölçümlerinden, gerekse tarihi devirler içindeki seviye değişmelerine bağlı olarak bazı yerleşmelerin yer değiştirmesinden ve kıyılarda yer alan eski tapulu arazilerin bir kısmının bugün sular altında kalmasından gölün, uzun sürede yavaş fakat sürekli bir yükselme eğilimi içinde olduğu görülebilir. Bu konudaki en önemli kanıtlardan biri de, Çarpanak Adası'dır. Burası 19. yüzyılın ortalarına kadar bir yarımada iken, 1860'larda meydana gelen seviye yükselmesi sonucunda kıyı ile bağlantısı ile kesilerek ada haline gelmiştir (Yıldız ve Deniz, 2005).

Göl seviyesinin yüksek ve rüzgarların etkin olduğu dönemlerde dalga aşındırması da artmaktadır. Dolayısıyla, dalga aşındırmasına bağlı olarak da göl kıyılarında önemli değişimler meydana gelmektedir. Özellikle göl kıyısında aşınmaya karşı dirençsiz, gölsel depoların bulunduğu falezli alanlarda şiddetli bir dalga aşındırmasının sonucu olarak kıyı gerilemesi görülmektedir (Yıldız ve Deniz, 2005).

Seviye yükselmesinde iklimden ayrı etkili olan bir başka bir faktör ise, göle boşalan akarsular ve onun taşıdığı sedimentlerdir. Ayrıca dalga aşındırması sonucu çevredeki gevşek depoların göle karışması da, seviye değişiminde rol oynayan diğer bir faktördür.

Diğer taraftan, Van Gölü havzasının son derece zayıf bir bitki örtüsüne sahip olması, erozyonun şiddetini arttırmakta, dolayısıyla göle boşalan akarsuların bol miktarda sediment taşımaya neden olmaktadır (Yıldız ve Deniz, 2005).

Van Gölü'nün suyu acı, tuzlu ve sodalıdır. Bunun başlıca nedeni, akarsuların taşıdığı tuzlu suların gölde birikmesi ve buharlaşma nedeniyle yoğunlaşmasıdır. Tuz tenörünün yüksek olması, bor ve sodyum karbonatın varlığı, volkanik kayaçların yaygınlığından kaynaklanır. Tuzluluk oranı %0.224'dür. Sudaki tuz bileşenlerinin kendi aralarındaki oranları ise; % 42 NaCl, % 34 NaCO₃, %16 Na₂SO₄, %3 KSO₄ ve %2.5 MgCO₃ şeklindedir. Bu özelliği ile göl, soda üretim kaynağı olarak da büyük bir potansiyele sahiptir (Çiftçi ve ark., 2008).

Çizelge 1.5. Van Gölü suyunda çözülmüş halde bulunan anyon ve katyonlar

Bileşenler	Van Gölü Suyundaki oranı (mg/l)
Sodyum (Na)	7747
Magnezyum (Mg)	94.8
Lityum (Li)	1.5
Stronsiyum (Sr)	0.7
Karbonat (CO ₃)	3331
Bikarbonat (HCO ₃)	2191
Fosfat (P)	0.52
Potasyum (K)	508
Kalsiyum (Ca)	5 – 10
Klor (Cl)	5450
Sülfat (SO ₄)	2344

Van Gölü' nün kuzey, güney ve batısını yüksek dağlar, doğusunu ise platoluk alanlar çevrelemiştir. Haliyle, kuzey, güney ve batıdan göle boşalan akarsular kısa, doğu ve kuzey doğudan boşalanlar ise nispeten daha uzun boyludur. Aynı nedenle, tarım ve yerleşmeye müsait geniş kıyı düzlükleri de gölün doğu ve kuzeydoğu kıyılarında yer almaktadır ve seviye yükselmelerinden en fazla zarar gören yerler de bu alanlardır (Yıldız ve Deniz, 2005).

Van Gölü, denizler gibi su seviyesi alçalıp yükselen, dolayısıyla geçmiş iklim değişikliklerinin kayıtlarını tutan arşiv niteliğinde olması nedeniyle, Nemrut Volkanı ile birlikte ülkemizin önemli Jeopark alanı olma özelliğini taşımaktadır. Van Gölü ve çevresinin jeolojik oluşumu kadar insan yerleşimi ile ortaya çıkan kültürel mirasları da oldukça ilgi çekicidir. Van Gölü havzası yerleşim açısından uygun koşulları oluşturmuş ve birçok medeniyete ev sahipliği yapmıştır.

Eski Yunan coğrafyacıları tarafından 'Thospitis Lacus' ya da 'Arsissa Lacus' olarak anılan Van Gölü, modern zamanlardaki ismini, sınırlarına dahil olduğu Van ilinden almıştır (http://www.jmo.org.tr/resimler/ekler/a529a33d_cc02eb3_ek.pdf?dergi=HABER%20B%DCLTEN%DD).



Şekil 1.5. Van Gölü Lokalizasyonu (earth.google.com)



Şekil 1.6. Van Gölü uydu görüntüsü (earth.google.com)

1.8. Ribozomal RNA

Ribozomlar yaşayan organizmalar için protein sentez makineleridir ve yaşam için gereklidir. Bir bakteriyel ribozom çoklu ribozomal proteinler ve 23 S rRNA, 16 S rRNA, ve 5 S rRNA olmak üzere 3 ribozomal RNA' dan oluşmaktadır. rRNA, ilgili genler tarafından kodlanır, genellikle genomda rrm olarak adlandırılan bir operon şeklinde düzenlenmiştir. Bir bakteriyel genomun büyüklüğüne ve türe bağlı olarak çoklu rrm operonlarına sahip olabilir.

Woese ve arkadaşları öncülüğünde rRNA dizilerinin karşılaştırılması mikroorganizmaların evrimsel analizlerinde kullanılmaya başlamıştır. rRNA dizi karşılaştırmalarının bir avantajı yeni belirlenen dizilerin karşılaştırılabileceği, giderek genişleyen veritabanının oluşumudur. İlk olarak, diziler filogenetik araştırmalar için saf kültürlerden elde edilmiştir. Pace ve arkadaşları veri tabanının sadece saf kültürlerden elde edilen dizilerin karşılaştırması için değil laboratuvarında temsilci üyeleri geliştirmeye gerek kalmadan doğal mikrobiyal topluluklardan doğrudan elde edilen dizilerin karşılaştırılmasında da kullanılabileceğini belirlemiştir. Mikrobiyal komünitelerden gen dizilerinin karşılaştırılması kavramı mikrobiyal ekolojide devrim yapmıştır. Bakteriyel kökenli primer hat ayrımı erken biyotik dönemde meydana gelmiştir. Bu yüzden oldukça korunmuş moleküler kronometreler bakteriyel filogeniyi oluşturmak için uygundur. Ribozomal RNA 'lar protein sentez mekanizmasının ayrılmaz elementleridir, temel bileşenler tüm alemlerde bulunmaktadır ve oldukça korunmuş moleküllerdir (Devereux ve Wilkinson, 2004).

rRNA dizileri ve özellikle 16S rRNA bakteriyel evrim ve ekoloji, filogenetik ilişkilerin belirlenmesi, çevredeki bakteriyel çeşitliliğin belirlenmesi ve taksonların bolluklarının saptanması çalışmalarının önemli basamağını oluşturmaktadır. 16S rRNA çeşitli nedenlerle bu amaçlar için uygundur. Gen evrensel olarak dağılmıştır, uzak taksonlar arasındaki filogenetik ilişkilerin analizine izin vermektedir. Çekirdek gen kümesinin işlevsel vazgeçilmez bir parçası olarak, 16S rRNA geninin yatay gen transferinden zayıf olarak etkilenebileceği beklenmektedir. Bu filogenetik çalışmalar için kullanımını desteklemektedir. Buna rağmen 16S rRNA özellikle bazı değişken bölgelerde hala

varyasyona tabidir. Değişken bölgelerin varlığı sınıflandırma için bir araç sağlamaya yeterli çeşitlilik sağlarken korunmuş bölgelerin varlığı uygun PCR primerleri ve hibridizasyon problemlerinin etkin tasarımına olanak tanımaktadır.

16S rRNA yaygın kullanılmasına rağmen, 16S rRNA'dan türetilmiş sonuçların yorumlanmasını sınırlayan birkaç husus vardır. En önemlisi genom başına düşen kopya sayılarının 1 den 15'e kadar veya daha fazla olmasıdır. Kopya sayıları bir ölçüde taksona özel gibi görünmektedir fakat ama aynı türün suşları arasında da varyasyon kaydedilmiştir. Bazı taksonların rRNA kopya sayısı uygun büyüme şartlarında cevap yetenekleri ile bağlantılı olduğundan rRNA kopya sayıları bakterilerin yaşam stratejisi bağlamında konulmuştur. Düşük kopya sayılı taksonlar daha oligotrofik olarak kabul edilmiştir.

Bir organizma içinde rRNA genlerinin kopyaları gen dönüşüm yoluyla homojenizasyona tabi olduğu varsayılmaktadır.

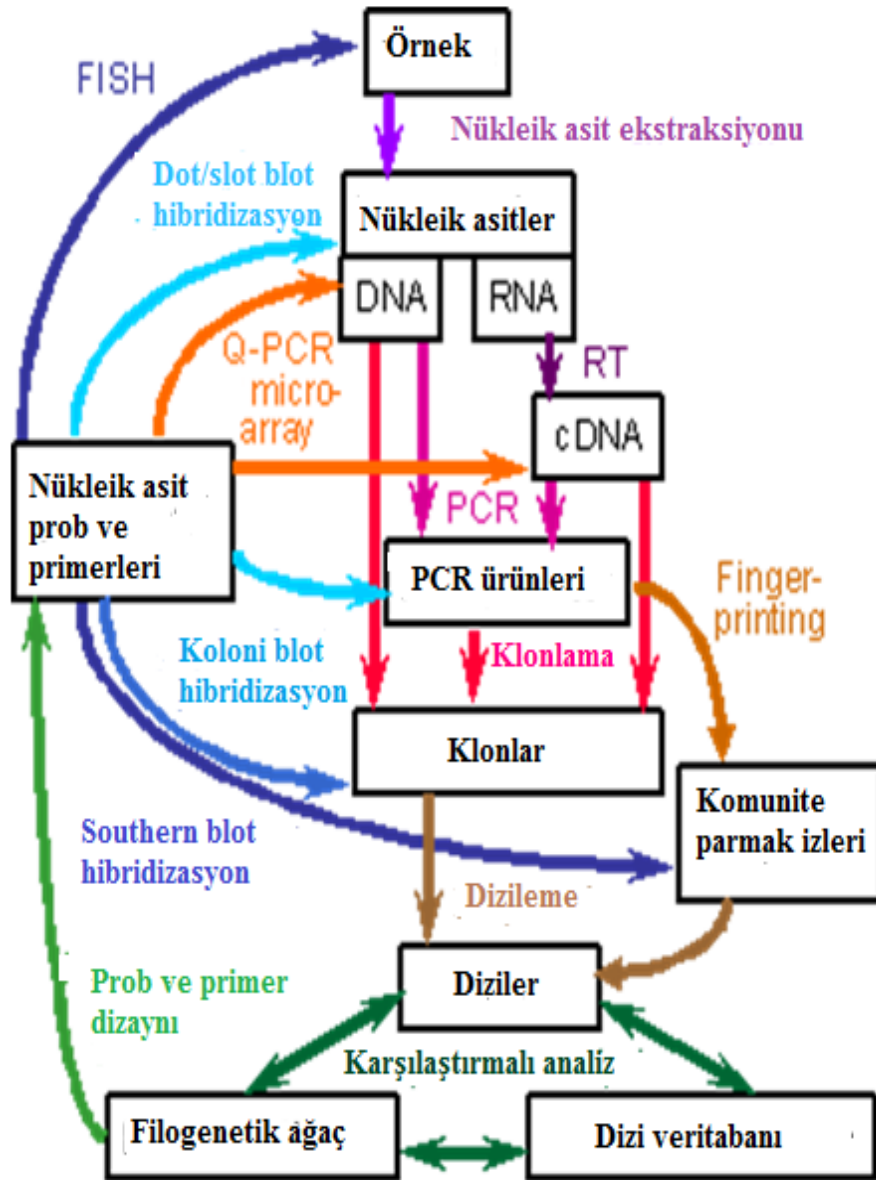
Bununla birlikte, aynı türden hatta aynı genomun 16S dizileri genellikle farklıdır. Sonuç olarak, 16S rRNA varyantlarının miktarı bakteri türlerinin sayısının yaklaşık 2,5 kat daha fazla olduğu tahmin edilmiştir ve bazı bakteriyel taksonlarda son derece farklı 16S rRNA dizileri gözlenmiştir. 16S rRNA dizilerinin daha büyük bir değişkenlik termofilik bakterilerde saptanmıştır. Bu özel durumda, yatay gen transferinin yüksek oranda potansiyel neden olduğu ileri sürülmüştür (Vetrovsky ve Baldrian, 2013).

1.9. Mikrobiyal kommunité analizleri

Doğadaki mikrobiyal çeşitlilik bilgilerimiz kültür bağımlı yöntemler olan mikroskopi ve kültüre alma yöntemlerinin mikroorganizmaların tanımlanması ve sınıflandırmasını sınırlandırdığından oldukça eksik ve yetersiz kalmaktadır. Mikroorganizmaları morfolojilerine, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre sınıflandırmak oldukça zordur. Çünkü doğadaki mikroorganizmaların çok büyük bir bölümü saf kültür olarak izole edilememektedir. Bu sebepten dolayı moleküler temelli yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Mikrobiyal çeşitliliği keşfetme çalışmalarında en güçlü teknikler klonlama ve 16S rRNA dizilenmesidir. Hibridizasyon teknikleri ise spesifik oligonükleotid problemler kullanımı

gerektirmektedir. Bu problemler çok spesifik grupları veya çok genel populasyonları hedef alabilmektedir (Muyzer, 1999a).

DGGE ile kompleks çevrelerde populasyonların varlığı ve fonksiyonu belirlenebilmektedir. Takson spesifik problemler ile hibridizasyon analizi gerçekleştirilebilir. Ayrıca jellerden bantların kesimini takiben dizileme veya saf kültürlerin izolasyonu ile dizileme işlemleri ile komünite hakkında bilgiler edinilebilmektedir (Muyzer ve Smalla 1998).



Şekil 1.7. Kültür bağımlı ve kültür bağımsız moleküler çalışmalarda izlenecek yol

1.9.1. DGGE(Denatüre edici gradient jel elektroforezi)

Genetik parmak izi teknikleri (genetik fingerprinting) mikrobiyal komünitedeki genetik çeşitliliğin bir profilini veya patternini sergilemektedir. Mikrobiyal ekolojide oldukça uzun süredir kullanılmakta olan parmak izi tekniklerinden bir tanesi çevresel örneklerden ekstrakte edilmiş düşük molekül ağırlıklı rRNA moleküllerinin (5S rRNA ve tRNA) yüksek çözünürlüklü poliakrilamid jellerde elektroforetik ayırımıdır. Daha sonra ise diğer genetik parmak izi tekniği PCR ile çoğaltılmış ribozomal DNA fragmentlerinin denatüre edici jel elektroforezi mikrobiyal ekolojiye tanıtılmıştır (Muyzer ve Smalla 1998).

DGGE orijinal olarak 1980'li yıllarda nokta mutasyonlarını tespit etmek amacıyla geliştirilmiştir. Mikrobiyal komünitelerin analizlerinde ilk kullanımı ise 1990 başlarında olmuştur (Muyzer ve ark.1993).

Teknik aynı veya benzer uzunlukta olan fakat farklı dizilere sahip DNA fragmentlerini doğrusal olarak azalan bir denatürant gradientinde elektroforez ile ayırır. DNA denatürantları üre ve formamid karışımıdır. Denatüre edici gradientte DNA fragmentleri elektriksel alanın etkisi altında göç eder. Fragment gradientte melting pozisyonuna ulaştığında fragmentin hareketi hızlıca yavaşlar. Fragmentlerin denatürasyonu “melting domains” denilen ayırımı gerçekleştirir. Melting domains identik denatürasyon sıcaklığında baz çiftlerinin açılmasıdır. En düşük denatürasyon sıcaklığına sahip “melting domain” kendi denatürasyon sıcaklığına (T_m) ulaştığında helikal yapı kısmen denatüre moleküle dönüşür ve göç olayı durur. Domainlerdeki dizi farklılıkları denatürasyon sıcaklıklarının farklı olmasına sebep olmaktadır. Fragmentlerin dizi farklılıkları sayesinde denatüre edici gradient jellerde farklı pozisyonlarda göç olayı sonlanmaktadır. Bu sayede bunların ayırımları DGGE ile çok etkili bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir.

DNA fragmentlerinin ayırımında elektroforezin süresi ve optimum gradientin belirlenmesi oldukça önemlidir. Elektroforezin optimum süresini belirlemek için paralel gradient elektroforezler kullanılırken, optimum gradienti belirlemek için ise dikey gradient jeller kullanılmaktadır. Paralel gradient jellerde

denatürant alttan üste doğru artmaktadır. Dikey jeller denatürantın elektroforez boyunca soldan sağa doğru arttığı bir sistemdir (Muyzer ve Smalla 1998).

DGGE tekniğinde, fragmentin tamamen denatürasyonunu önlemek için PCR' da primerlerden birinin 5' ucuna GC kelepçe yani GC zengin dizi eklenmiştir. GC zengin kelepçeler genellikle 20-40 bazdan oluşmaktadır. En çok kullanılan GC kelepçelerden birisi Muyzer ve arkadaşları tarafından oluşturulandır: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3'. Bu kelepçe pek çok uygulama için uygundur. Bununla birlikte birkaç tane daha GC kelepçe vardır. Bu kelepçeler melting özellikleri açısından farklılık göstermektedir ve bu yüzden özel şartlar için uygundur (Muyzer ve ark. 2004). Alternatif GC kelepçeleri olarak adlandırılan kimyasal kelepçelerde mevcuttur ve psoralane gibi fotoaktif bileşikler primerin 5'sonuna her iki DNA ipliğine kovalent olarak bağlanır. Kimyasal GC kelepçesi her iki primerinde aynı uzunluğa sahip olmasını sağladığından dolayı bir avantajı olsa bile DGGE bantlarının yeniden çoğaltım aşamasında direk olarak bantların kullanılamaması dezavantajıdır (Muyzer ve Smalla 1998).

DGGE'de DNA bantlarını görüntülemek için etidyum bromid ve SYBR Green I kullanılmaktadır. SYBR Green'in etidyum bromid göre avantajı arka plan boyamasının olmamasıdır. Gümüş boyama ise SYBR Green I'e göre daha hassastır (Muyzer ve Smalla 1998).

DGGE yöntemi kültürlerin zenginleştirme ve izolasyonlarının incelenmesi, rRNA operon mikroheterojenitelerinin belirlenmesi, farklı DNA ekstraksiyon protokollerinin karşılaştırılması, PCR ve klonlamadaki hataları belirlemek, klon kütüphanelerinin taranması, komüniteyi profillendirmek, mikrobial komüniteler içerisindeki populasyon dinamiklerini çalışmalarında kullanılmaktadır.

DGGE yönteminin kullanılabilirliğinin yanında sınırlamaları da bulunmaktadır. Sınırlamalardan bir tanesi sadece 500 baz çifti kadar küçük fragmentleri ayırabilmesidir. Ayrıca dizi çeşitliliğine rağmen DNA fragmentlerinin ayrımı her zaman mümkün olmamaktadır. Çünkü DNA fragmentleri arasında benzer melting noktasına sahip diziler olabilmektedir. Bazı bakterilerin genomlarında çoklu gen kopyalarının varlığı 16 S rRNA' da dizi heterojeniteleri oluşturmaktadır. Ayrıca çok sayıda farklı bakteriyel populasyon

içeren habitatlardan elde edilen DNA patternleri bir smear görüntüsü oluşturabilmektedir (Muyzer ve ark. 2004).

16 S rRNA 'nın farklı bölgelerinin kullanılması ve farklı DGGE koşulları ayırmda farklı çözünürlüklerde sonuçlanabilmektedir. DNA fragmentlerinin birlikte göçü bantlardan temiz diziler elde edilmesinde problem yaratmaktadır (Muyzer ve Smalla 1998).

1.9.2. Floresan in situ hibridizasyon (FISH)

Homolog nükleik asit dizileri, özellikle ribozomal RNA (rRNA) molekülleri ve kodlayan genlerin, karşılaştırmalı analizi mikrobiyal sistematige bakış açısını değiştirmiştir. Dizi bilgisinin geniş veri tabaları mevcuttur ve bugün rRNA gen fragmentleri kültüre almaksızın elde edilmektedir. Filogenetik boyama olarak ilk uygulama 1989'da gerçekleştirilmiştir ve o tarihten bu yana floresan etiketli rRNA hedefli oligonükleotid proplar bireysel bakteri hücrelerinin doğrudan, kültür-bağımsız tanımlanmaları için ortak bir araç haline gelmiştir.

Tipik FISH protokolü 4 basamaktır: örneğin fiksasyonu ve permeabilizasyonu, hibridizasyon, bağlanmamış propların uzaklaştırılması için yıkama ve etiketli hücrelerin mikroskopi veya flowsitometri ile tespiti.

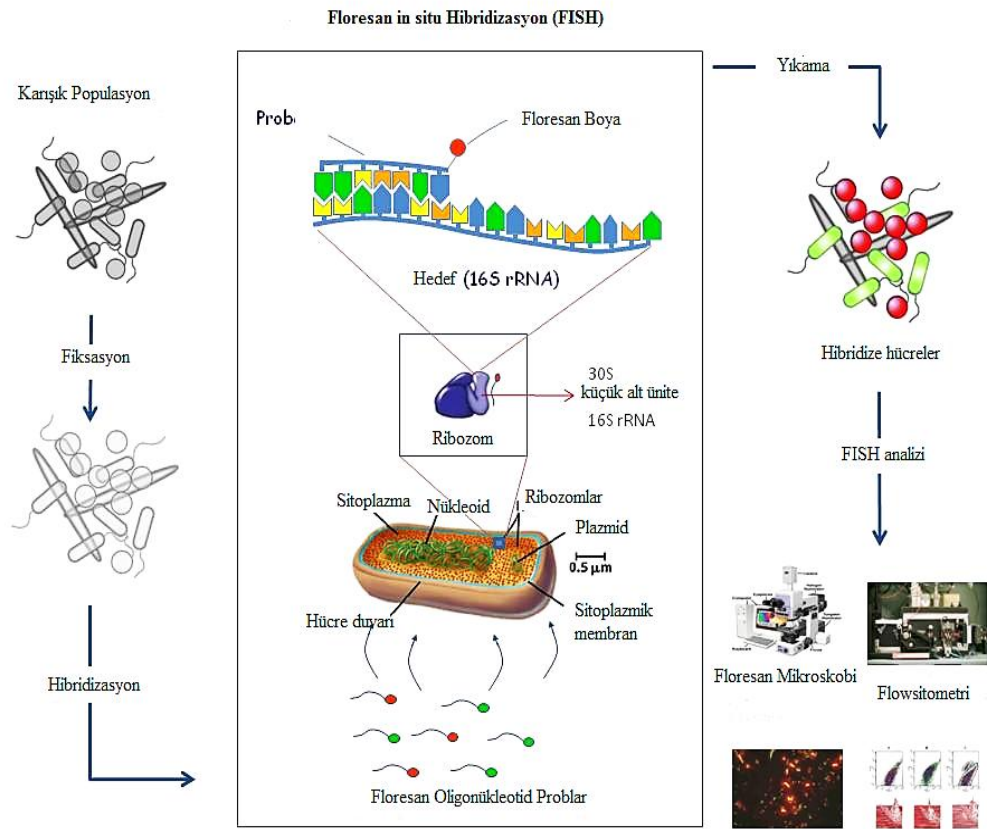
FISH 'te kullanılan oligonükleotid proplar genellikle 15 ile 30 nükleotid uzunluğunda ve 5'-ucuna tek bir floresan boya molekülü kovalent bağlanmıştır. Yaygın floroforlar fluoresein, tetrametilrhodamine, Texas kırmızısı ve Cy 3,Cy 5 gibi karbosiyaninleri içermektedir.Karbosiyanin boyalar yöntemin duyarlılığını geniş ölçüde arttırmıştır (Amann ve ark.,2001).

FISH için kullanılan tek etiketli oligonükleotid proplar düşük ribozom içerikli hücreler için düşük sinyal yoğunluğunda yetersiz kalmaktadır. Oligotrofik ortamlarda FISH belirleme verimliliği genellikle oldukça düşüktür. Bu sistemler için yaban turbu peroksidazı etiketli oligonükleotid proplar ve tyramid sinyal çoğaltımından yararlanan (CARD)- FISH mikrobiyal topluluk üyelerini yakalamak için en tercih edilen yöntemdir (Wagner ve Haider, 2012).

Diğer bir sınırlama tüm bakteriyal ve arkeal hücreler standart fiksasyon protokolleri ile oligonükleotid proplara geçirgenlik göstermeyebilir. Kültüre

alınmamış prokaryotlar için rRNA hedefli problemlerin özel hibridizasyon ve yıkama koşulları tam olarak tespit edilememesi bir başka sınırlamadır. Diğer sınırlamalar ise nükleik asit problemler için hedef molekül olarak rRNA'dan yararlanılmasından kaynaklanmaktadır. Bu molekülün mutasyon oranı nispeten düşük olduğundan genellikle prokaryot türün strainleri arasında ayırım yapan hedef bölgelere sahip değildir (Wagner ve ark., 2003).

rRNA hedefli FISH teknikleri sürekli olarak geliştirilmektedir ve hücre geçirgenliğini arttıran, prob hedef bölgelerine erişilebilirlik, prob özgüllüğü sinyal yoğunluğu ve benzeri önemli iyileştirmeler yapılmıştır. FISH ile ilgili araştırma alanındaki ikinci hızla gelişme rRNA-FISH ile spesifik genler veya mRNA moleküllerinin varlığı, spesifik metabolik aktivitesi ve önemli çevresel parametrelerle ilgili ek bilgiler sağlayan diğer tekniklerin kombinasyonudur. Bu amaçla rRNA-FISH veya CARD-FISH çeşitli FISH teknikleri ve boyama prosedürleri ile hem de mikrootoradyografi, mikro elektrot ölçümleri, Raman mikrospektroskopi ve NanoSIMS ile birleştirilmiştir (Wagner ve Haider, 2012).



Şekil 1.8 FISH akış şeması (<http://www.biovisible.com/indexRD.php?page=fish>)

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan besiyerleri

%2 MGM(Modifiye geliştirme medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....66.64 ml

Saf su.....900 ml

Pepton.....5 gr

Maya özütü.....1 gr

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, 2009).

%3 MGM(Modifiye geliştirme medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....99.96 ml

Saf su.....867.64ml

Pepton.....5 gr

Maya özütü.....1 gr

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, 2009).

%5 MGM(Modifiye geliştirme medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....166.6 ml

Saf su.....800.4ml

Pepton.....5 gr

Maya özütü.....1 gr

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, 2009).

%10 MGM (Modifiye geliştirme medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....333.2ml

Saf su.....633.8ml

Pepton.....5 gr

Maya özütü.....1 gr

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, 2009).

%12 MGM (Modifiye geliştirme medyum)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....400 ml

Saf su.....567 ml

Pepton.....5 gr

Maya özütü.....1 gr

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, 2009).

Alkalin nutrient agar

Nutrient agar besiyeri hazırlanır. Sterilizasyondan sonra pH 9.7'ye ayarlamak için 1/10 oranında 1M Na-sesquicarbonate solüsyonu eklenir.

Na-sesquicarbonate solüsyonu: NaHCO₃4.2 gr

Na₂CO₃ anhydrous.....5.3 gr

Distile su.....100 ml

(DSMZ: List of recommended media for microorganisms 31)

Horikoshi I besiyeri

Glukoz.....	10 gr
Polypepton.....	5 gr
Yeast extract.....	5 gr
K ₂ HPO ₄	1 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.2 gr
Na ₂ CO ₃	10 gr
Agar.....	20 gr

Horikoshi II besiyeri

Çözülebilir nişasta.....	10 gr
Polypepton.....	5 gr
Yeast extract.....	5 gr
K ₂ HPO ₄	1 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.2 gr
Na ₂ CO ₃	10 gr
Agar.....	20 gr

Nişasta-kazein agar

Nişasta.....	10 gr
Kazein.....	0.3 gr
KNO ₃	2 gr
NaCl.....	2 gr
K ₂ HPO ₄	2 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.05 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.01 gr

CaCO ₃	0.02 gr
Agar.....	18 gr
Distile su.....	1000ml

K₂HPO₄ ayrı olarak hazırlanır ve otoklavlanarak steril edildikten sonra besiyerine ilave edilir. Ayrıca 50'şer µg/ml sikloheksimid ve nistatin ilave edilir.

Aktinomiset izolasyon agar

Agar.....	15 gr
L-asparagine.....	0.1 gr
K ₂ HPO ₄	0.5 gr
FeSO ₄	0.001 gr
MgSO ₄	0.1 gr
Sodyum kazeinat.....	2 gr

Na(C₂H₅COO)..... 4 gr

5 ml gliserol içeren 1000 ml distile suda çözülür.

Gauze agar

K ₂ HPO ₄	0.5 gr
MgSO ₄	7 gr
KNO ₃	1 gr
NaCl.....	0.5 gr
FeSO ₄ .2H ₂ O.....	0.01 gr
Nalidixic acid.....	10 µg

Gliserol yeast extractt

Gliserol.....	5 ml
Yeast Extract.....	2 gr

K ₂ HPO ₄	1 gr
Agar.....	15 gr

2.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler

%30 Deniz suyu (SW)) (g/l)

NaBr.....	0.78 gr
HNaCO ₃	0.2 gr
KCl.....	6.0 gr
CaCl ₂	0.868 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	59.39 gr
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	41.48 gr
NaCl.....	234 gr

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

TAE 50X (bir litre için)

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

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

TBE 5X

Tris base.....	54 gr
Borik asit.....	27.5 gr
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).

PBS 10X

NaCl.....	80 gr
NaH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O.....	11.5 gr
KCl.....	2 gr
KH ₂ PO ₄	2 gr

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

Elektroforez için yükleme tamponu (6X)

Ksilensiyanol.	%0.25
Bromofenol blue	%0.25
Gliserol.....	%30

Oda sıcaklığında saklanır (Sambrook ve ark. 1989).

%10 SDS solusyonu

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

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

In situ hibridizasyon tamponu

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

Hazırlanıp buz üzerinde korunur (Anton 1999).

FISH için yıkama tamponu

Tris-HCl (1 M pH 8).....1 ml

NaCl (5 M).....700 µl

EDTA (0.5 M).....500 µl

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

%80'lik DGGE stok solusyonu

Üre.....13.45 gr

Deiyonize Formamid.....12.8 ml

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

TAE (20X).....2 ml

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

%0'lık DGGE stok solusyonu

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

TAE (20X).....2 ml

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

%10 Amonyum persülfat solusyonu

Amonyum persülfat.....10 gr

Distile su.....100 ml

Hazırlandıktan sonra küçük hacimler halinde ependorflara paylaşılırak -20 °C'de saklanır (Muyzer, 1999).

Total nükleik asit ekstraksiyonu için ekstraksiyon buffer

100 mM Tris-HCl.....0.7880 gr

100 mM EDTA.....1.5760 gr

mQ su ile 100ml'ye tamamlanır ve ph 8.0'a ayarlanır.

2.1.3. Çalışmada kullanılan primerler ve problemler

Çizelge 2.1. Çalışmada Kullanılan Primerler ve Problemler

PRİMER	BAZ DİZİLİMİ	SPEŞİFİTESİ
27 F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	Bacteria
21F	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA	Archaea
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	Universal
907 R	CCGTCAATTCMTTTGAGTTT	Universal
344F	ACG GGG CGC AGC AGG CGC GA	Archaea
341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Bacteria
341F-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G CCT ACG GGA GGC AGC AG	Bacteria
344F-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G ACG GGG CGC AGC AGG CGC GA	Archaea
907R-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	Evrensel
PROB ADI	PROB DİZİSİ	SPEŞİFİTESİ
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Bacteria
Arc 915	GTGCTCCCCGCAATTCCT	Archaea
Arc 344	TCGCGCCTGCTGCICCCCGT	Archaea

2.2. Metod

2.2.1. Örneklerin toplanması

Çalışmada kullanılan su örnekleri Van Gölü kıyısının farklı bölgelerinden farklı zamanlarda alınmıştır.

Çizelge 2.2. Örnekleme bölgeleri ve alınış tarihleri

ÖRNEKLEME BÖLGELERİ	ALINIŞ TARİHİ
Merkez	20.06.2012
Tatvan	25.06.2012-27.02.2013
Ahlat	24.06.2012
Edremit	14.11.2012-20.02.2013



Şekil 2.1. Van Gölü örnekleme bölgeleri

2.2.2. Örneklerdeki toplam tuz değerin, pH'ın ve kimyasal özelliklerin belirlenmesi

Örneklerin tuz değeri el refraktometresi (Eclipse), pH'ı ise pH metre (Mettler Toledo) ile ölçülmüştür. Su örneklerinin içerdiği bazı elementler Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) bünyesindeki ICP (Perkin Elmer Optical Emission Spectrometer Optima 4300 DV) cihazı ile belirlenmiştir.

2.2.3. Mikroskopik inceleme

Mikroorganizmaların gram boyamaları Dussault (1965)'a göre gerçekleştirilmiştir.

2.2.4. Kültüre alma

Su örneklerinden alkalifilik mikroorganizmaları kültüre edebilmek için farklı besiyerleri kullanılmıştır. Her bir su örneğinden ayrı ayrı 50'şer ve 100'er µl %2 MGM, %3 MGM, %5 MGM, %10 MGM, %12 MGM, Alkalın nutrient agar, Horikoshi I ve II medium, Nişasta kazein agar, aktinomiset izolasyon besiyeri, Gauze agar ve gliserol yeast ekstrakt agar katı besi ortamlarına yayma ekim yapılmıştır. Ayrıca su örneklerinden 1'er ml alınarak %2 MGM, %3 MGM, %5 MGM, %10 MGM, %12 MGM, Horikoshi I ve II sıvı besiyerlerine ekilerek 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona alınmıştır. 4-15 günlük inkübasyon sonucu oluşan koloniler alınıp çizgi ekimler yapılarak saf kültür haline getirilmiştir ve saf haldeki kültürler % 15 lik gliserol stokları içerisinde -85°C'de muhafaza edilmektedir.

2.2.5. Mikroorganizmaların Tanımlanması

Kültür bağımlı yöntemler

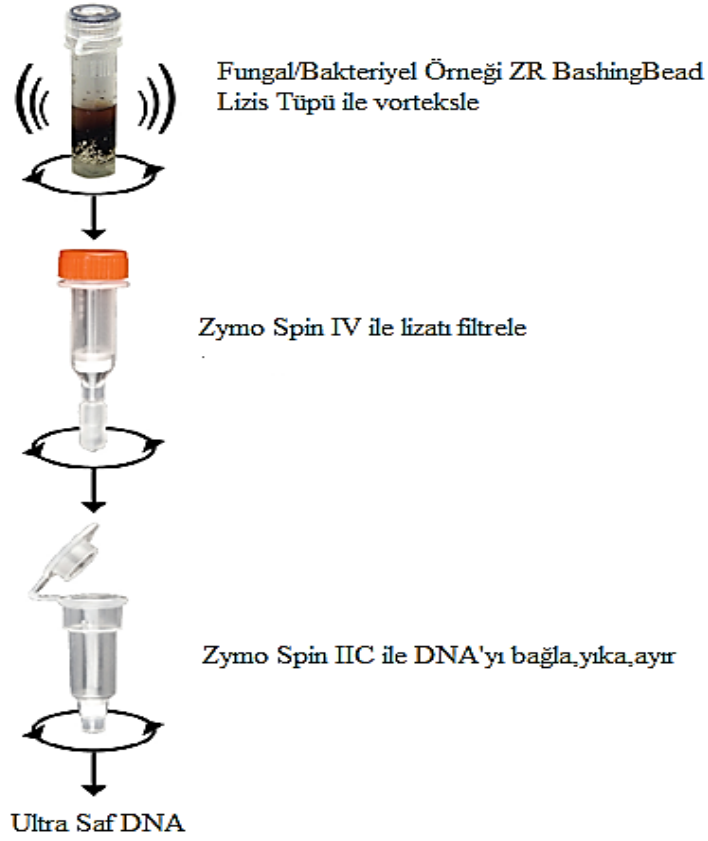
Polimeraz zincir reaksiyonu

16S rRNA'nın PCR ile çoğaltılması için izolatlardan DNA ekstraksiyonu

Çalışmada PCR reaksiyonlarında kalıp DNA olarak kullanılmak üzere ekim yaptığımız besiyerleri üzerinde gelişen kültürlerden tek koloni alınarak 200 µl steril distile su içinde iyice karıştırılarak resüspanse edilmiş ve 100°C'ye ayalanmış su banyosunda 5–10 dk bekletilerek hücrelerin lize olması sağlanmıştır. Daha sonra 10000 rpm'de santrifüj yapılmış ve süpernatant steril bir ependorfa alınarak template olarak kullanılmak üzere -20'de muhafaza edilmiştir. (Mutlu, 2006).

Ayrıca izolatlardan genomik DNA izolasyonu için Zymo ZR Fungal/Bacterial DNA kiti kullanılmıştır. Kit protokolünde bazı değişiklikler gerçekleştirilerek işlem gerçekleştirilmiştir. Protokole göre; 200 µl steril distile su içinde resüspanse edilmiş bakteriyel hücreler özel bir lizis tüpe aktarılmıştır. Tüpe 750 µl lizis solüsyonu eklenmiştir. Bead beater yerine çalkalayıcıda 20 dakika yüksek hızda muamele edilmiştir. Özel lizis tüp mikrosantrifüjde 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. 400 µl süpernatant toplama tüpüne yerleştirilmiş olan filtreye aktarılmış ve 7.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamada elde edilen filtrata 1200 µl Fungal/Bacterial DNA bağlayıcı solüsyon eklenmiştir. Bu karışımdan 800 µl toplama tüpüne yerleştirilmiş olan kolonuna aktarılmış ve 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü boşaltılmış ve kalan karışım da kolona aktararak işlem tekrar edilmiştir. Yeni bir toplama tüpüne yerleştirilen kolona 200 µl DNA ön yıkama solüsyonu eklenerek 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından 500 µl Fungal/Bacterial DNA yıkama solüsyonu eklenmiş ve 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Kolon 1.5 ml hacimli temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve 100 µl DNA elution buffer eklenerek 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra kullanıma hazır ultra saf DNA elde edilmiştir.



Şekil 2.2. Zymo ZR Fungal/Bacterial DNA kit ile ekstraksiyon işlem basamakları

PCR ile 16S r RNA geninin çoğaltılması ve izolatların ait olduğu domainin belirlenmesi

Bunun için farklı morfolojilerde izolatlar seçilmiştir. Archaea ve Bacteria domainlerinin tespiti için Archaea ve bacteria spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur.

PCR reaksiyonu kurmak için ileri primer olarak bacteria için 27F Archaea için 21F, geri primer olarak ise hem Archaea hem bacteria için 1492R, template ve Biolabs OneTaq® Quick-Load®2X Master Mix (M0486S), Fidelity Taq 2X Master Mix ve bileşenlerinden hazırlanan PZR karışımı kullanılmıştır.

PCR karışımının hazırlanışı şu şekildedir;

Çizelge 2.3. PCR reaksiyonu kurulması

İÇERİK	30 Reaksiyon için
Buffer (10 X)	150 µl
dNTP mix	30 µl
MgCl ₂	45 µl
İleri primer (10 µM)	30 µl
Geri primer (10 µM)	30 µl
Taq polimeraz	6 µl
Distile su	1180 µl

PCR tüplerine son hacim 25 µl olacak şekilde 24 µl PCR karışımı ve 1 µl template ilave edilerek reaksiyonlar kurulmuştur.

1X OneTaq Quick-Load Master Mix ile PZR karışımının hazırlanması ve Fidelitaq Master Mix ile PZR karışımının hazırlanması Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. 1X OneTaq Quick-Load Master Mix ile PZR reaksiyonu kurulması

İÇERİK	25 µl reaksiyon	50 µl reaksiyon	Final Konsantrasyon
OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer	12.5 µl	25 µl	1X
10 µM Forward Primer	0.5 µl	1 µl	0.2 µM
10 µM Reverse Primer	0.5 µl	1 µl	0.2 µM
Template DNA	Değişken	değişken	<1,000 ng
Nuclease-Free Water	25 µl'ye kadar	50 µl'ye kadar	

Çizelge 2.5.: Fidelitaq Master Mix ile Reaksiyon Kurulması

İÇERİK	25 µl reaksiyon	50 µl reaksiyon	Final Konsantrasyon
Fidelitaq 2X Master Mix	12.5 µl	25 µl	1X
10 µM Forward Primer	0.25-2.5 µl	0.5-5.0 µl	0.1-1.0µM
10 µM Reverse Primer	0.25-2.5 µl	0.5-5.0 µl	0.1-1.0µM
Template DNA	≥ 1 µl	≥ 1 µl	< 500 ng
Su (PCR için uygun)	25 µl'ye kadar	50 µl'ye kadar	

Bacteria ve Archaea üyelerinin 16 S r RNA amplifikasyonu için Bacter 50 programı kullanılmıştır.

Bacter 50 programı reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir;

94°C.....3 dakika (Denatürasyon)

94°C.....30 saniye
55°C.....1 dakika
72°C.....1 dakika

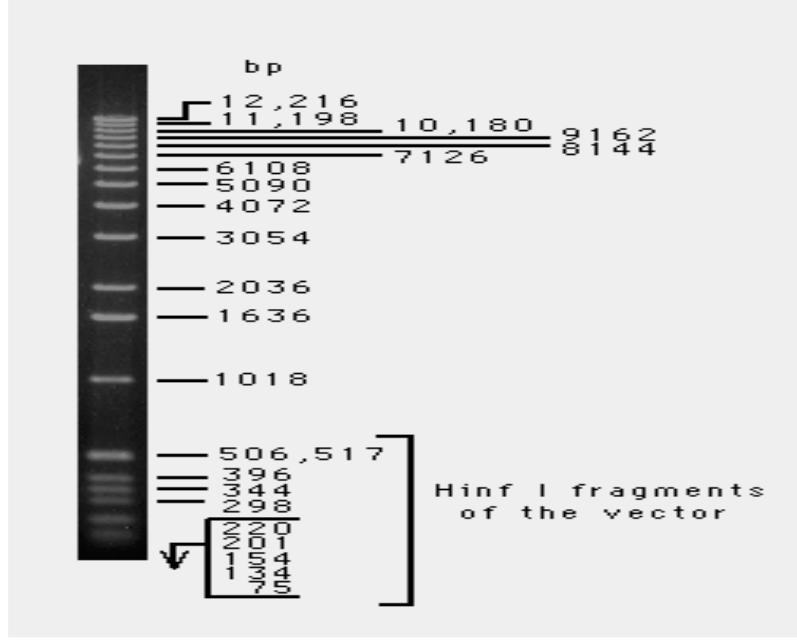
} 30 döngü

72°C.....10 dakika

4°C.....Süresiz

Reaksiyonlar için Techne ve Bio Rad Thermal Cyclers kullanılmıştır. Tüm çalışmalarda hem pozitif hemde negatif kontrol reaksiyonları hazırlanmıştır. Pozitif kontroller Archaea veya bacteria olduğu bilinen örneklerle hazırlanmıştır. Negatif kontroller ise DNA içermeyen reaksiyon karışımları ile oluşturulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %1 lik agaroz jele 1X'lik TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu içinde 5V/cm akım uygulanarak gözlenmiştir.

Jelde oluşturulan kuyucuklara 5 µl PZR ürünü (0.5 µl-4 µl) yükleme boyası (Fermentas 6X Loading Dye Solution) ile karıştırılarak yardımıyla yüklenmiştir ve oluşan ürün boyutunu saptayabilmek için marker olarak Fermentas 1kb Plus DNA Ladder kullanılmıştır.



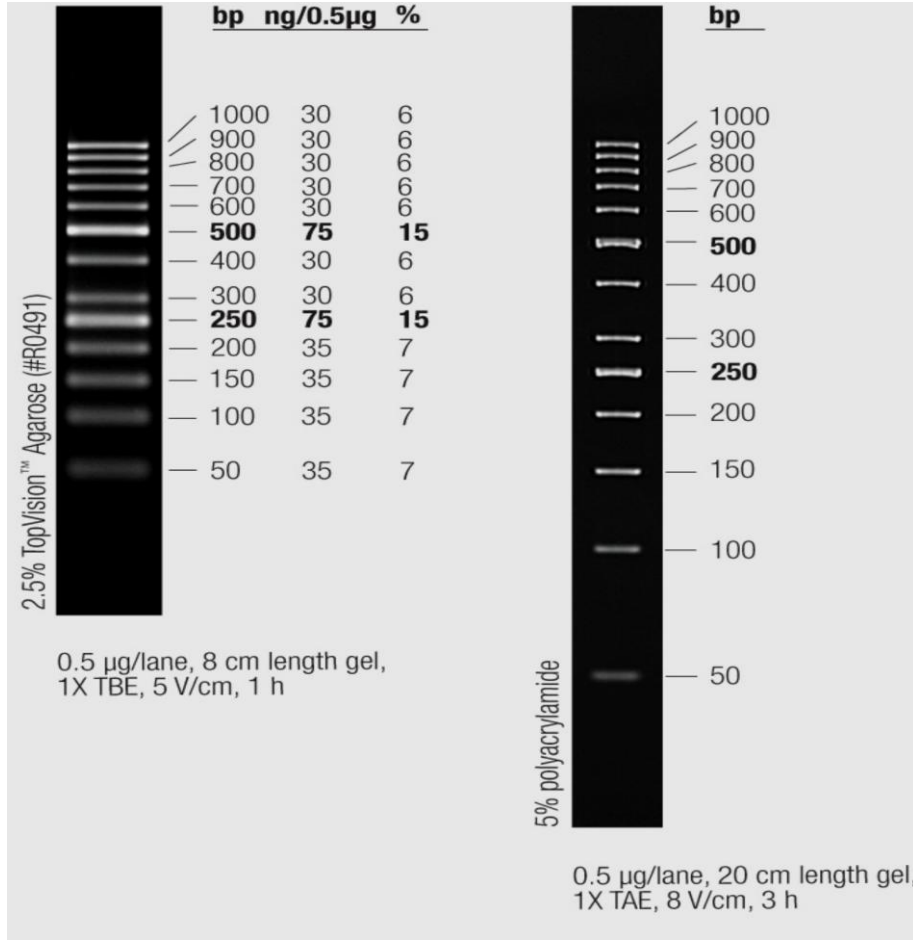
Şekil 2.3. 1 Kb DNA Ladder

PCR ürünleri 90 V altında 40 dakika yürütülmüştür. DNA'nın jelde görünür hale gelmesi için 0.5 µg/µl konsantrasyondaki etidyum bromür solüsyonu içinde 10 dakika bekletildikten sonra 5–10 dk yıkama solüsyonunda bekletilmiştir. Jeller daha sonra 312 nm dalga boyunda UV veren translüminatör (Biolab Uvitec) ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilerek saklanmıştır.

Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA)

16S rRNA geni için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri için *Hinf* I enzimi kullanılmıştır.

Her bir reaksiyon için 1 µl 5 U enzim, 10 µl PCR ürünü, 2 µl restriksiyon enzimine uygun buffer ve 7 µl DNase-RNase içermeyen ultra saf distile su (Gibco) (20 µl toplam hacim olacak şekilde) kullanılmıştır. Karışım 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Analiz amacıyla 20 µl örnek yükleme boyası (Fermentas 6X Loading Dye Solution) ile karıştırılarak 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu içindeki %2 lik agaroz jele yüklenerek 5 V/cm elektrik akımı uygulanarak 4 saat yürütülmüştür. ARDRA analizinin değerlendirilmesinde 1kb ve 50 bp (Fermentas Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder) markırlar kullanılmıştır.



Şekil 2.4. 50bp ladder

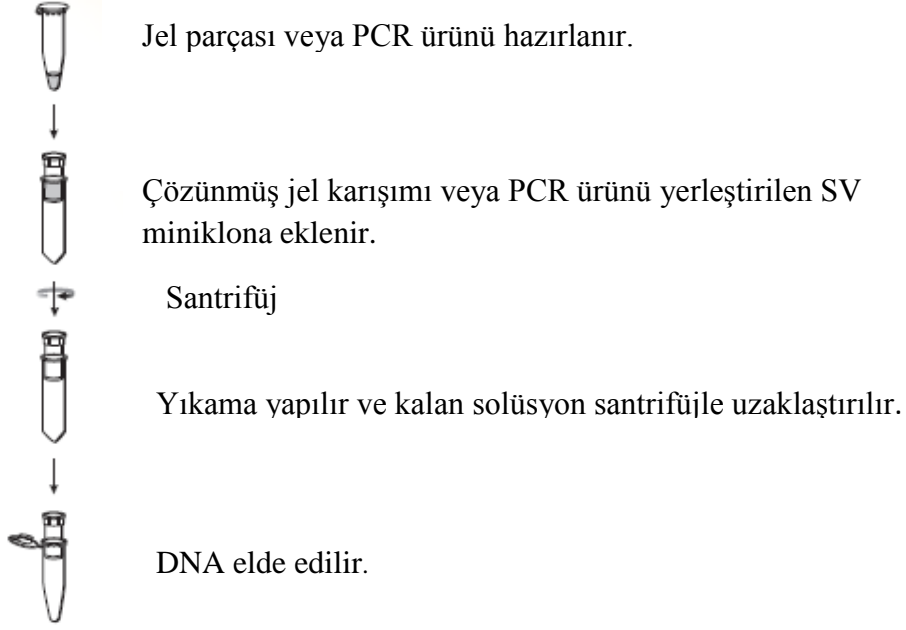
Daha sonra ARDRA sonucuna göre PCR ürünlerinin kaç farklı profil verdiği saptanmıştır ve her bir profile ait örnekler seçilerek dizi analizine geçilmiştir.

PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılması amacıyla Promega Wizard SV jel ve PCR saflaştırma kiti ve Exo-SAP-IT PCR Clean up Kit kullanılmıştır. Deneysel işlem basamakları kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Promega Wizard SV jel ve PCR saflaştırma kiti için işleme başlamadan önce PCR ürünleri için 6'şar adet reaksiyon kurulmuş ve yaklaşık 120 µl PCR ürünü elde edilmiştir. Bu ürünler %1 lik agaroz jele 1X'lik TAE tamponu içinde 90 V altında 40 dakika yürütülmüş ve daha sonra 312 nm dalga boyunda UV veren translüminatör ile incelenmiştir. Kit protokolü gereği elektroforezi takiben DNA bantları jelden keşilmiş ve kesilen jel parçası 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Her 10mg jel parçası için 10 µl olacak şekilde membran bağlayıcı solüsyon ilave edilmiştir. Vorteksleme

işlemi uygulanmış ve 50-65 °C'de jel tamamen çözülünceye kadar inkübe edilmiştir. Toplama tüpüne SV minikolonlar yerleştirilmiştir. Çözülmüş jel karışımı minikolona transfer edilmiştir ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. 16.000 g'de 1 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Toplama tüpündeki toplanan sıvı kısım uzaklaştırılmış ve mini kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Etanol eklenmiş membran yıkama solüsyonundan 700 µl eklenmiş ve 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki toplanan sıvı kısım uzaklaştırılmış ve mini kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Etanol eklenmiş membran yıkama solüsyonundan 500 µl eklenmiş ve 16.000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki toplanan sıvı kısım uzaklaştırılmış ve mini kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Boş toplama tüpü ve mini kolon 1 dakika daha etanol kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla santrifüj edilmiştir. Mini kolon dikkatlice 1,5 ml'lik temiz mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir. 50 µl nükleaz içermeyen su minikolona eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. 16.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve minikolon uzaklaştırılarak DNA 4 °C veya -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Saflaştırılan DNA'nın kalitesi agaroz jelde gözlenmiş ve nanodropta ölçülmüştür.

PCR ürünlerinin saflaştırılması amacıyla GE Healthcare EXOSAP-IT kiti saflaştırma protokolü kullanılmıştır. Bu yöntemde eksonükleaz ve alkalinfosfataz enzimleri bulunmaktadır. Eksonükleaz primerleri uzaklaştırmaktadır ve alkalın fosfataz ise dNTP'leri uzaklaştırmaktadır. 10 µl PCR ürünü ve 4 µl enzim karışımı (EXO-SAP-IT) karıştırılmıştır ve 37°C'de thermal cycler'da 15 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 80°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemlerden sonra DNA dizi analizi için hazır hale gelmiştir.



Şekil 2.5. Promega Wizard SV jel ve PCR saflaştırma kiti ile saflaştırma basamakları

PCR ürünlerinden dizi analizi

Öncelikle kültür halindeki izolatlardan DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Ardından elde edilen DNA'nın 16S rRNA bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır ve ARDRA yapılarak farklı profiller belirlenmiş ve bu profilleri temsil eden örnekler seçilerek saflaştırılmış ve dizi analizine gidilmiştir. PCR ürünlerinin baz diziliminin belirlenmesinde Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı ve dizileme işlem için Beckman Coulter GenomaLab TM DTCS Quick Start Kiti kullanılmıştır. Beckman dizi analiz kitindeki şartlara uyulmuştur.

Dizi Analizi Öncesi PCR

Template.....	2 µl
Primer.....	0.65
Mix.....	6 µl
Ultra Saf Su.....	1.35 µl

NOT: PCR tüplerinin üzerinde buharlaşma olmaması için mineral yağı kullanılmıştır.

Reaksiyonlar 27F, 907R ve 1492R primerleri kullanılarak ayrı ayrı kurulmuştur.

Reaksiyon için SEQ programı kullanılmıştır. Programın reaksiyon şartları;

96°C.....	20 saniye	} 30 döngü
50°C.....	20 saniye	
60°C.....	4 dakika	

Amplifikasyon sonrası bağlanmamış primer ve işaretli dNTP' lerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için PCR'dan çıkan ürünler steril ependorflara aktarılmıştır ve her örneğe 5.5 µl stop solüsyonu eklenmiştir. Stop solüsyonu hazırlanışı;

100mM Na-EDTA(pH:8).....20 µl

3 M Na-Ac(pH:5.2).....20 µl

Glikojen.....10 µl (-20°C'de)

H₂O.....50 µl

Üzerine PCR reaksiyonu 10 µl olduğu için 10 µl manyetik boncuk (Agencourt Clean SEQ Beckman Coulter) eklenmiştir. 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 55 µl %73'lük izopropanol eklenmiş ve 10dk ara ara karıştırılarak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra ependorflar manyetik alana yerleştirilerek 3–5 dk bekletilmiştir. Sıvı kısım tüpten uzaklaştırılmıştır ve üzerine 200 µl %73'lük izopropanol eklenmiştir. 3dk bekletilmiş ve alkolün eklenmesi işlemi tekrar edilmiştir. Alkolün uçması için 10–20 dk beklenmiş ve üzerine 40 µl SLS (Sample Loading Solution) eklenerek boncukların tam çözünmesi sağlanmıştır. (SLS kit solüsyonudur ve içerisinde formamid bulunmaktadır). DNA boncuklardan ayrılıp SLS solüsyonuna geçmiştir. Sıvı kısımdan 35 µl alınıp mikrolatelere yüklenmiştir ve örnekler üzerine buharlaşmayı önlemek için mineral yağ damlatılmıştır. Ayırma plağına buffer (GenomaLab™ Separation Çözelti 4x30 ml) konulmuş ve örnek içeren plak cihaza yerleştirilmiştir. Sistemin çalışması için gerekli olan ayırma jeli

(GenomaLab™ Separation Gel LPAI) ve hazırlanan örnekler Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı kapiller sistemine verilmiştir. Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazına örnek isimleri girilerek LFR α modu seçilip analiz başlatılmıştır.

Kültür bağımsız yöntemler

Fluoresan in situ hibridizasyon (FISH)

Çalışmada kullanılan su örneklerindeki ve ekim yapılan sıvı kültürlerdeki mikrobiyal içeriği ve toplam bakteri sayısını belirlemek için FISH yöntemi uygulanmıştır.

Fiksasyon: Su örneklerinden ve sıvı kültürlerden 1'er ml alınarak ependorflara aktarılmıştır ve üzerine çeker ocakta 220 μ l formaldehit (Fluka) eklenerek 4 °C'de 1 gece fiksasyon için bekletilmiştir. Bu işlemden sonra 10 ml 1X PBS eklenerek karışım 0.2 μ m por çaplı filtreden geçirilmiştir. Filtrenin yıkanması amacıyla tekrar 1X 10 ml PBS filtreden geçirilmiştir. Sonra filtreler hibridizasyon işlemine kadar muhafaza edilmek üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Hibridizasyon: Bu işlem için öncelikle in situ hibridizasyon buffer hazırlanmıştır. Filtrelerden parçalar kesilerek 18 μ l in situ hibridizasyon buffer ve hangi prob kullanılacaksa 2 μ l prob karıştırılarak lam üzerine yerleştirilmiş bu parça filtrelerin tüm yüzeyine temas edecek şekilde damlatılmıştır. Lamlar hibridizasyon buffer ile ıslatılmış kağıt havlu bulunan 50 ml'lik plastik tüplere yerleştirilmiş ve tüpler yatay şekilde hibridizasyon fırınına (Biometra OV3) yerleştirilerek 2 saat boyunca 46 °C'de inkübe edilmiştir.

Yıkama: Hibridizasyon sonrası ağlanmamış problemlerin uzaklaştırılması için yıkama işlemi yapılmıştır. Filtrelerin yıkanması için, 48 °C'lik su banyosunda beklemekte olan yıkama tamponu içerisine filtreler konarak 15 dakika bekletilmişlerdir. Yıkama tamponundan çıkarılan filtreler kurutulmuştur ve DAPI boyaması yapılmıştır.

DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) Boyama: Kuruyan filtreler üzerine üzerine 40 μ l DAPI çalışma solüsyonu damlatılmış ve 5 dk bekletilmiştir. Bu işlem sonrası önce %70'lik alkol sonrada su ile 10sn yıkanarak

kurutulmuştur. Kurutulan filtreler lama alınarak üzerine 20 µl citifluor damlatılarak lamel ile kapatılmıştır ve 100X luk objektifte epifluoresan mikroskopta (Leica DM6000B) incelenmiştir.

Su örneklerinden total nükleik asit ekstraksiyonu

Bu işlem için su örneklerinden 200 ml örnek vakumlu membran filtrasyon sistemi kullanılarak 0,2 µm por çaplı membran filtreden (Millipore, Isopore GTTP04700) geçirilmiştir. Membran filtreler küçük parçalar şeklinde kesildikten sonra ependorfa aktarılmıştır. Üzerine 600 µl ekstraksiyon buffer (100mM Tris-HCl pH:8, 100 mM EDTA) eklenmiştir. Kısa bir süre santrifüj edilerek parçaların da solüsyonla karışımı sağlanmıştır. 6 µl (3mg/ml) lizozim eklendikten sonra 15 dakika 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Ardından üzerine 9 µl proteinaz K (150mg/ml) ve 60 µl %10'luk SDS eklenerek 40 dakika 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 120 µl 5 M NaCl eklenerek tüp ters düz edilerek karıştırılmış ve 90 µl CTAB (%10 CTAB (Cetil Trimetil Ammonyum Bromid), 0.7 M NaCl) eklenip tekrar karıştırılmıştır. 10 dakika 65 °C su banyosunda inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası sıvı azot içinde 1–2 dakika bekletilerek dondurulmuş ve tekrar 65 °C'ye konulmuştur. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra, 900 µl Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) eklenip karıştırılmış ve 5 dakika 4 °C'de 13.000 rpm de santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı faz alındıktan sonra üzerine 1 hacim Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) eklenmiştir. Bu işleme protein ara fazı indirgeninceye kadar devam edilmiştir. 80 µl sodyum asetat (3M, pH 4.8) ve 480 µl isopropanol, 8 µl MgCl₂ (1M) eklendikten sonra, 30 dakika 13.000 rpm' de 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine %70'lik alkol ilave edilmiş ve tekrar 15 dakika 13.000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Alkol pipetle uzaklaştırıldıktan sonra, pelet oda sıcaklığında kurutulmuş ve 50 µl dietilpirokarbonat (DEPC)'li su ile resüspanse edilerek, -85 °C'de muhafaza edilmiştir.

DGGE (Denatüre Edici Gradient Jel Elektrofrezisi)

16S rRNA geninin amplifikasyonu için uçlarında yaklaşık 40 bazlık GC kuyruğu içeren özel primerler kullanılmıştır.

Bakteriyal 16S rRNA geninin amplifikasyonu için 341F ve 907R-GC primerleri, 341F-GC ve 907R primerleri, Archaea 16S rRNA geninin

amplifikasyonu için 344F ve 907R-GC primerleri ile 344F-GC ve 907R primerleri kullanılmıştır. Reaksiyonda kalıp DNA olarak su örneklerinden total nükleik asit ekstraksiyonu sonucu elde edilen nükleik asitler kullanılmıştır.

Amplifikasyon reaksiyonlarında Bacteria 16S rRNA'sı için aşağıdaki şartlar sağlanmıştır;

İlk Döngü

94 °C 5 dakika

65 °C 1 dakika

72 °C 3 dakika

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

94 °C 1 dakika

64 °C (63, 62, 61,....55 °C'e kadar) 1 dakika

72 °C 3 dakika

20 Döngü

94 °C 1 dakika

55 °C 1 dakika

72 °C 3 dakika

Son Döngü

94 °C 1 dakika

55 °C 1 dakika

72 °C 10 dakika

4 °C Süresiz

Amplifikasyon reaksiyonlarında Archaea 16S rRNA'sı için aşağıdaki şartlar sağlanmıştır;

94 °C 5 dakika

29 döngü

94 °C 30 saniye

56 °C 45 saniye

72 °C 2 dakika

1 döngü

94 °C 30 saniye

56 °C 45 saniye

72 °C 7 dakika

4 °C Süresiz

Tüm reaksiyonlar 50 µl hacimde son konsantrasyonları 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 200 µM deoksinükleotidtrifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0.2 µM primerler, 2 unite Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde kurulmuştur. Her reaksiyon seti ile birlikte hem pozitif hem de negatif kontrol reaksiyonları hazırlanmıştır.

Bacteria ve Archaea 16S rRNA ürünleri için DGGE

Amplifikasyonla çoğaltılan ürünlerini analiz etmede denatüre edici gradient jel elektroforezi kullanılmıştır. Denatüre edici gradient jel elektroforezi için Ingeny firmasının IPU-S modelli DGGE sistemi kullanılmıştır.

Bu işlemde öncelikle yaklaşık 1 mm'lik poliakrilamid jellerin oluşmasını sağlayan düzeneğin sızdırmazlığı kontrol edilmiştir. Daha sonra %0'lık ve %80'lik DGGE stok solusyonları hazırlanmış ve stok solusyonlarından denatüre elektroforez sisteminin oluşturulması için %30 ve %60'lik solüsyonlar hazırlanmıştır. Gradient oluşturucu düzenek yardımıyla solusyonların gradient jeli oluşturacak şekilde karıştırılması sağlanmıştır. Bu stok solüsyonlarında denatürant

olarak üre ve formamid kullanılmış olup jelin artan konsantrasyonunda üre ve formamid gradienti oluşması sağlanmıştır. Sistemde alt kısımda denatüre edici ajan içeren gradient jeli üst kısımda denatürant içermeyen yükleme jeli yer almaktadır. Çukur oluşmasını sağlayan tarak jele yerleştirilerek polimerizasyon için 2 saat bekletilmiştir. Polimerizasyon sonrası elektroforez tankı 17 litre 1X TAE tamponu ile doldurulmuş ve tamponun sıcaklığının örneklerin yüklenmesine kadar 55-60 °C'ye yükselmesi sağlanmıştır. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra 'Low Mass DNA Ladder' ile jele yüklenecek örnek miktarı belirlendikten sonra 10 µl örnek, 3 µl yükleme boyası ile karıştırılarak yüklenmiştir. Tampon sıcaklığı 60 °C'ye ulaştığında sisteme 1 gece 5V/cm akım uygulanmıştır. Elektroforez sonrası jel 1 saat etidium bromür (1 µg/ml) ile boyandıktan sonra distile su ile 1 saat yıkanmış ve UV ışığı ile incelenmiştir.

Jellerde farklı konumlardaki bantlar UV ışığı altında steril bisturi yardımıyla jelden kesilmiş ve steril ependorf tüplerine alınmıştır. Üzerine 40 µl mQ su eklenerek 1 gece 4 °C'de inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrası suya geçen DNA, DGGE primerleri ile tekrar amplifiye edilmesi için kalıp olarak kullanılmıştır. (Muyzer ve ark. 1996). Jellerin PCR'ları ise son hacmi 25 µl olacak şekilde GC-clamp içermeyen primerlerden 1'er µl, kalıp 1 µl ve 22 µl PCR mix ile gerçekleştirilmiştir. Buradan elde edilen ürünlerin de saflaştırılarak dizi analizleri yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Örneklerdeki Toplam Tuz Değerlerinin ve İyonik Kompozisyonlarının Belirlenmesi

3.1.1. Örneklerin toplam tuzluluk değerlerinin belirlenmesi

Su örneklerinin el refraktometresi ile yapılan toplam tuzluluk ölçüm sonuçları Çizelge 3.1 'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Örneklerin tuzluluk değerleri

ÖRNEK	TUZLULUK (%)
Merkez	% 1.7
Tatvan	% 1.8
Ahlat	% 1.8
Edremit	% 2
Tatvan 2	% 1.2
Edremit 2	% 1.2

3.1.2. Örneklerin pH değerlerinin belirlenmesi

Su örneklerinin yapılan pH ölçüm sonuçları Çizelge 3.2 de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Örneklerin pH değerleri

ÖRNEK	pH
Merkez	9.5
Tatvan	9.8
Ahlat	9.6
Edremit	10.2

Çizelge 3.2. (Devamı) Örneklerin pH değerleri

Edremit 2	9.6
Tatvan 2	9.7

3.1.3. Örneklerin ICP sonuçları

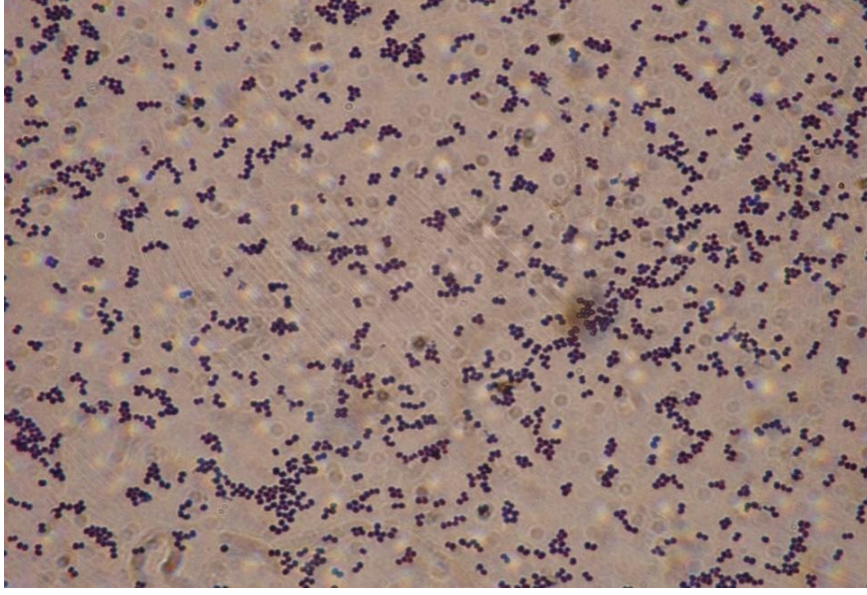
Analizler Perkin Elmer Optical Emission Spectrofotometer Optima 4300 DV cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. ICP analiz sonuçları

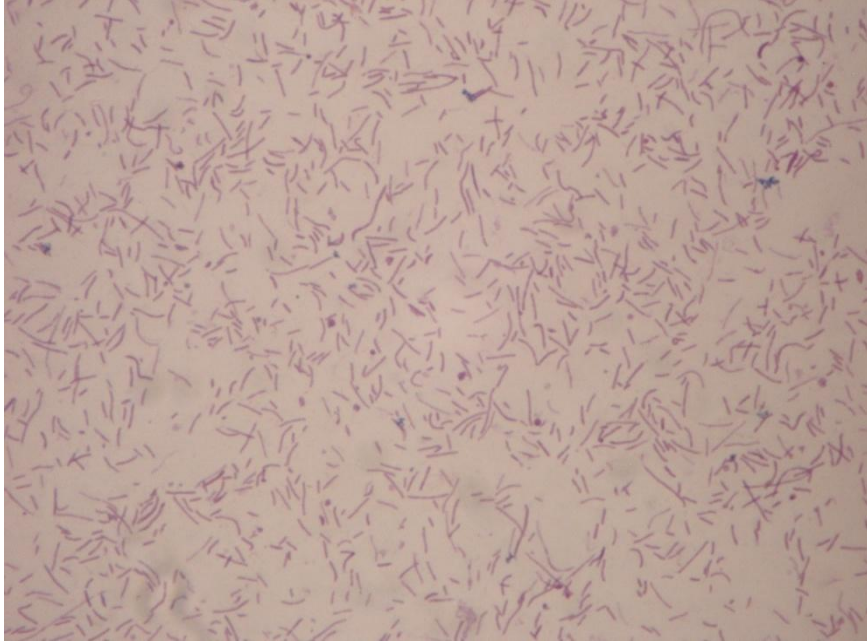
ÖRNEK	Na	K	Ca	Mg	Mn	Cd	Hg
Merkez	7003 ppm	430.4 ppm	<	86.25 ppm	<	169.5 ppm	12.07 ppb
Tatvan	8323 ppm	493.1 ppm	313 ppb	86.81 ppm	<	235.4 ppb	<
Ahlat	11870 ppm	721.2 ppm	95 ppb	87.26 ppm	<	214 ppb	<
Edremit	9221 ppm	647.1 ppm	380 ppb	87.24 ppm	<	256.4 ppb	<
Tatvan 2	7279 ppm	493.1 ppm	202 ppb	78.70 ppb	<	198.9 ppb	<
Edremit 2	8927 ppm	640.5 ppm	158 ppb	83.13 ppm	<	211.2 ppb	<

3.2. Mikroskopik İnceleme

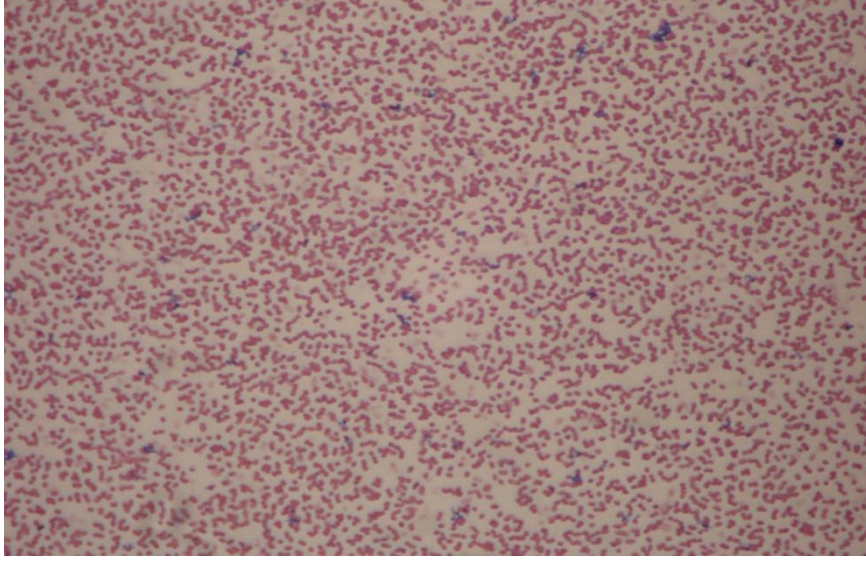
İzolatların gram boyamalarına göre gram pozitif ve negatif mikroorganizma gruplarının varlığı tespit edilmiştir. Boyamalar sonucunda uzun ve kısa basiller, kok şeklinde hücreler gözlemlenmiştir. Bu hücelere ait şekiller aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Gram pozitif kok şeklindeki hücreler



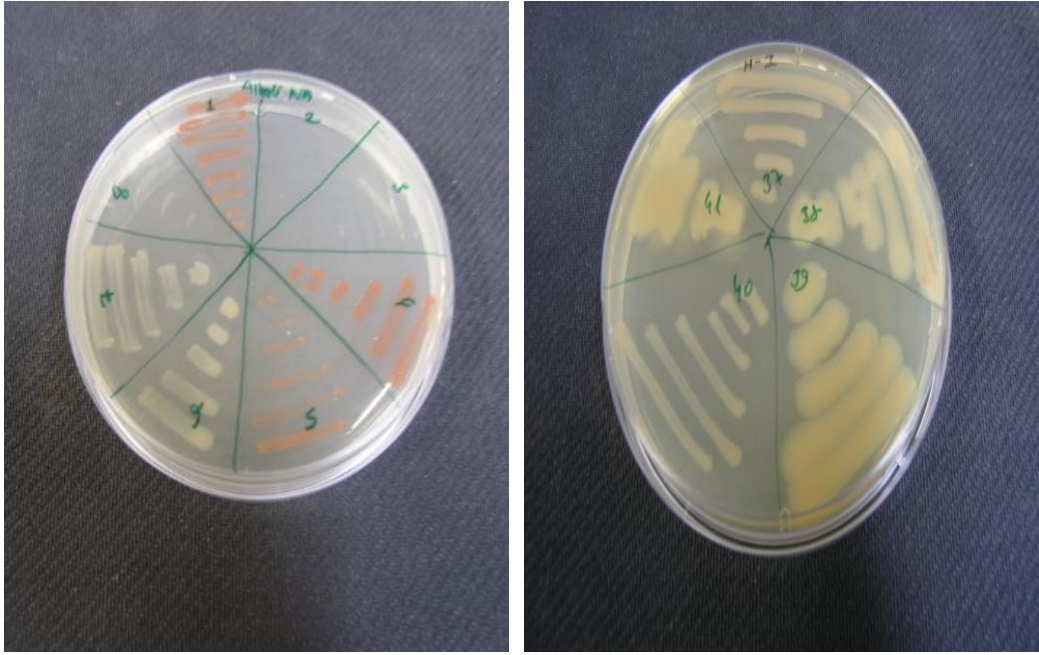
Şekil 3.2. Gram negatif uzun basiller şeklindeki hücreler



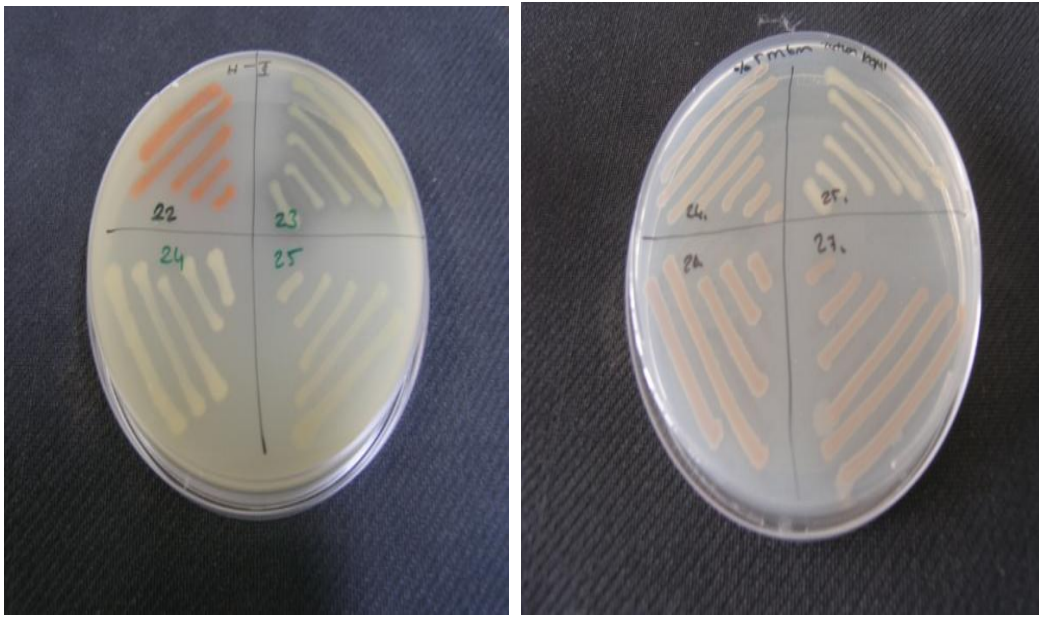
Şekil 3.3. Gram negatif kok şeklindeki hücreler

3.3. Su Örneklerinden Archaea ve Bacteria İzolasyonu ve Kültüre Alınmaları

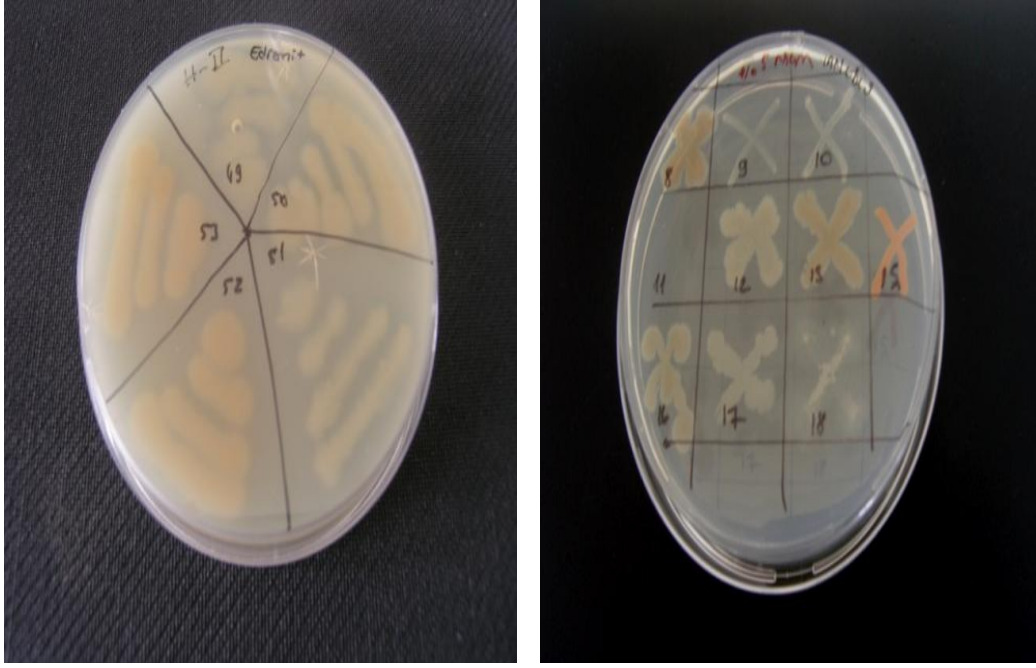
Ön denemelerde düşük oranda tuz içeren MGM-Alkalin nutrient agar, Horikoshi I ve II medium, Nişasta kazein agar, aktinomiset izolasyon besiyeri, Gauze agar ve gliserol yeast ekstrakt agar besiyerlerinin izolasyon için oldukça uygun oldukları belirlenmiş ve bu nedenle çalışma boyunca bu besiyerleri ile izolasyon yapılmıştır. Çalışma boyunca renk ve koloni morfoloji açısından farklı olduğu düşünülen 124 adet izolat seçilerek bunlar daha detaylıca çalışılmak üzere stoklanmışlardır. Aşağıdaki şekillerde farklı renk ve biçimli kolonilere sahip bazı izolatların çeşitli besiyerindeki görüntüleri verilmiştir.



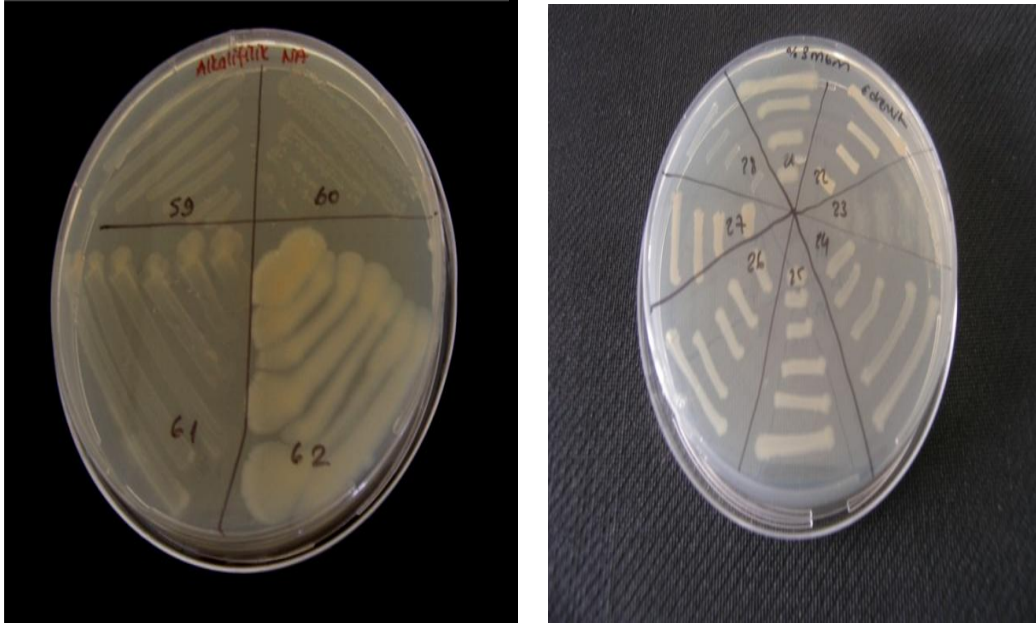
Şekil 3.4. Edremit ve Tatvan örneğinden izolatların alkalın nutrient agar ve Horikoshi I besiyerindeki görüntüleri



Şekil 3.5. Edremit ve Tatvan örneğinden izolatların Horikoshi I besiyeri ve % 5 MGM ' deki görüntüleri



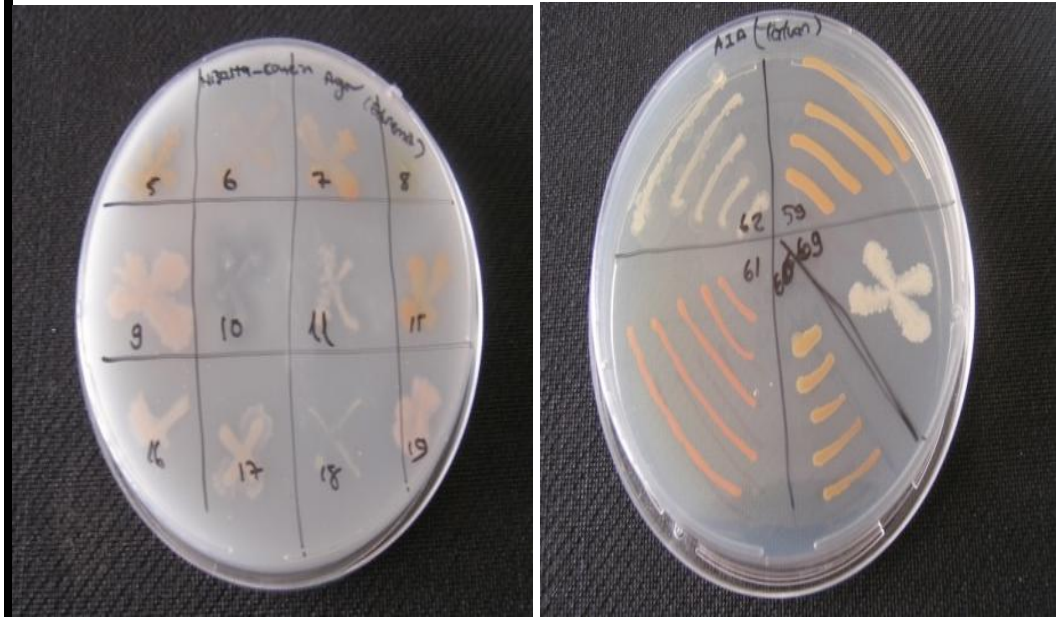
Şekil 3.6. Tatvan ve merkez örneğinden izolatların Horikoshi II besiyeri ve % 5 MGM 'deki görüntüleri



Şekil 3.7. Merkez ve Edremit örneğinden izolatların alkaline nutrient agar ve % 3 MGM 'deki görüntüleri



Şekil 3.8. Tatvan örneğinden izolatların aktinomiset izolasyon agardaki görüntüleri



Şekil 3.9. Edremit ve Tatvan örneğinden izolatların nişasta kazein agar ve aktinomiset izolasyon agardaki görüntüleri

3.4. İdentifikasyon

3.4.1. Nükleik asit analizine dayalı testler

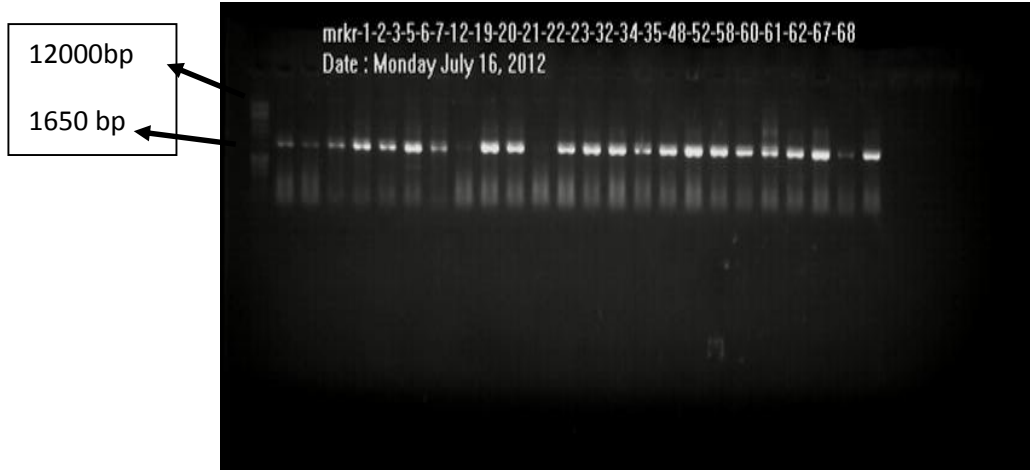
16S rRNA geni amplifikasyonu için izolatlardan DNA ekstraksiyonu

Çalışmada Van Gölü'nden izole edilen mikroorganizmaların 16S rRNA geni amplifikasyonları için kullanılan distile su içinde homojenizasyon sonrası kaynatma esasına dayanan yöntemin DNA ekstraksiyonu için yeterli olduğu görülmüştür. Ancak aktinomiset izolasyonu için hazırlanan besiyerlerinden izole edilen örnekler için bu yöntem etkili olmadığından bu örneklerden kit kullanılarak ekstraksiyon yapılmış ve sonuç alınmıştır.

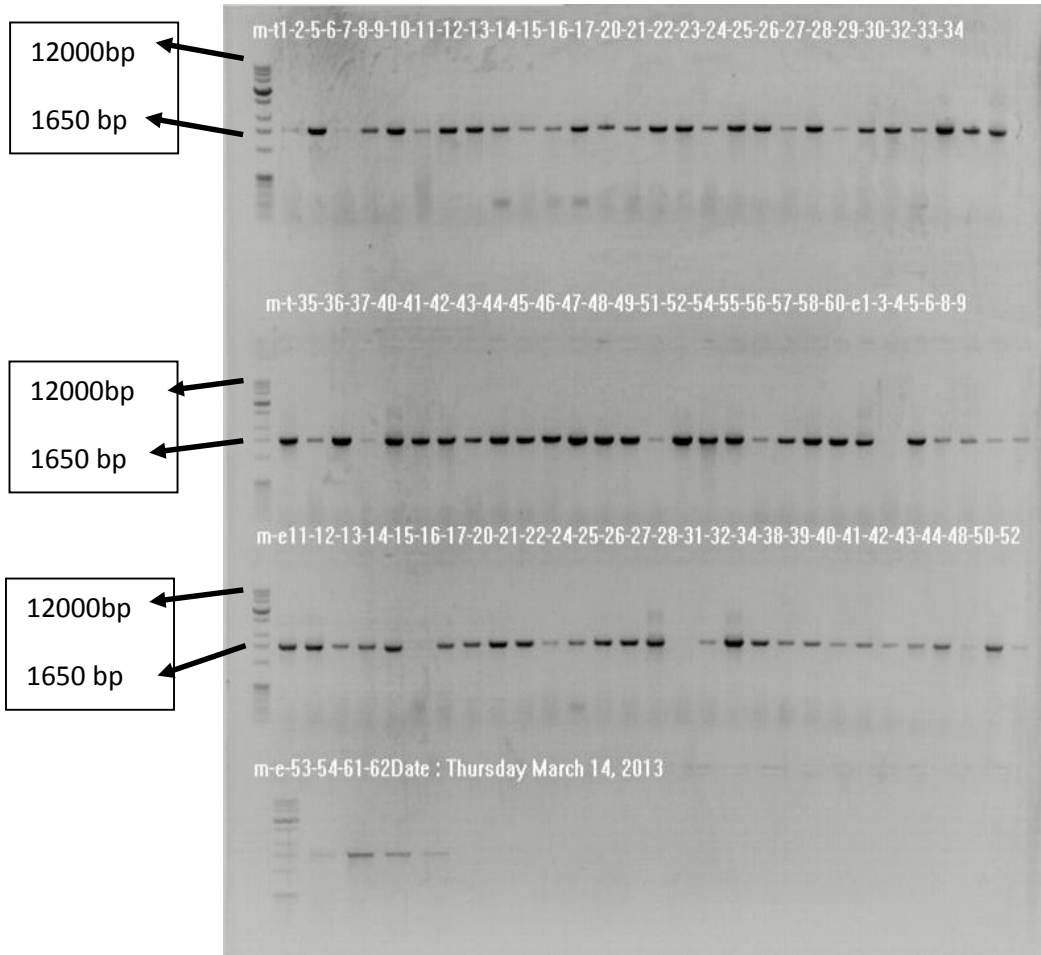
16S rRNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonu (İzolatların Archaea –Bacteria ayrımlarının yapılması)

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

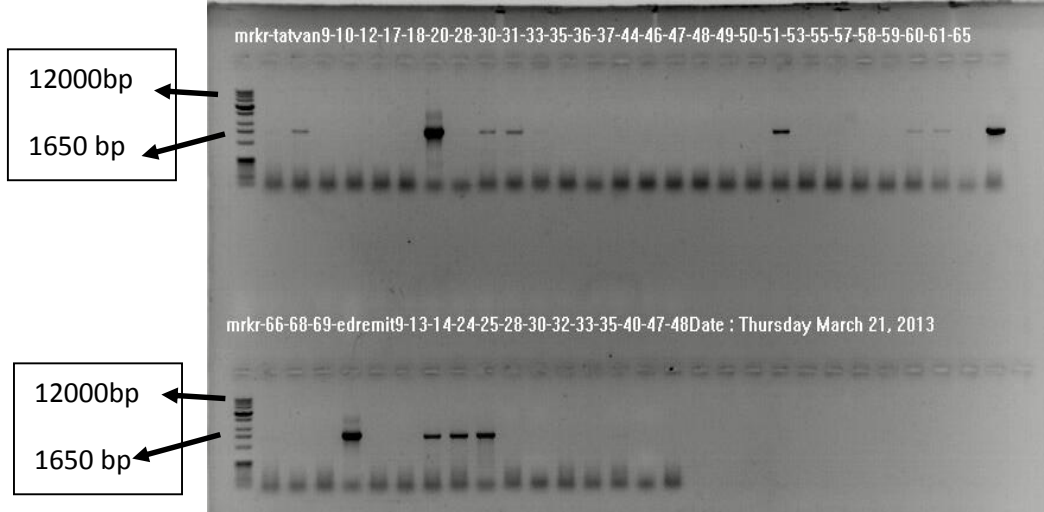
Her örnek için hem Archaea hem de Bacteria primer setleri ile PCR kurulmuş ve sadece Archaea ürünü veya sadece Bacteria ürünü elde edilerek öncelikle örneğin Archaea veya Bacteria olup olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 3.10 ve Şekil 3.11 Tatvan ve Edremit örneklerinden izole edilen kolonilerin Bacteria spesifik primerler ile gerçekleştirilen 16S PCR sonucunda yaklaşık 1500 bazlık ürün veren jel görüntüsü gösterilmiştir. Aynı izolatların Archaea spesifik primerler ile gerçekleştirilen 16S PCR'ında ürün elde edilememiştir. Şekil 3.12 ise aktinomiset izolasyonu için hazırlanan besiyerlerinden seçilen izolatlar için Bacteria spesifik primerler ile gerçekleştirilen 16S PCR sonucunda Tatvan 10-28-31-33-51-59-60-65 ve Edremit 9-24-25-28 no' lu izolatlardan pozitif sonuç elde edilmiştir. Ancak Archaea spesifik primerler ile gerçekleştirilen 16S PCR' ında ürün elde edilememiştir.



Şekil 3.10. Tatvan örneği Bacteria spesifik primer setleri ile 16 S PCR jel görüntüsü



Şekil 3.11. Tatvan ve Edremit 2. Örnekleme Bacteria spesifik primer setleri ile 16 S PCR jel görüntüsü



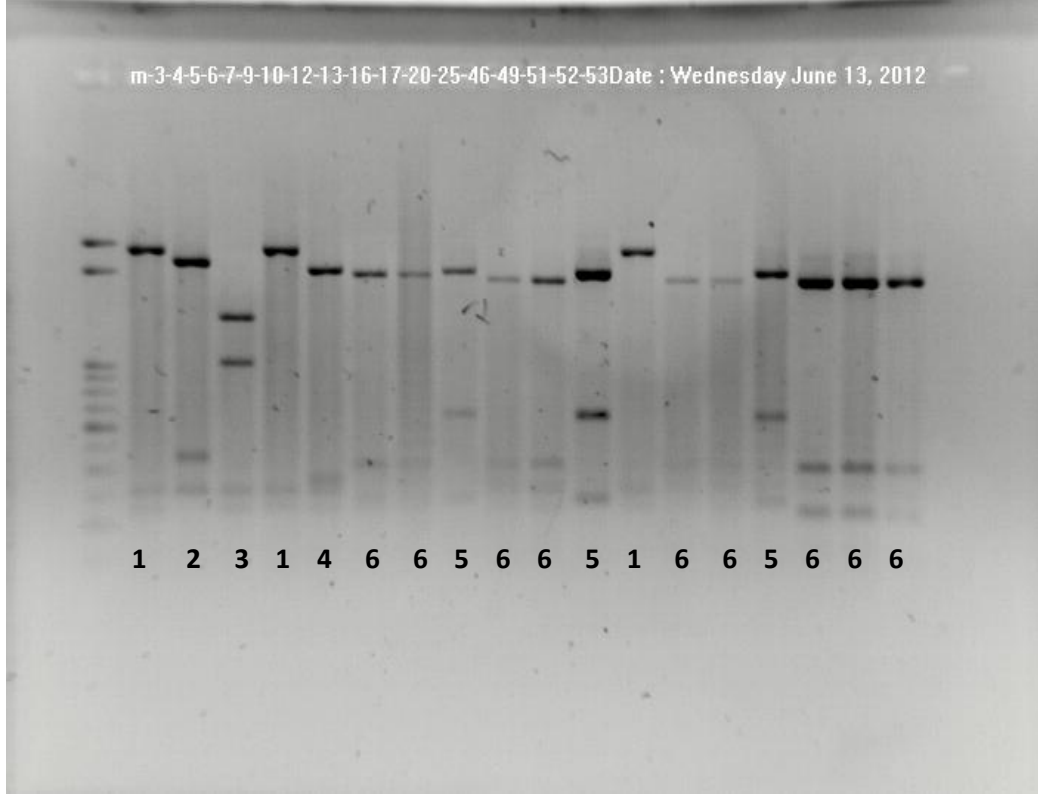
Şekil 3.12. Tatvan ve Edremit örnekleri aktinomiset izolasyon besiyerlerinden Bacteria spesifik primer setleri ile 16 S PCR jel görüntüsü

16S rRNA geni amplifikasyonu ürünlerinin enzimatik kesimi (ARDRA)

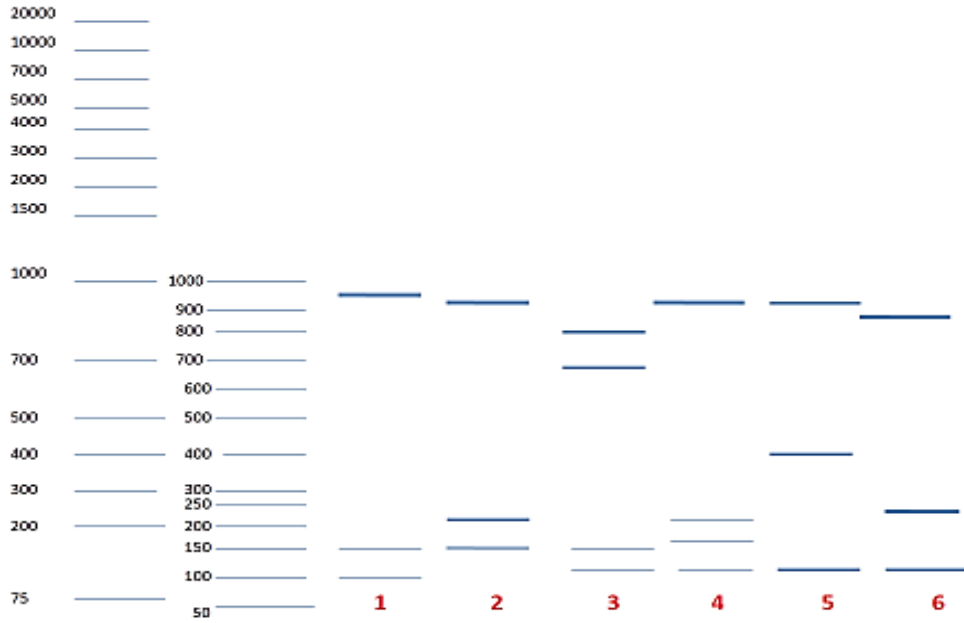
16S rRNA geni için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon analizleri için *Hinf* I enzimi kullanılmıştır.

Restriksiyon kesimleri sonrası örnekler %2 lik agaroz jele yüklenerek yürütülmüştür. İzolatlara ait 16S rRNA ürünleri için *Hinf*I enzimi ile kesilerek oluşan farklı profiller belirlenmiş ve profillere göre gruplandırma yapılmıştır. Bu gruplandırma sonrası farklı profiller gösteren izolatların hangileri olduğu belirlenerek dizi analizi yapılacak izolatlar seçilmiştir.

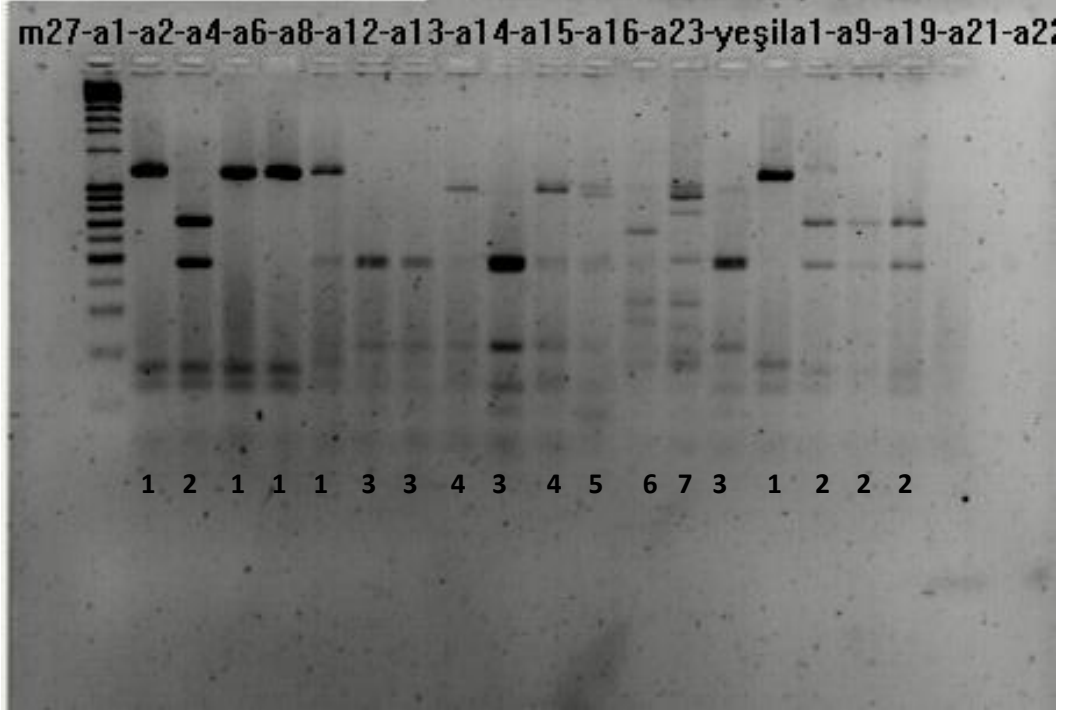
ARDRA sonuçlarına göre Merkez örneğinden 18 izolattan 6, Ahlat örneğinden 17 izolattan 7, Edremit örneğinden 34 izolattan 12, Tatvan örneğinden 24 izolattan 7 ve aktinomiset izolasyon besiyerleri ve 2. örneklemelerden 31 izolattan 8 bakteri profili elde edilmiştir. *Hinf* I enzimi ile gerçekleştirilen ARDRA işlemi sonrası farklı profillere ait jel görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.



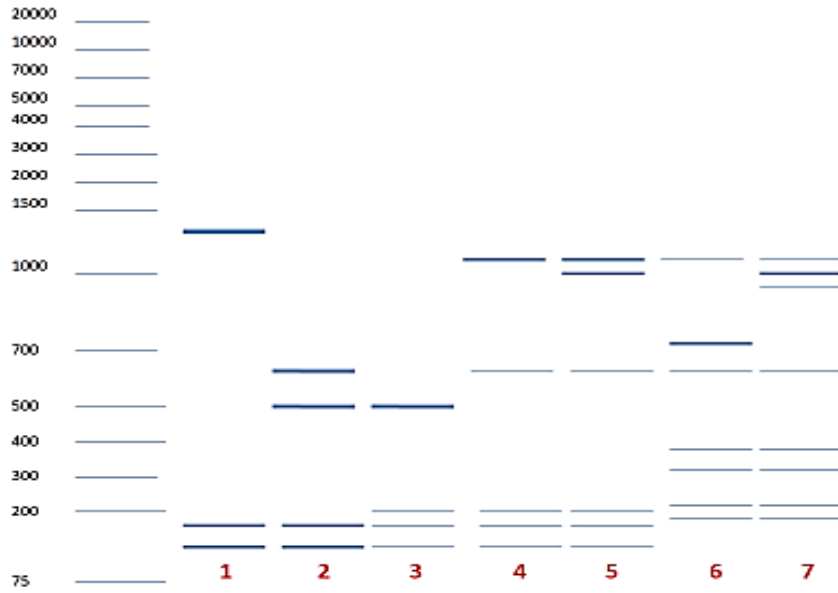
Şekil 3.13. Van Merkez Bacteria ürünlerinin *Hinf I* enzimi ile kesimi



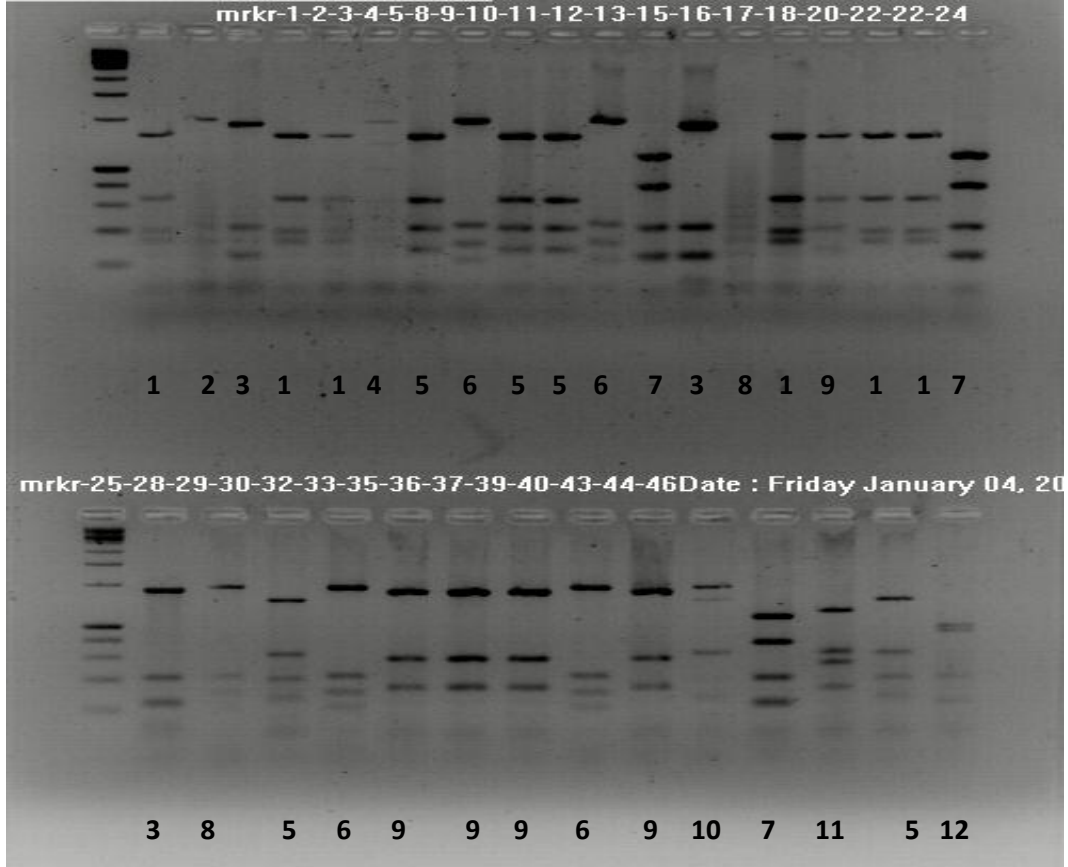
Şekil 3.14. Van Merkez örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının *Hinf I* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası



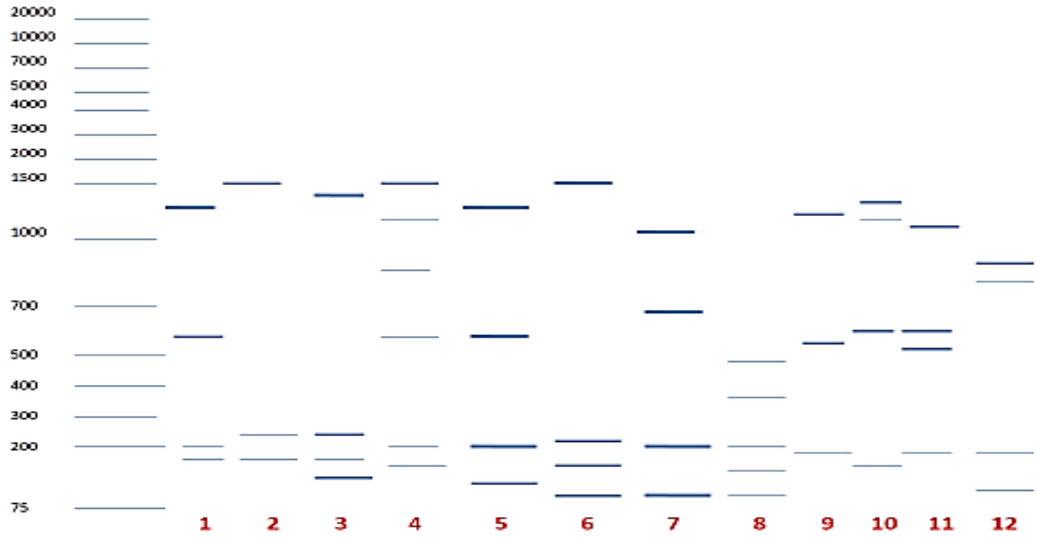
Şekil 3.15. Ahlat Bacteria ürünlerinin *HinfI* enzimi ile kesimi



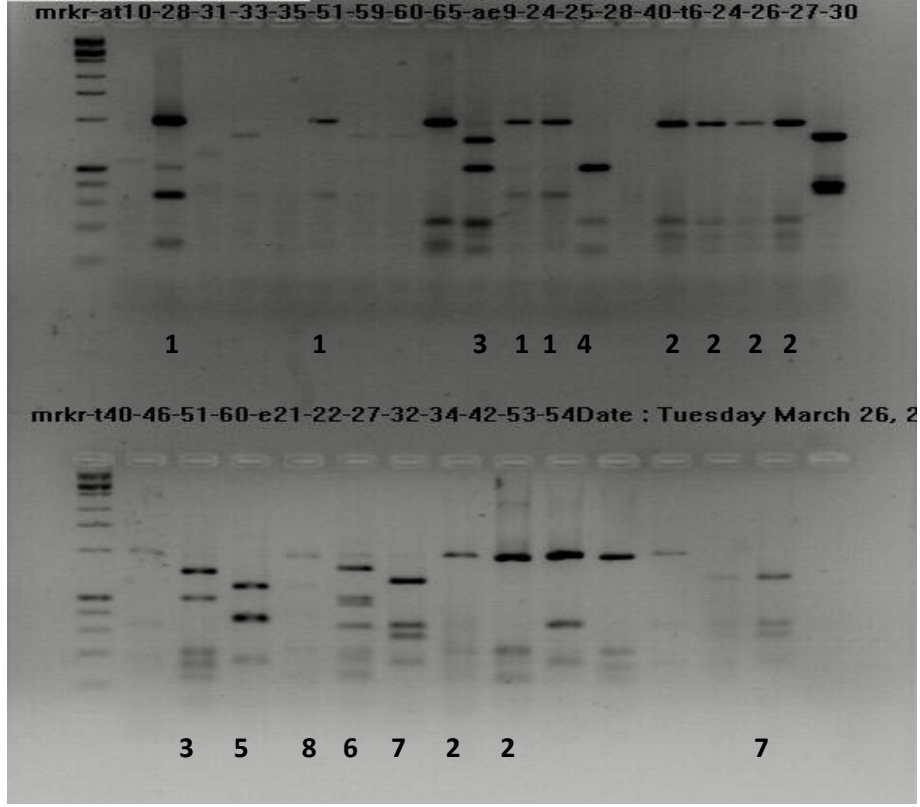
Şekil 3.16. Ahlat örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının *HinfI* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası



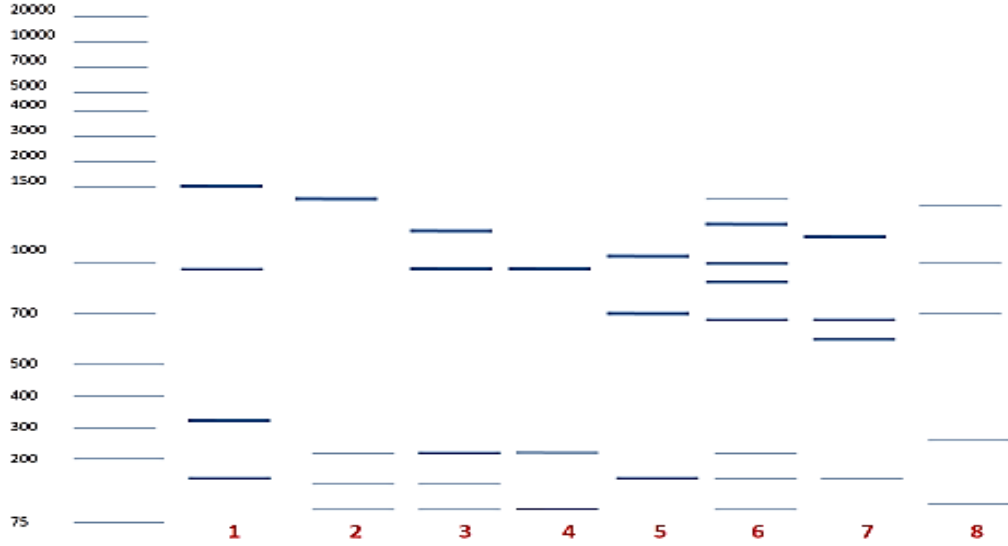
Şekil 3.17. Edremit Bacteria ürünlerinin *HinfI* enzimi ile kesimi



Şekil 3.18. Edremit örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının *HinfI* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası



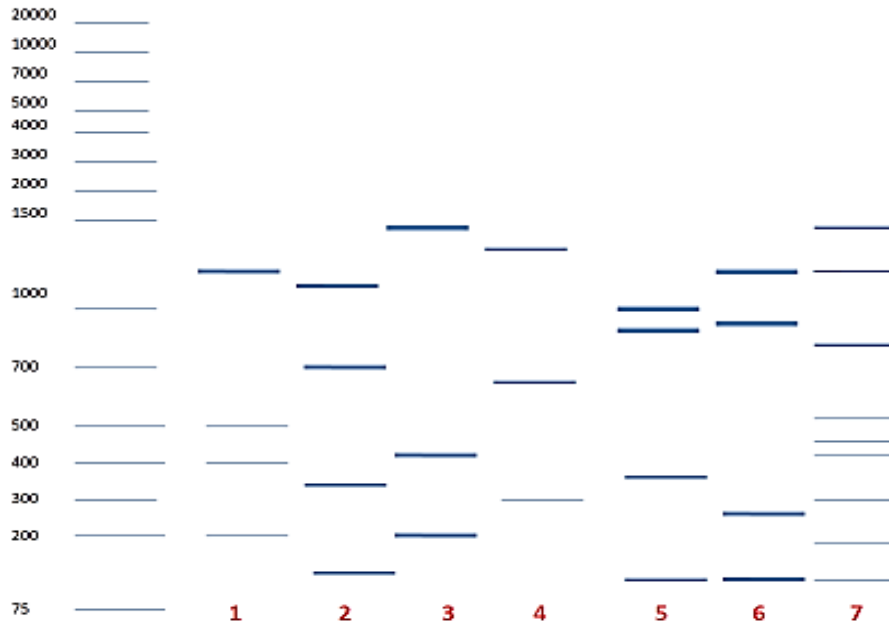
Şekil 3.19. Aktinomiset besi yerinden tatvan ve edremit 2.örnekleme Bacteria ürünlerinin *HinfI* enzimi ile kesimi



Şekil 3.20. Aktinomiset besi yerinden tatvan ve edremit 2.örnekleme örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının *HinfI* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternleri restriksiyon kesim haritası



Şekil 3.21. Tatvan Bacteria ürünlerinin *Hinf I* enzimi ile kesimi



Şekil 3.22. Tatvan örneklerinden elde edilen Bacteria izolatlarının *HinfI* enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası

PCR ürünlerinden dizi analizi

Kültür haline getirilmiş izolatlardan DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA'nın 16S rRNA geni PCR ile amplifiye edilerek bu ürünlerin direkt olarak dizi analizlerinin eldesi yoluna gidilmiştir. Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı ile bu elde edilen PCR ürünlerinin baz dizilerinin belirlenmesi amacıyla Beckman dizi analiz kitinde önerilen şartlar ile sonuçlar alınmıştır.

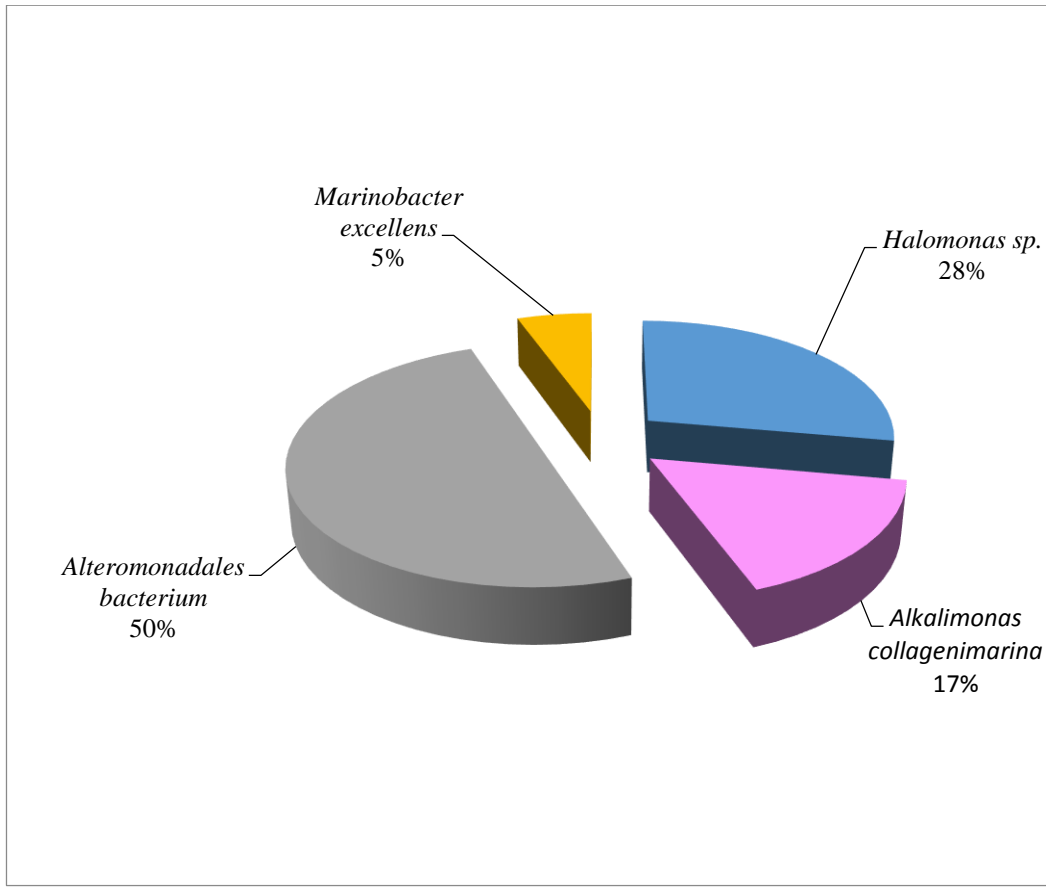
Bunların dizi analizler 21F, 27 F, 1492R ve 907R primerleri ile gerçekleştirilmiştir

Çizelge 3.4. Merkez profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları

İzolat No	Gen Bankasındaki En Yakın Temsilcisi	% Benzerlik	Gen Bankası Numarası
M-3	<i>Halomonas</i> sp. 10043 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98 (1172/1190)	<u>EU432575.1</u>
M-4	<i>Halomonas</i> sp. IB-559 partial 16S rRNA gene	%99 (1416/1437)	<u>AJ309560.1</u>
M-5	<i>Marinobacter excellens</i> strain KMM 3809 16S ribosomal RNA, complete sequence	%99 (1419/1432)	<u>R_025690.1</u>
M-7	<i>Halomonas</i> sp. 15-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99 (852/858)	<u>HM598402.1</u>
M-49	<i>Alkalimonas collagenimarina</i> strain AC40 (= JCM 14267, = NCIMB 14266) 16S ribosomal RNA, partial sequence	%98 (1424/1456)	<u>NR_041515.1</u>
M-51	Alteromonadales bacterium G-He6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%96 (1156/1209)	<u>EF554905.1</u>

Çizelge 3.5. Merkez profillerinden elde edilen izolatlar ve sayıları

İZOLAT	SAYI
<i>Halomonas</i> sp.	5
<i>Alkalimonas collagenimarina</i>	3
<i>Alteromonadales bacterium</i>	9
<i>Marinobacter excellens</i>	1



Şekil 3.23. Merkez örneğinden elde edilen izolatların dağılımını gösteren grafik

Çizelge 3.6. Tatvan profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları

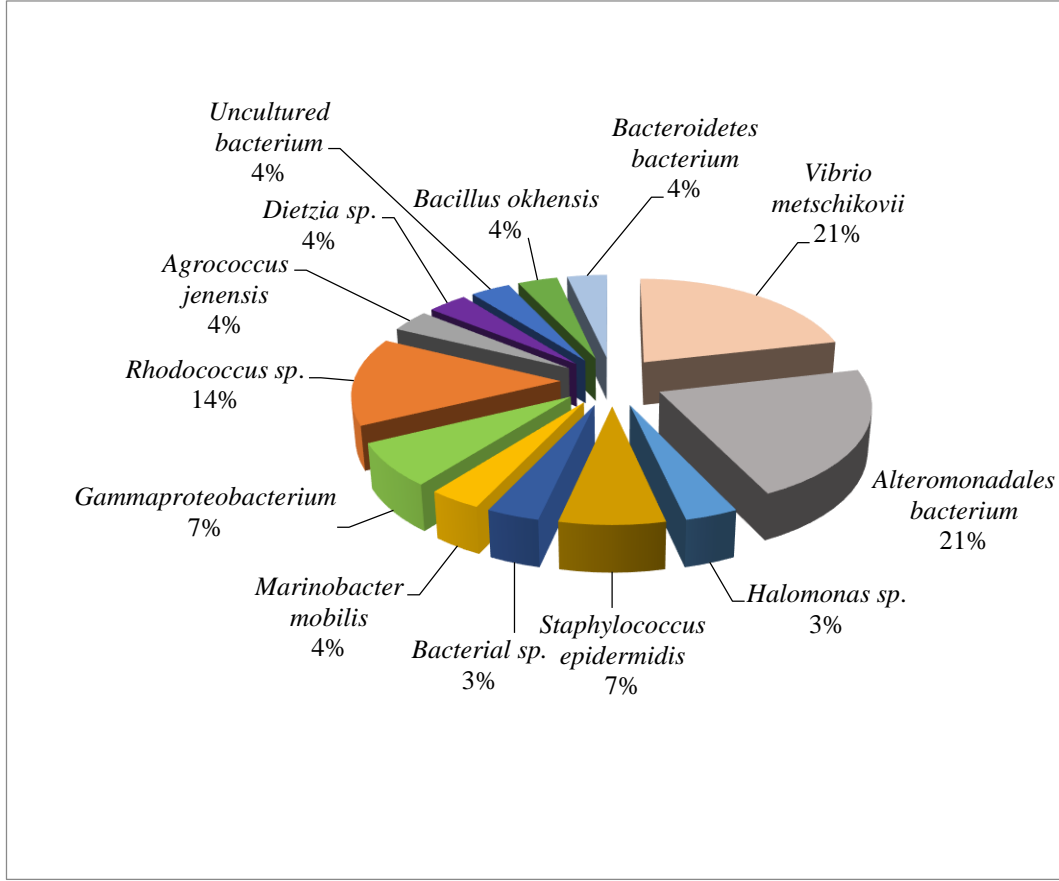
İzolat No	Gen Bankasındaki En Yakın Temsilcisi	% Benzerlik	Gen Bankası Numarası
T-23	Alteromonadales bacterium JK1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97 (1169/1203)	<u>EF554892.1</u>
T-32	<i>Halomonas</i> sp. AMP-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97 (1145/1178)	<u>HM104378.1</u>
T-34	<i>Staphylococcus epidermidis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate: T7-3M	%97 (1166/1198)	<u>AB617572.1</u>
T-35	<i>Bacterial</i> sp. 16S rRNA gene (Lake Nakuru isolate 52N3)	%98 (1173/1191)	<u>X92134.1</u>
T-52	<i>Marinobacter mobilis</i> strain B17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95 (1090/1144)	<u>GQ214550.1</u>
T-58	<i>Vibrio metschnikovii</i> strain F5-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99 (475/477)	<u>JX409930.1</u>
T-60	Gamma proteobacterium E-292 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98 (1159/1187)	<u>FJ764782.1</u>
T-62	Uncultured bacterium clone SINI906 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97 (1157/1198)	<u>HM127225.1</u>
2T-6	Gamma proteobacterium M6-24D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95 (795/833)	<u>AY730243.1</u>
2T-30	<i>Bacillus okhensis</i> strain Kh10-101 16S ribosomal RNA, partial sequence	%98 (892/910)	<u>NR_043484.1</u>

Çizelge 3.6. (Devamı) Tatvan profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları

2T-40	Bacteroidetes bacterium AKB-K1-255 partial 16S rRNA gene, type strain K1-255T	%88 (712/811)	FM179649.2
AT-28	Uncultured bacterium clone SINI1021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97 (930/960)	HM126688.1
AT-33	<i>Rhodococcus</i> sp. P5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94 (852/904)	JQ928360.1
AT-37	<i>Dietzia</i> sp. SG-3 gene for 16S rRNA, partial sequence	%98 (663/675)	AB126693.1
AT-46	<i>Agrococcus jenensis</i> strain 1RN-3D2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98 (666/682)	EU379252.1
AT-49	<i>Rhodococcus</i> sp. A105-53B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97 (595/614)	KC422659.1
AT-59	<i>Rhodococcus</i> sp. Dza15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98 (916/930)	JQ977264.1
AT-63	<i>Rhodococcus</i> sp. Dza15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98 (954/960)	JQ977264.1
AT-65	<i>Pseudomonas</i> sp. 1_C16_29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97 (653/670)	EF540457.1

Çizelge 3.7. Tatvan profillerinden elde edilen izolatlar ve sayıları

İZOLAT	SAYI
<i>Vibrio metschikovii</i>	6
<i>Alteromonadales bacterium</i>	6
<i>Halomonas</i> sp.	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Bacterial</i> sp.	1
<i>Marinobacter mobilis</i>	1
<i>Gammaproteobacterium</i>	2
<i>Rhodococcus</i> sp.	4
<i>Agrococcus jenensis</i>	1
<i>Dietzia</i> sp.	1
<i>Uncultured bacterium</i>	1
<i>Bacillus okhensis</i>	1
<i>Bacteroidetes bacterium</i>	1



Şekil 3.24. Tatvan örneğinden elde edilen izolatların dağılımını gösteren grafik

Çizelge 3.8. Ahlat profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları

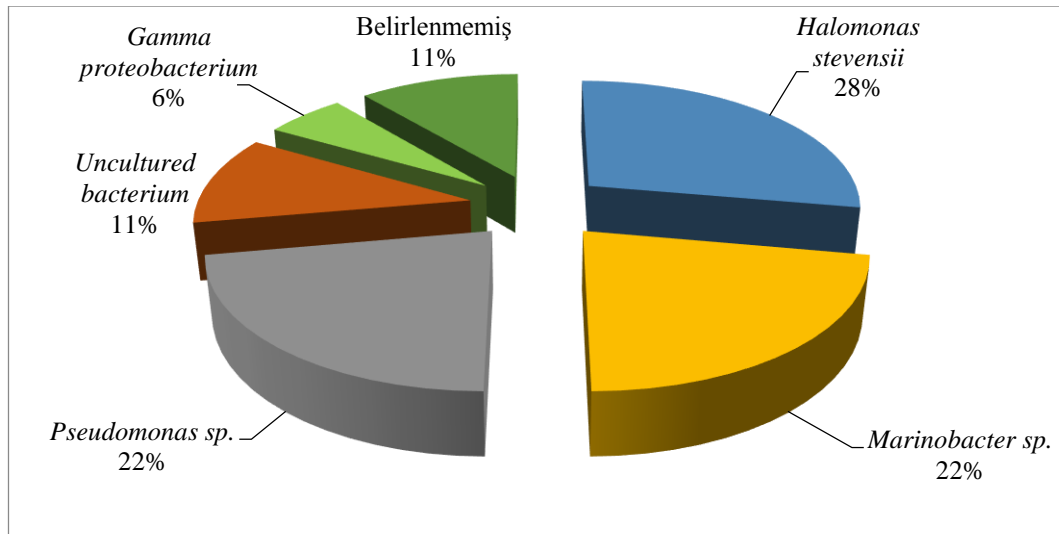
İzolat No	Gen Bankasındaki En Yakın Temsilcisi	% Benzerlik	Gen Bankası Numarası
A-9	<i>Pseudomonas</i> sp. AB17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97 (1158/1191)	EF554868.1
A-15	Uncultured bacterium clone TX4CB_97 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%93 (1024/1100)	FJ152966.1
A-19	<i>Halomonas stevensii</i> partial 16S rRNA gene, strain T49407	%98 (1159/1187)	AM941394.3

Çizelge 3.8. (Devamı) Ahlat profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları

A-21	<i>Marinobacter</i> sp. LNM-5 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	%97 (1154/1184)	AB758589.1
A-23	Gamma proteobacterium E-116 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95 (1129/1186)	FJ764790.1

Çizelge 3.9. Ahlat profillerinden elde edilen izolatlar ve sayıları

İZOLAT	SAYI
<i>Halomonas stevensii</i>	5
<i>Marinobacter</i> sp.	4
<i>Pseudomonas</i> sp.	4
Uncultured bacterium	2
Gamma proteobacterium	1
Belirlenmemiş	2



Şekil 3.25. Ahlat örneğinden elde edilen izolatların dağılımını gösteren grafik

Çizelge 3.10. Edremit profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları

İzolat No	Gen Bankasındaki En Yakın Temsilcisi	% Benzerlik	Gen Bankası Numarası
E-4	<i>Belliella</i> sp. LW3 16S rRNA gene, strain LW3	%98(1067/1094)	<u>FM956478.1</u>
E-11	<i>Alkalimonas delamerensis</i> strain :1E1 = CBS391.94 = DSM18314 = CGMCC16297 16S r >emb X92130.2 <i>Alkalimonas delamerensis</i> 16S rRNA gene, type strain 1E1T	%98(1019/1038)	<u>NR_044879.1</u>
E-20	<i>Alkalimonas delamerensis</i> strain :1E1 = CBS391.94 = DSM18314 = CGMCC16297 16S r >emb X92130.2 <i>Alkalimonas delamerensis</i> 16S rRNA gene, type strain 1E1T	%98(892/914)	<u>NR_044879.1</u>
E-23	Gamma proteobacterium E-116 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95(1129/1186)	<u>FJ764790.1</u>
E-25	Alteromonadales bacterium G-He6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98(1012/1032)	<u>EF554905.1</u>
E-36	Gamma proteobacterium O-010 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98(1029/1034)	<u>DQ812540.1</u>

Çizelge 3.10. (Devamı) Edremit profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları

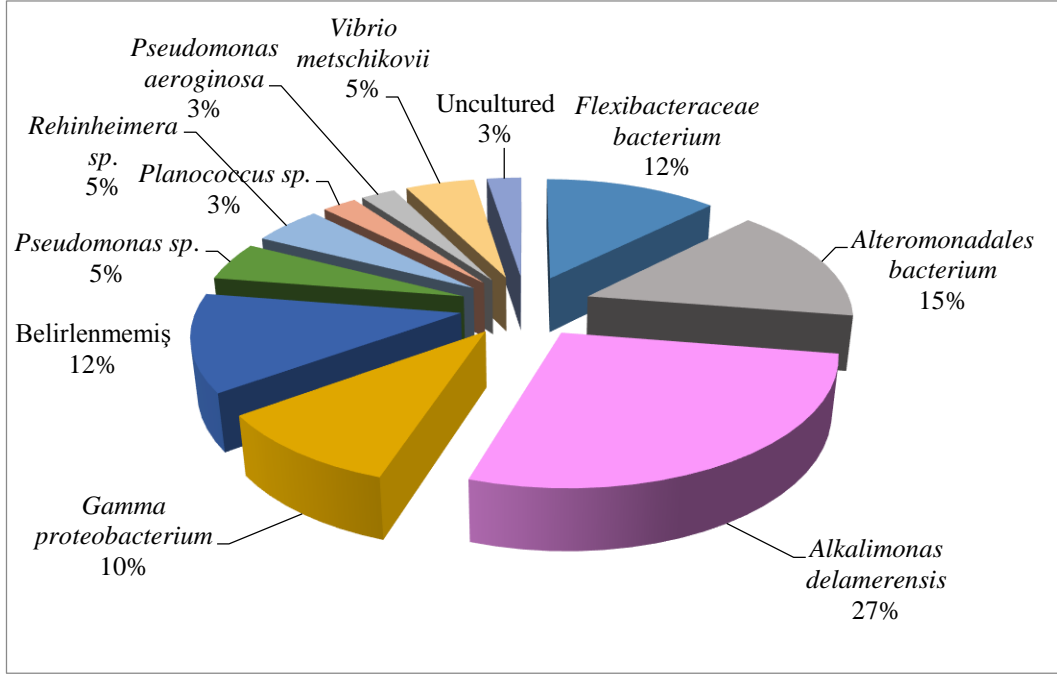
E-39	<i>Alkalimonas delamerensis</i> strain :1E1 = CBS391.94 = DSM18314 = CGMCC16297 16S r >emb X92130.2 <i>Alkalimonas delamerensis</i> 16S rRNA gene, type strain 1E1T	%92(616/667)	<u>NR_044879.1</u>
E-40	Alteromonadales bacterium DN3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97(936/966)	<u>FJ838764.1</u>
E-43	<i>Vibrio metschnikovii</i> strain SU1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%98(658/671)	<u>HQ658055.1</u>
2E-21	<i>Vibrio metschnikovii</i> strain SU1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99(892/901)	<u>HQ658055.1</u>
2E-22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ARa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%91(508/561)	<u>JX406332.1</u>
2E-32	<i>Planococcus</i> sp. Hh18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95(718/755)	<u>JX949200.1</u>
2E-52	Uncultured bacterium clone LSH_B42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97(675/698)	<u>HM582770.1</u>
AE-9	<i>Pseudomonas</i> sp. BWDY-40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%83(760/920)	<u>DQ200853.1</u>

Çizelge 3.10. (Devamı) Edremit profillerinden elde edilen dizi analizi sonuçları

AE-24	<i>Rheinheimera</i> sp. TS-T4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97(952/979)	<u>KC762310.1</u>
AE-28	<i>Pseudomonas</i> sp. Ri83 partial 16S rRNA gene, strain Ri83	%98(987/1005)	<u>AM905940.1</u>

Çizelge 3.11. Edremit profillerinden elde edilen izolatlar ve sayıları

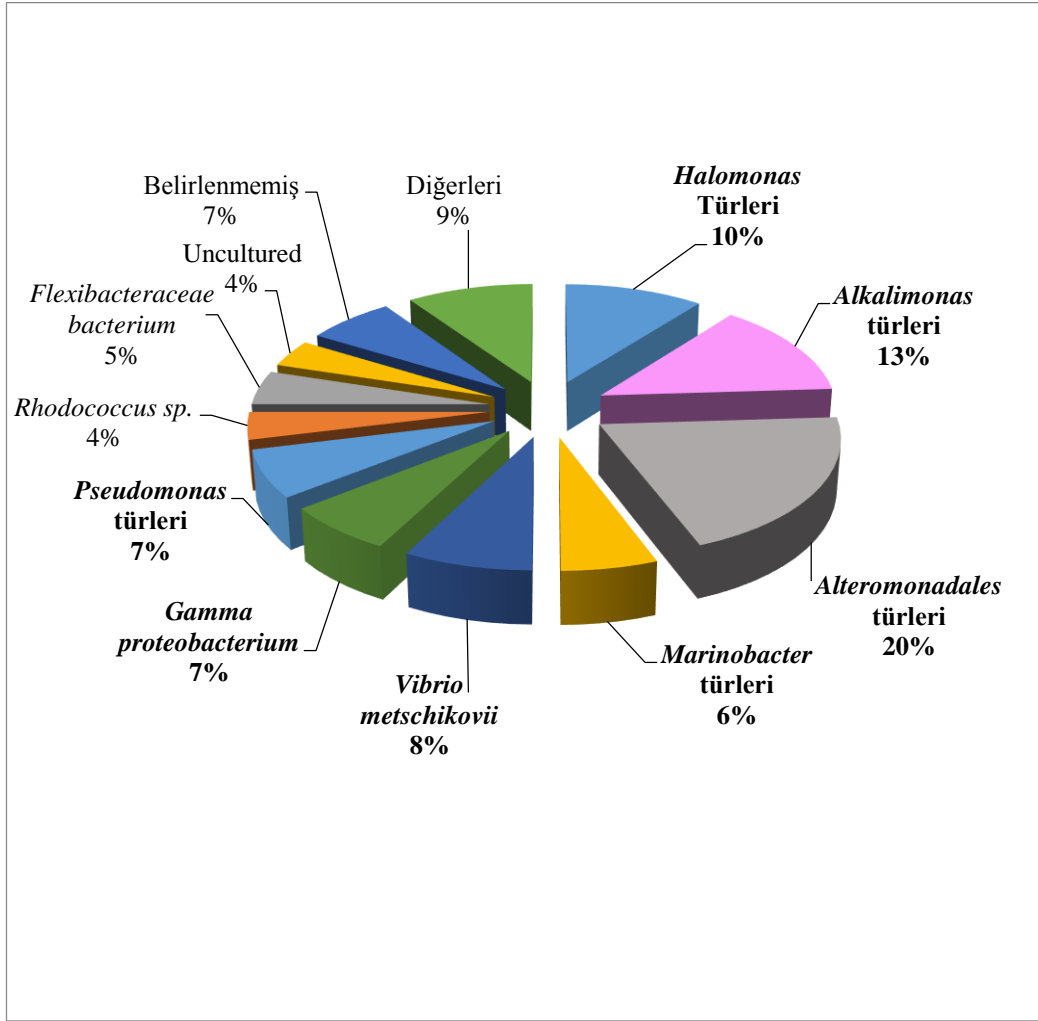
İZOLAT	SAYI
<i>Flexibacteraceae bacterium</i>	5
<i>Alteromonadales bacterium</i>	6
<i>Alkalimonas delamerensis</i>	11
<i>Gamma proteobacterium</i>	4
Belirlenmemiş	5
<i>Pseudomonas</i> sp.	2
<i>Rheinheimera</i> sp.	2
<i>Planococcus</i> sp.	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Vibrio metschikovi</i>	2
Uncultured	1



Şekil 3.26. Edremit örneğinden elde edilen izolatların dağılımını gösteren grafik

Çizelge 3.12. Van gölü profillerinden elde edilen izolatlar ve sayıları (Toplam)

İZOLAT	SAYI
<i>Halomonas</i> Türleri	11
<i>Alkalimonas</i> türleri	14
<i>Alteromonadales</i> türleri	21
<i>Marinobacter</i> türleri	6
<i>Vibrio metschikovii</i>	8
<i>Gamma proteobacterium</i>	7
<i>Pseudomonas</i> türleri	7
<i>Rhodococcus</i> sp.	4
<i>Flexibacteraceae bacterium</i>	5
Uncultured	4
Belirlenmemiş	7
Diğerleri	10

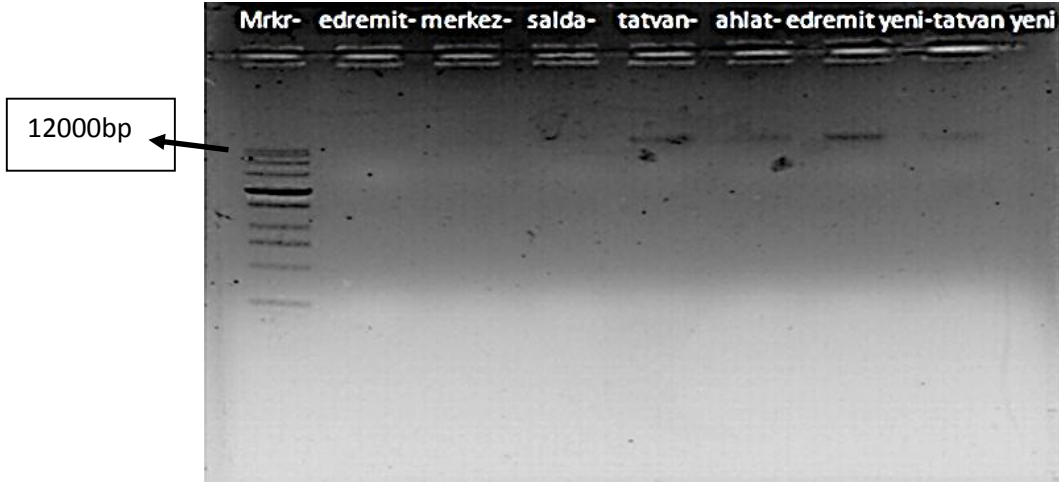


Şekil 3.27. Van Gölü izolatlarının genel dağılımını gösteren grafik

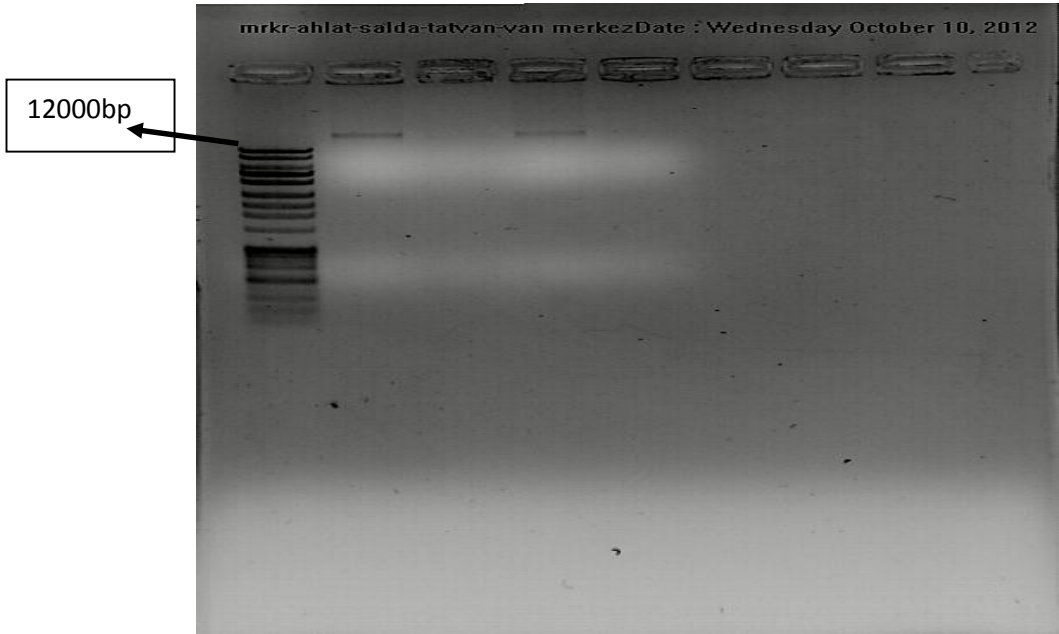
3.5. Mikrobiyal Kommünite Analizleri

3.5.1. Su örneklerinden DNA ekstraksiyonu

Van Gölü'nün Merkez, Edremit, Ahlat, Tatvan kıyılarından alınan su örneklerinden genomik DNA izolasyonu uygun ekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.28. Su örneklerinden genomik DNA izolasyonu



Şekil 3.29. Su örneklerinden DNA ekstraksiyonu

3.5.2. Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE)

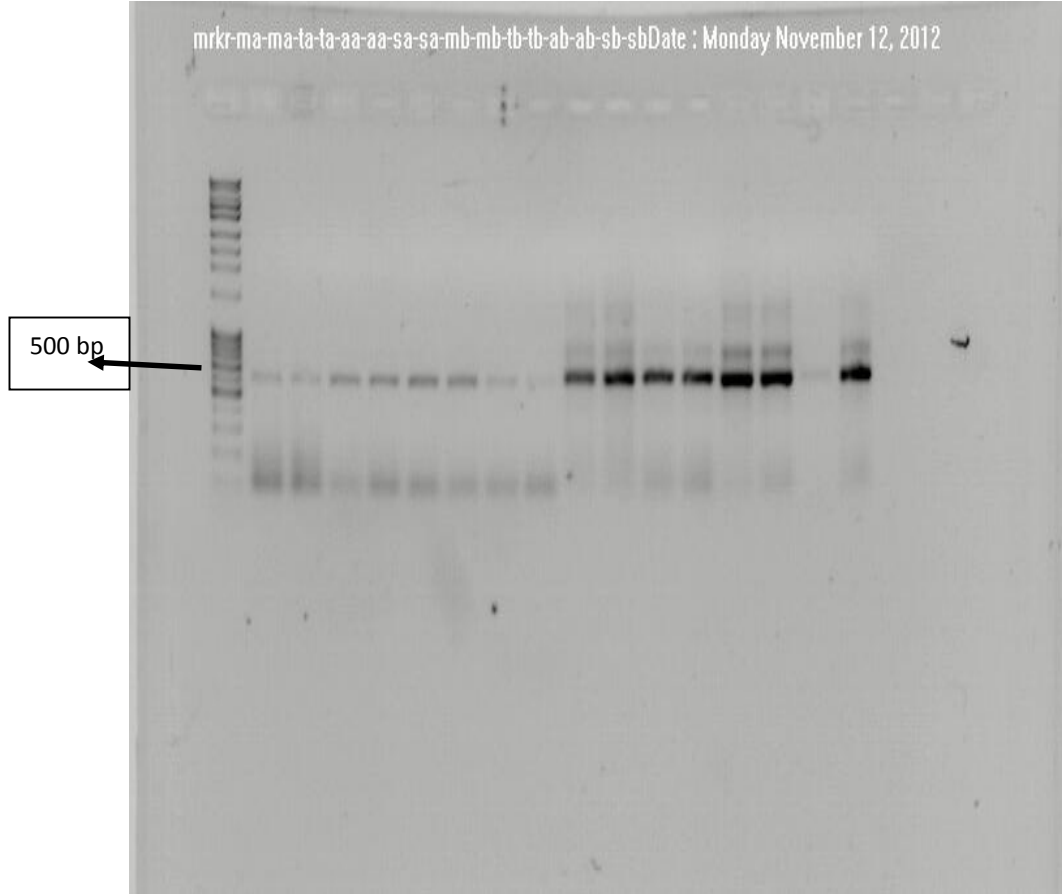
16S rRNA geninin DGGE analizi için amplifikasyonu

DGGE analizi için 16S geninin amplifikasyonu sonucu elde edilen ortalama 500 bazlık 16S PCR ürünleri %1'lik jellerde gözlenmişlerdir.

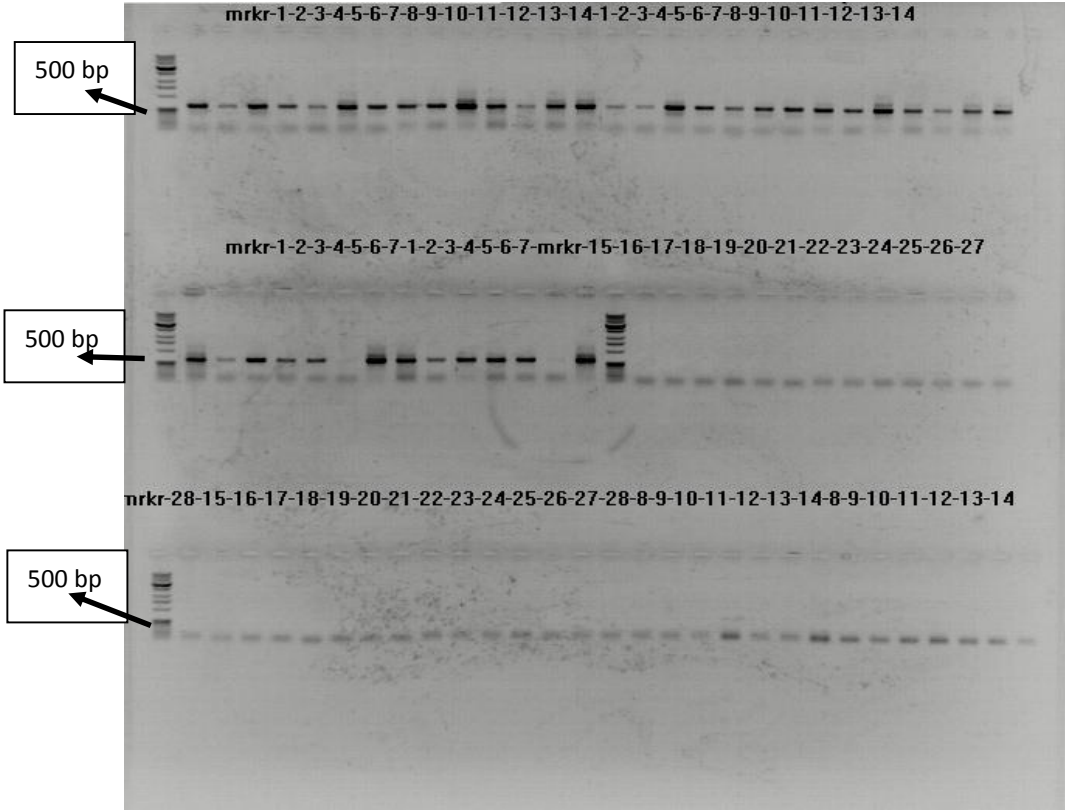
DGGE jeline yüklemek için yeterli olup olmadığını kontrol etmek için Low Mass DNA ladder (İnvitrogen) eşliğinde DGGE jeline yüklenecek örnekler

%1' lik agaroz jelde yürütülmüştür. DGGE jeline yüklenecek PCR ürün miktarı 400-500 ng olacak şekilde hesaplanmıştır.

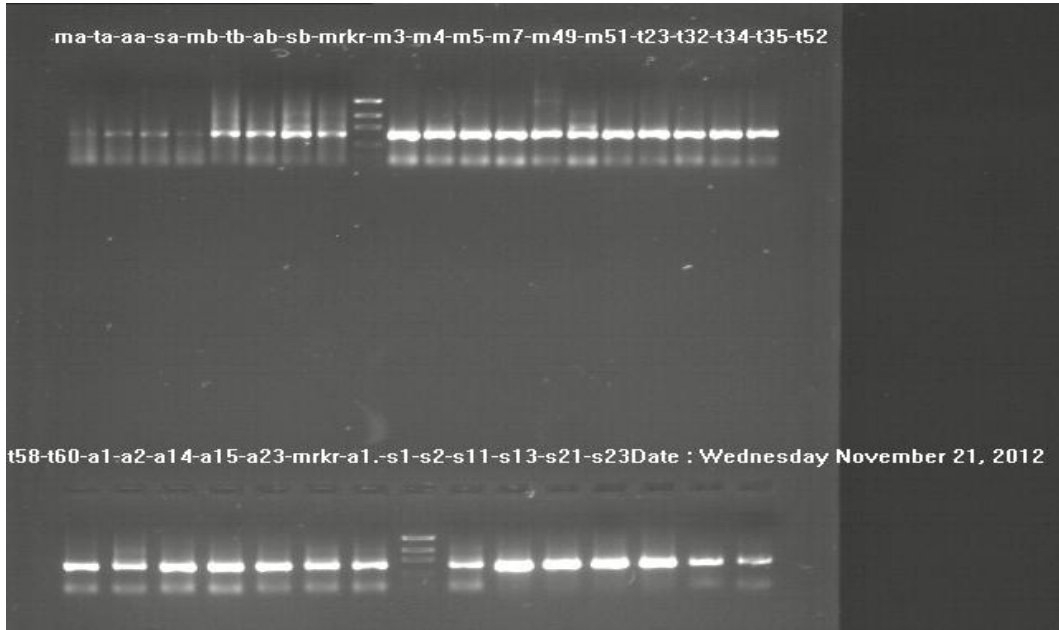
Denatüre edici gradient jel elektroforez sistemi hazırlanarak örneklerdeki popülasyonların çeşitlilikleri jel profilleri ile belirlenmiştir ve belirlenen bu profillerden bantlar kesilerek re-PCR yapılmış ve elde edilen ortalama 500 bazlık ürünlerin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir



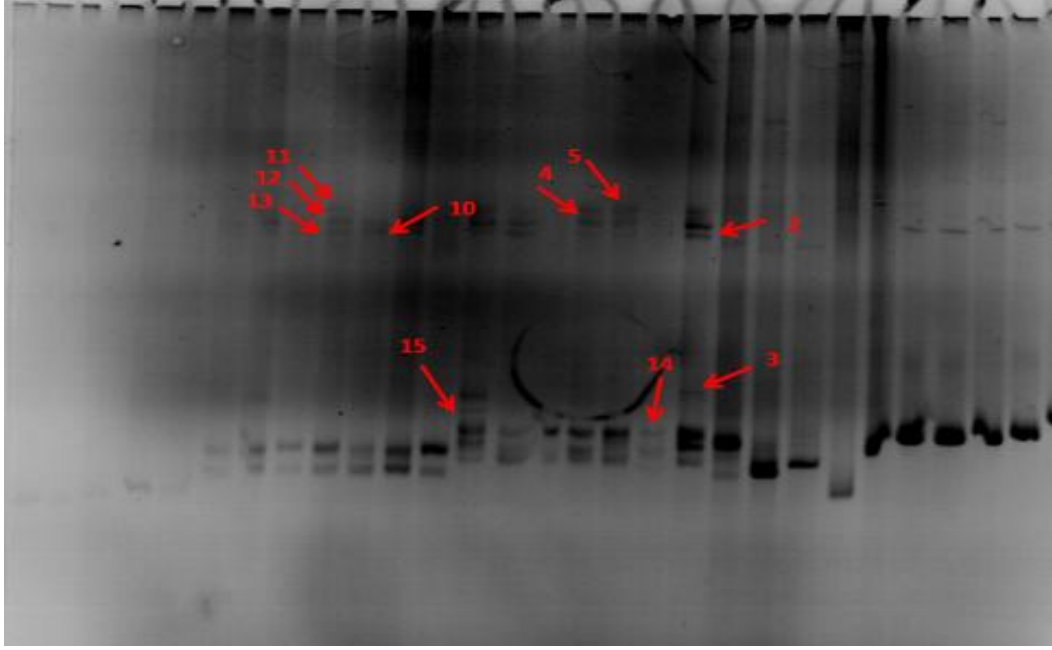
Şekil 3.30. Su örneklerinden elde edilen DNA' lardan Archaea ve Bacteria için DGGE-16S PCR jel görüntüsü



Şekil 3.31. Su örneklerinden elde edilen DNA' lardan Archaea ve Bacteria için DGGE-16S PCR jel görüntüsü



Şekil 3.32. DGGE jeline yüklenecek 16S PCR ürününün hesaplanması için elde edilen jel görüntüsü (Su örnekleri ve izolatlardan)



Şekil 3.33. DGGE jel görüntüsü

Çizelge 3.13: DGGE bantlarından elde edilen dizi analizi sonuçları

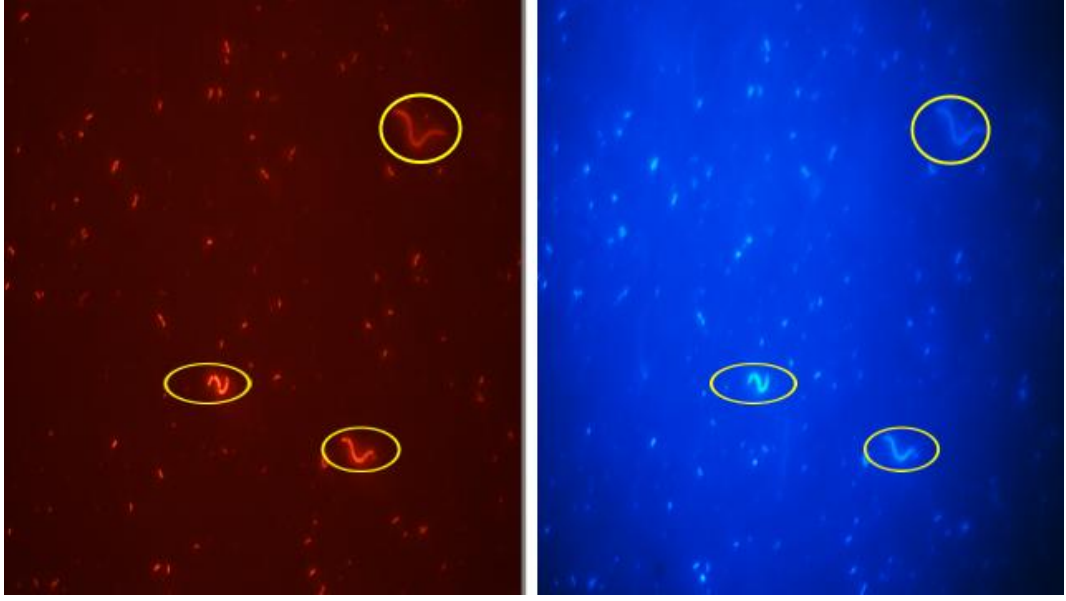
İzolat No	Gen Bankasındaki En Yakın Temsilcisi	% Benzerlik	Gen Bankası Numarası
2	Uncultured bacterium clone BBD-Nov08-1BB-44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%92 487/528	GU472295.1
3	Uncultured bacterium clone 5o46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95 497/524	EU644798.1
4	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain KNUC9021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%89 483/541	JF505955.1
5	<i>Citrobacter</i> sp. P074 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95 482/509	KC252814.1

Çizelge 3.13. (Devamı) DGGE bantlarından elde edilen dizi analizi sonuçları

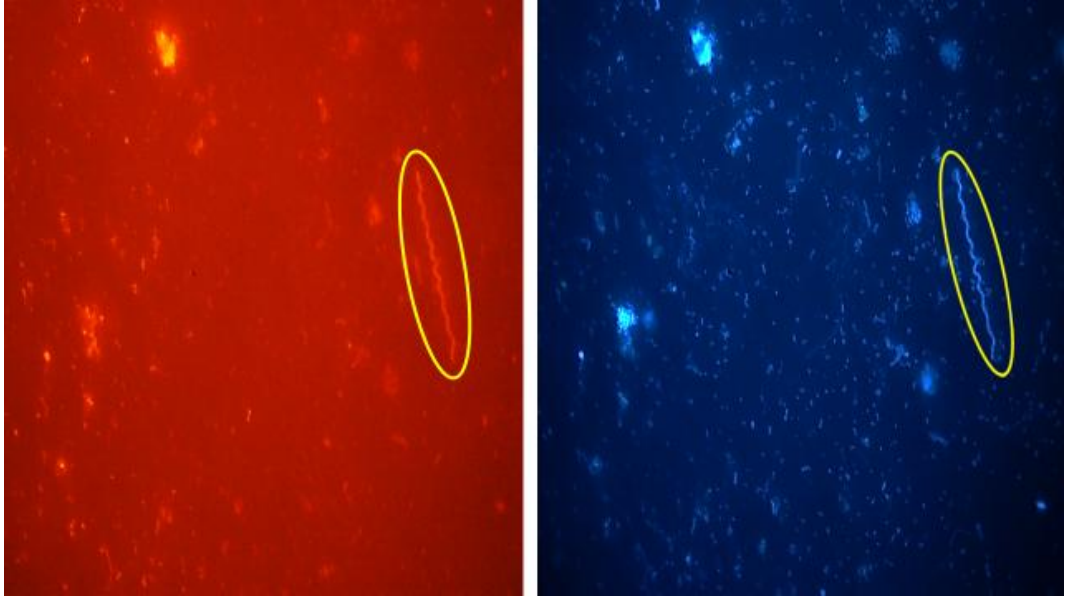
10	Uncultured bacterium clone SINP1135 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%94 479/512	HM127404.1
11	<i>Citrobacter</i> sp. P074 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95 481/491	KC252814.1
12	Uncultured bacterium clone G13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99 476/483	HQ703536.1
13	Uncultured bacterium clone 209-D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%92 345/376	KC136915.1
14	Uncultured bacterium DGGE gel band C-2_Bac_a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%95 416/440	EF622424.1
15	Uncultured bacterium clone D11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%74 189/256	JF683447.1

3.5.3. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) boyama

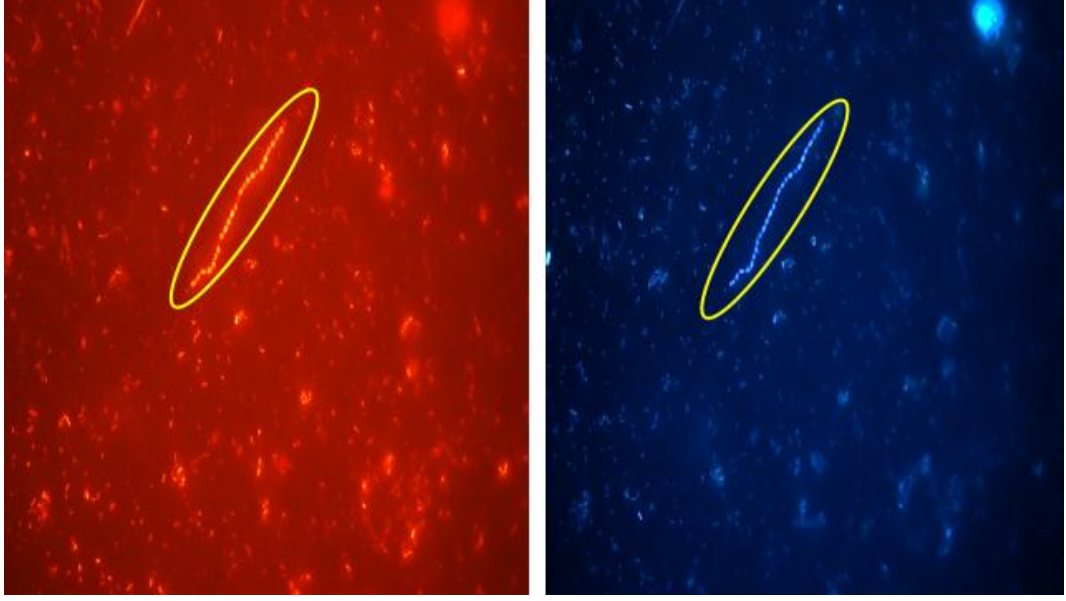
Van Gölü örnekleme bölgelerinden Bacteria sayımı gerçekleştirmek için Eub 338, Archaea sayımını gerçekleştirmek için Arc 344 ve Arc 915 problemleri kullanılmıştır. Ayrıca alfa-beta ve gama proteobacteria varlığının belirlenmesi için bunlara özgü problemler kullanılmıştır. Aşağıda bu problemlere ait floresan mikroskopu görüntüleri ve DAPI ile toplam hücre sayıları verilmiştir.



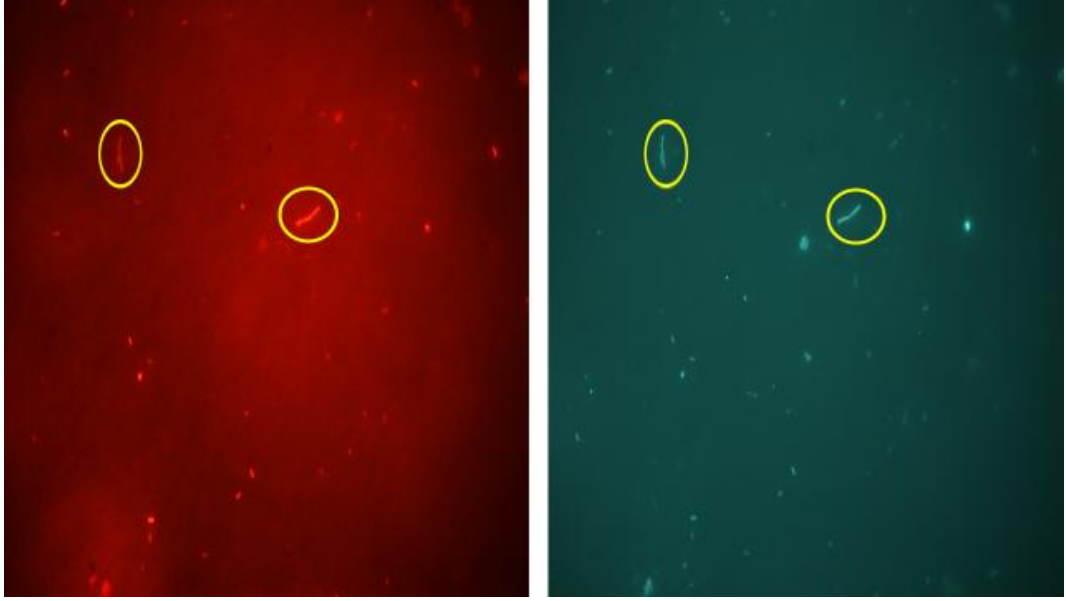
Şekil 3.34. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Edremit örneği (İşaretlenmiş kıvrılmış şekilli hücreler)



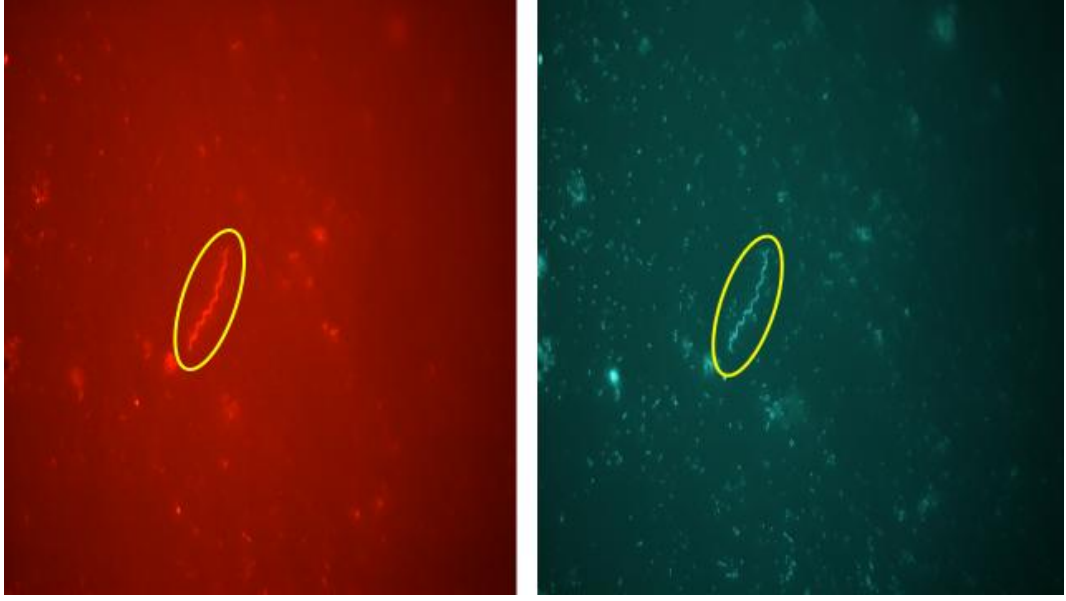
Şekil 3.35. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Tatvan (2. örnekleme) örneği (İşaretlenmiş spiral şekilli bakteri hücresi)



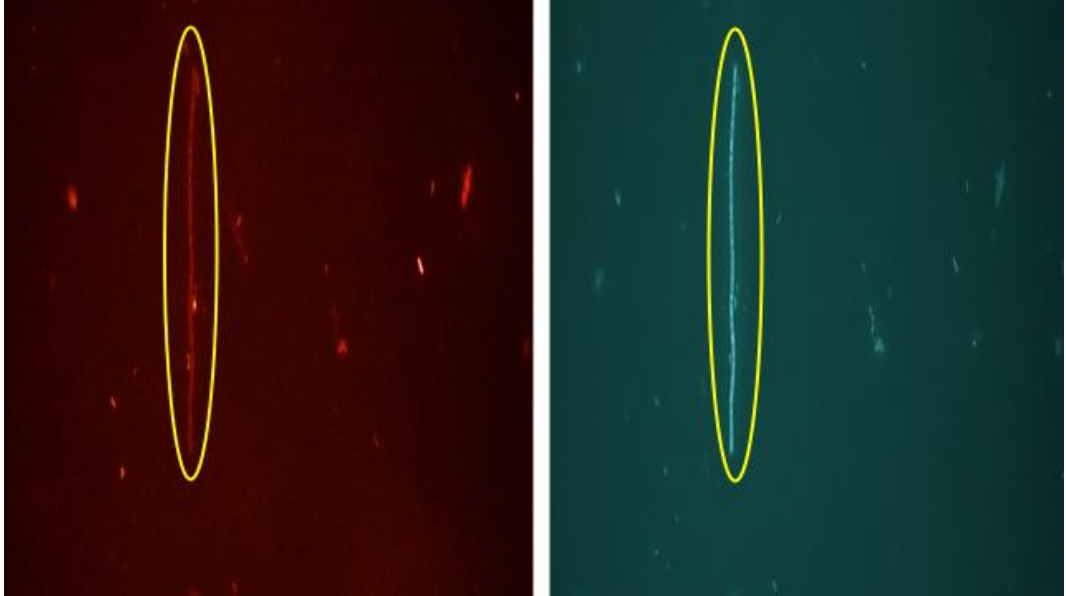
Şekil 3.36. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Tatvan (2. örnekleme) örneği
(İşaretlenmiş kok şekilli zincir oluşturmuş bakteri hücreleri)



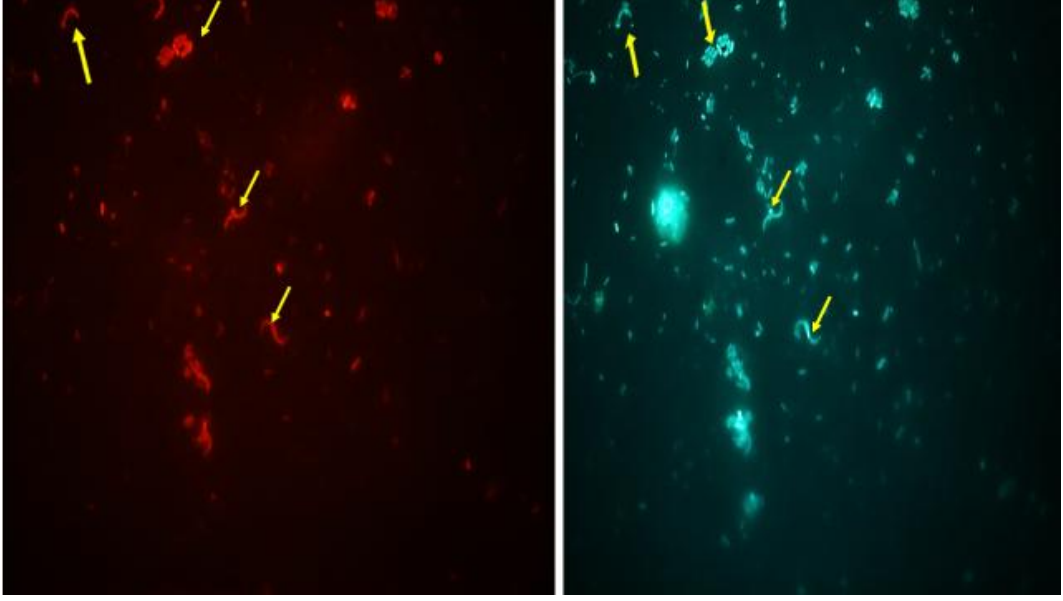
Şekil 3.37. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Merkez örneği (İşaretlenmiş basil
şekilli bakteri hücreleri)



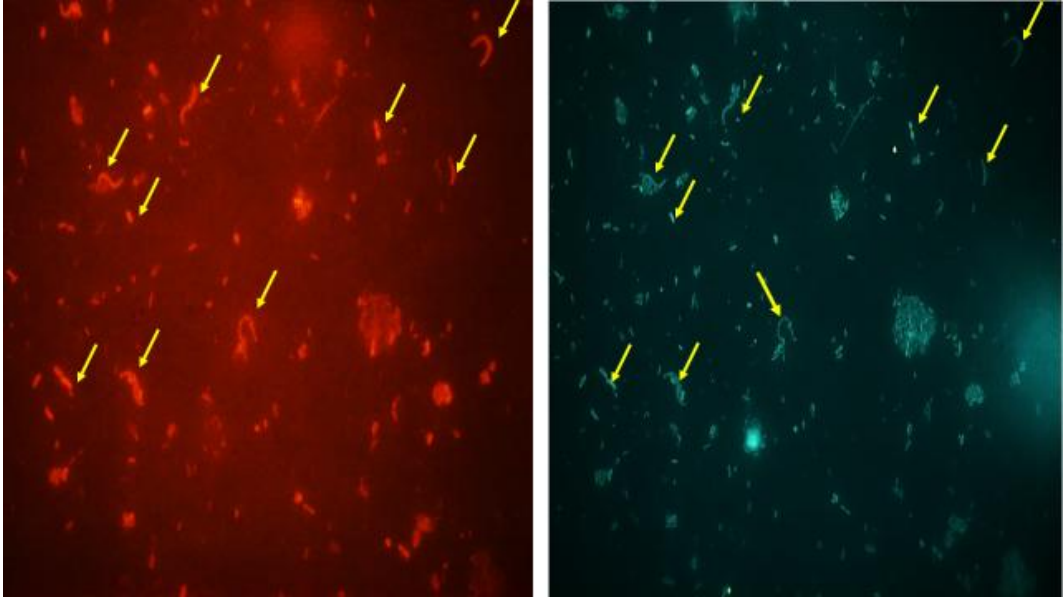
Şekil 3.38. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Tatvan örneği (İşaretlenmiş spiral şekilli bakteri hücreleri)



Şekil 3.39. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Merkez örneği (İşaretlenmiş uzun basil şekilli bakteri hücresi)



Şekil 3.40. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Edremit örneği



Şekil 3.41. Eub338 probu ve DAPI ile FISH işlemi uygulanan Edremit örneği

Çizelge 3.14: DAPI sayım sonuçları

Örnek	Toplam DAPI Sayımı/ml
Merkez	4×10^5
Ahlat	3×10^6
Tatvan	4.2×10^8
Edremit	1.9×10^8
Tatvan 2. örnekleme	3.3×10^8
Edremit 2. örnekleme	9×10^7

4. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER

1977 yılında Carl Woese' un moleküler çalışmalarla ortaya koyduğu evrimsel yaşam ağacında temsil edilen Bacteria, Archae ve Eucarya domainlerine bakıldığında alkalifilik mikroorganizmaların bu 3 domainde de temsilcilerinin olduğu görülmektedir. Bu temsilcilerden ekstrem alkalın yani yüksek pH değerlerine sahip olan ortamlara en iyi uyum sağlayan ve en iyi çalışılmış organizmaları Bacteria domaininde görmek mümkündür. Bu mikroorganizmalar pH 9.0-12.0 olduğunda gelişim gösterebilmektedir. Bu organizmalar çoğunlukla nötr topraklar, soda gölleri gibi ekstrem bazik ve tuzlu çevrelerde yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Alkalifilik mikroorganizmalar biyoteknolojinin bazı alanlarında çeşitli potansiyel uygulamalara sahiptir.

Van Gölü Dünya' nın 3. en büyük kapalı ve en büyük soda gölü olması özelliğine sahiptir. Aynı zamanda ülkemizin de en büyük gölü olması sebebiyle oldukça stratejik ve önemli bir konumda yer almaktadır. Bu kadar önemli bir değer olmasına ve pek çok doğal güzelliği barındırmasına rağmen mikrobiyolojisi ile ilgili etkin bir çalışma yapılmamıştır. Oysa ki bu göl sodalı bir göl olma özelliğine sahiptir ve pH değeri oldukça yüksektir. Bu yüzden alkalifilik mikroorganizmaların oldukça yoğun olduğu tahmin edilmektedir ve bu mikroorganizmaların belirlenmesine yönelik literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Van Gölü' nün bu derece önemli bir konumda olması ve benzersiz özelliklere sahip olması buranın mikrobiyolojik açıdan daha detaylı incelenmesi ve buradan bir şekilde yararlanılması gerekliliğini göstermiştir.

Yapılan çalışmalar bu gölün hidrokimyası, jeolojisi, bu göldeki *Bacillus* türlerinin enzim özelliklerinin incelenmesi, ağır metal kirliliğinin, fauna ve florasının araştırılmasına yöneliktir. Özellikle Van Gölü havzası ve bu bölgenin jeolojisiyle ilgili çalışmaların varlığı dikkat çekmektedir. Bu kapsamda Van Gölü kapalı havzasında bulunan maden işletmeleri, endüstriyel hammadde ocakları, işletmeye konu olmamış mineralizasyon bölgeleri, doğal radyasyon kirliliği ve jeotermal sahalardan kaynaklanan çevresel etkiler değerlendirilmiştir (Çiftçi ve ark., 2008). Bunun yanı sıra göl sedimentlerinin incelenmesi, göl suyu doğal kalitesinin ve ağır metal düzeylerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar da

mevcuttur (Yıldız ve Yener, 2010; Bilgili ve ark.,1995; Öztürk ve ark, 2005). Ayrıca Van Gölü' nün iklimsel değişikliklerden nasıl etkilendiği de incelenmiştir. Çünkü Van Gölü hiçbir doğal veya yapay çıkışı bulunmayan kapalı bir havza olma özelliği taşımaktadır ve su seviyesi değişimleri tamamen doğal hidrolojik döngü sonucu meydana gelir ve drenaj havzası herhangi bir iklimsel değişiklikten etkilenmektedir (Kadioğlu ve ark., 1997). Van Gölü' nde prokaryotik mikroorganizmalar özellikle de alkalifiller ile ilgili çalışmalara baktığımızda neredeyse yok denecek kadar azdır.

Çalışma kapsamında Van Gölü kıyısından Merkez, Tatvan, Tatvan 2. örnekleme bölgesi, Ahlat, Edremit, Edremit 2. örnekleme bölgelerinden alınan örneklerin pH değerleri sırasıyla 9.5, 9.8, 9.7, 9.6, 10.2, 9.6 olarak belirlenirken % tuz değerleri %1.7, %1.8, %1.2, %1.8, %2, %1.2 olarak belirlenmiştir. Su örneklerinin içerdiği bazı elementlerin belirlenmesine yönelik ICP analizlerinde dominant elementin Na^+ olduğu belirlenmiştir. Van Gölü'nde prokaryotik mikroorganizmalar özellikle de alkalifiller ile ilgili çalışmalara baktığımızda Van Gölü'nden izole edilen alkalifilik *Bacillus* türlerinin ekstraselüler protein profillerini bilgisayar analiziyle tanımlamaya yönelik çalışma yapılmıştır (Berber ve Yenidünya, 2004). Van Gölü' nden izole edilen alkalifilik *Bacillus* sp. VA-24 suşunun ürettiği α -amilaz enziminin moleküler ağırlığı, sıcaklık ve pH optimumu üzerine çalışma gerçekleştirilmiştir (Coşkun, 2010). Van Gölü' ndeki prokaryotik organizmalar üzerine gerçekleştirilen en kapsamlı çalışma gölden elde edilen mikrobiolitlerde bakteriyel çeşitliliği belirlemeye yönelik araştırmalar ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın bir parçası olan 16S rDNA amplifikasyonu temelli moleküler çeşitlilik çalışmaları Alfa-, Beta- ve Gammaproteobacteria' ya, Cyanobacteria' ya, Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) grubuna, Actinobacteria ve Firmicutes' e bağlı bakteriyel ırkların varlığı ortaya çıkmıştır (Lopez-Garcia ve ark. 2005).

Alkalin ortamlardan Turkana Gölü, Mono Gölü, Büyük Soda Gölü, ve Lonar Gölü pH değerleri Van Gölü örnekleme bölgelerinin pH değerleri ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca ülkemizdeki bir diğer sodalı göl olan Salda Gölü de 8-10 arasında değişen pH değeriyle örnekleme bölgelerinin pH değerlerine benzerlik göstermektedir.

Çalışmamız kapsamında su örneklerindeki alkalifilik mikroorganizmaların izolasyonuna yönelik kullanılan besiyerlerinden çoğunlukla Horikoshi I, Horikoshi II, alkalın nutrient agar, %2-3-5 MGM ve aktinomiset izolasyon agar besiyerlerinde üremenin gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu besiyerlerinin çoğunun içerisinde sodyum karbonat ve sodyum bikarbonat bulunmaktadır. Ayrıca besiyerlerinin pH değerleri Van Gölü kıyısından örnekleme yaptığımız bölgelerle örtüştüğünden bu besiyerlerinde gelişimin ve çeşitliliğin yoğun olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yapılan tuzluluk ölçümleri sonucu örnekleme bölgelerinin tuzluluk değerlerinin %1 ile %2 arasında olduğu belirlenmiştir. Besiyerlerinden ise örnekleme alanlarıyla benzer özellik gösteren %2 ve %3 MGM besiyerlerinde yoğun gelişim görülmüştür. %5 MGM besiyerinde ise tuza toleranslı mikroorganizmaların gelişim gösterdiği düşünülmektedir. %10, %12 MGM besiyerlerinin tuz içeriği yüksek olduğundan bu besiyerlerinden mikroorganizma izole edilememiştir. Alkalın Nutrient Agar ve Horikoshi besiyerleri ise alkalifilik mikroorganizmaların izolasyonuna yönelik besiyerleri olduğundan ve sodyum bileşikleri içerdiğinden gelişim gözlenmiştir. Aktinomiset izolasyonu için kullanılan besiyerlerinde de izolasyon gerçekleştirilmiştir. Ancak bu besiyerleri alkalifilk mikroorganizmalar için modifiye edilmeden kullanılmıştır ve buna rağmen çeşitli aktinomiset türlerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak Van Gölü su örnekleri ile benzer özellik gösteren bir ortamın oluşturulabildiği ve pH değerlerinin alkalın olduğu besiyerlerinin temsiliyet gücü oldukça fazladır.

Çalışma kapsamında alkalifilik Bacteria ve Archaea izolasyonu amacıyla farklı bölgelerden alınan su örneklerinden elde edilen izolatlar gram boyama işlemi uygulandığında hem gram pozitif hem de gram negatif izolatların olduğu gözlemlenmiştir. Bu izolatların morfolojileri genel olarak kok, kısa ve uzun çubuklar olarak belirlenmiştir. İzolatların koloni pigmentasyonları ise genelde krem, beyaz, opak renklerde olsa da sarı, kırmızı, turuncu, açık pembe renklerde pigmentasyona sahip izolatların varlığı da tespit edilmiştir.

Örnekleme alanları için moleküler tanımlama yapmak amacıyla 16S rRNA analizleri gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA molekülleri oldukça korunmuş moleküler kronometrelerdir ve bakteriyel filogeniyi oluşturmak için uygundur. Ribozomal RNA' lar protein sentez mekanizmasının ayrılmaz elementleridir,

temel bileşenler tüm alemlerde bulunmaktır (Devereux ve Wilkinson, 2004). Gen evrensel olarak dağılmıştır, uzak taksonlar arasındaki filogenetik ilişkilerin analizine izin vermektedir. 16S rRNA özellikle bazı değişken bölgelerde hala varyasyona tabidir. Değişken bölgelerin varlığı sınıflandırma için bir araç sağlamaya yeterli çeşitlilik sağlarken korunmuş bölgelerin varlığı uygun PCR primerleri ve hibridizasyon problemlerinin etkin tasarımına olanak tanımaktadır (Vetrovsky ve Baldrian,2013).

16S rRNA yaygın kullanılmasına rağmen, 16S rRNA' dan türetilmiş sonuçların yorumlanmasını sınırlayan birkaç husus vardır. En önemlisi genom başına düşen kopya sayılarının 1 den 15' e kadar veya daha fazla olmasıdır. Kopya sayıları bir ölçüde taksona özel gibi görünmektedir fakat aynı türün suşları arasında da varyasyon kaydedilmiştir. Türlerin genel olarak >%97 oranında benzer rRNA genlerine sahip olduğu kabul edilir fakat yakın ilişkili türler arasında 16S rRNA gen dizi analizleri genellikle düşük olabilmektedir ve bu da kesin tür tanımları için DNA-DNA hibridizasyonu gerektirir. Başka bir problem ise strain veya türler arasındaki horizontal gen transferidir. Bu durum filogenetik amaçları için rRNA genlerinin kullanılabilirliğini sınırlandırır.

Aynı türden hatta aynı genomun 16S dizileri genellikle farklıdır. Sonuç olarak, 16S rRNA varyantlarının miktarı bakteri türlerinin sayısının yaklaşık 2,5 kat daha fazla olduğu tahmin edilmiştir ve bazı bakteriyel taksonlarda son derece farklı 16S rRNA dizileri gözlenmiştir. Bu özel durumda, yatay gen transferinin yüksek oranda potansiyel neden olduğu ileri sürülmüştür (Vetrovsky ve Baldrian, 2013).

Çalışmalarımız kapsamında kullanılan bir diğer yöntem ARDRA yöntemidir. Bu yöntemin tercih edilme nedeni komünitede farklı türlerin varlığının belirlenmesini ve ayırımının yapılabilmesini hızlı bir şekilde gerçekleştirmesidir.

ARDRA yöntemi ile Van Merkez örneğinden 18 izolattan 6, Ahlat örneğinden 17 izolattan 7, Edremit örneğinden 34 izolattan 12, Tatvan örneğinden 24 izolattan 7 ve aktinomiset izolasyon besiyerleri ve 2. örneklemelerden 31 izolattan 8 bakteri profili elde edilmiştir. Bu profilleri temsil eden strainlerin dizi analizlerinin gerçekleştirilmesiyle *Halomonas* sp. 10043, *Halomonas* sp. IB-559,

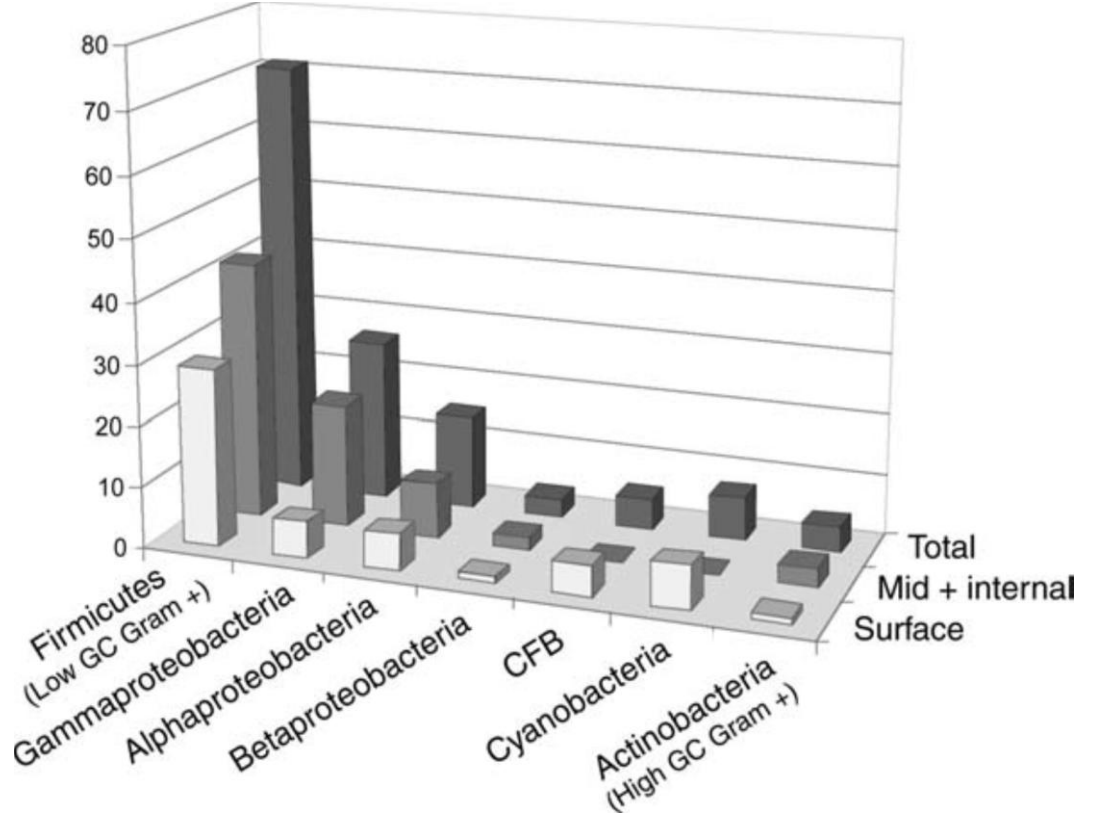
Marinobacter excellens strain KMM 3809, *Halomonas* sp. 15-7, *Alkalimonas collagenimarina* strain AC40, *Halomonas* sp. AMP-12, *Marinobacter mobilis* strain B17, *Vibrio metschnikovii* strain F5-1, *Gamma proteobacterium* E-292, *Gamma proteobacterium* M6-24D, *Rhodococcus* sp. P5, *Rhodococcus* sp. A105-53B, *Rhodococcus* sp. Dza15, *Pseudomonas* sp. 1_C16_29, *Pseudomonas* sp. AB17, *Halomonas stevensii* strain T49407, *Marinobacter* sp. LNM-5, *Gamma proteobacterium* E-116, *Belliella* sp. LW3, *Alkalimonas delamerensis* strain 1E1T, *Vibrio metschnikovii* strain SU1, *Pseudomonas* sp. BWDY-40, *Rheinheimera* sp. TS-T4, ile benzer oldukları belirlenmiştir.

Profiller karşılaştırıldığında bazı profillerin birden fazla örnekleme alanında temsil edildiği belirlenmiştir. Örneğin; Bütün örnekleme alanlarında *Halomonas* cinsine ait profil belirlenmiştir. Tatvan, Edremit ve Ahlat kıyılarından alınan örneklerle yapılan ARDRA sonuçları incelendiğinde üç örnekte de *Gammaproteobacterium*' u temsil eden profiller belirlenmiştir. Aynı şekilde *Alteromonadales* ve *Marinobacter* cinsi üyelerini temsil eden profiller tüm örnekleme alanlarında belirlenmiştir. ARDRA yöntemi ile Van Gölü için toplamda 40 farklı profil belirlenmiştir ancak farklı örnekleme alanlarında aynı profillerin varlığının belirlenmesi ve dizi analizi sonucunda aynı tür olarak belirlenen profillerin bulunduğu belirlenmiş ve sonuç olarak aslında 21 farklı profilin olduğu saptanmıştır.

Örnekleme alanlarını çeşitlilik ve mikroorganizma yoğunluğu açısından incelediğimizde Merkez ve Ahlat kıyılarından yapılan örnekleme sonucu elde edilen verilerle, Tatvan ve Edremit kıyılarından yapılan örnekleme sonucu elde edilen veriler kıyaslanıldığında Merkez ve Ahlat örneklerinde çeşitlilik ve yoğunluğun daha az olduğu belirlenmiştir. Tatvan ve Edremit örneklerinin ise çeşitlilik açısından oldukça zengin olduğu ve mikroorganizma yoğunluğunun oldukça fazla olduğu belirlenmiştir. Van Gölü' nün en önemli su kaynağı yağışlardır. Ancak yağış rejimi bölgelere göre farklılık göstermektedir. Merkez bölgesine düşen yağış oranı diğer bölgelere göre oldukça azdır. Örnekleme yapılan bölgeleri yerleşim açısından incelediğimizde ise Merkez, Tatvan ve Ahlat kıyısından yapılan örnekleme yerleşimin yoğun olduğu bölgelerden yapılmış olup, Edremit bölgesinden yapılan örnekleme ise yerleşim bölgesine yakın

olmayan bir kesimden yapılmıştır. Gölü besleyen akarsulara baktığımızda Bend-i Mahi Irmağı, Deliçay, Zilan, Karasu, Engil ve Karmış çayları ve Gevaş sayılabilir. Zilan ve Deliçay göle kuzeyden dökülmektedir. Karasu doğundan, Engil çayı ve Gevaş ise güneyden dökülmektedir. Örnekleme bölgelerimiz dikkate alındığında Tatvan ve Edremit kıyılarından yapılan örneklemeler suların göle karıştığı bölgelerdir. Tatvan ve Edremit kıyılarındaki çeşitliliğin buna bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Van Gölü'nün doğusu ve kuzeyindeki toprak çeşitleri de son derece farklılık göstermektedir. Doğu'da kestane rengi ve kahverengi topraklar hakim iken kuzeyde ise kireçsiz kahverengi topraklar hakimdir. Yağış suları da gölü beslediğinden yağış sularıyla göle topraktaki organik ve inorganik elementler de karışmaktadır. Bu durum da göl kıyılarından yapılan örneklemelerdeki çeşitliliği etkileyebilmektedir.

Van Gölü'ndeki prokaryotik organizmalar üzerine gerçekleştirilen en kapsamlı çalışma gölden elde edilen mikrobiolitler incelenerek gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 16S rDNA amplifikasyonu temelli moleküler çeşitlilik çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile Alfa-, Beta- ve Gammaproteobacteria'ya, Cyanobacteria'ya, Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) grubuna, Actinobacteria ve Firmicutes'e bağlı bakteriyel ırkların varlığı ortaya çıkmıştır. (Lopez-Garcia ve ark. 2005). 16 S rDNA amplifikasyonu temelli çalışma sonuçlarıyla karşılaştırıldığında çalışmamızda Van gölü'nden elde edilen sonuçlar ile bu çalışmadan elde edilen sonuçlar büyük oranda birbiriyle örtüşmektedir. Aşağıdaki grafik Van Gölü mikrobiolitlerinden elde edilen 16 S rDNA kütüphalesindeki bakteriyel klonların taksonomik dağılımını belirtmektedir.



Şekil 4.1 Van Gölü mikrobiolitlerinden elde edilen 16 S rDNA kütüphanelerindeki bakteriyel kolonların taksonomik dağılımı

Bu grafik ile bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçları kıyasladığımızda çeşitlilik açısından aynı sonuçlar elde edilmiştir. Fakat bizim çalışmamızda Gammaproteobacteria'ya ait izolatların sayısının oldukça fazla oranda olduğu saptanmıştır.

Soda gölleri ile ilgili yapılmış olan çalışmalara değinmeden önce soda gölleri ile mikroorganizmaların jeolojik önemine değinecek olursak; Orta seviyede tuzlu göllerde siyanobakterilerin birincil üretime temel katkı sağlarlar. Bunlar arasında özellikle *Spirulina spp.* bu durumu gerçekleştirir. *Spirulina spp.*'nin temel görevi N_2 fiksasyonu yapmak ve O_2 üretmektir. *Ectothiorhodospira* cinsi anoksijenik bakterileri ile ana üretime katılım sağlamaktadır. Bunların sülfür geri dönüşümü sürecindeki görevi de ayrıca önemlidir.

Halomonadlar hem alkalın hem tuzlu çevrelerde bulunmaktadır. Soda göllerinden elde edilen izolatlar biyokimyasal olarak reaktiftirler. Hidroliz edici proteinler ve polimerik karbonhidratların dışında çeşitli şekerleri, organik ve

amino asitleri kullanabilirler. Soda gölü izolatlarının bir grubu nitrit varken veya yokken anaerobik gelişim gösterebilir ve nitrit redüksiyonu yapabilir. Bu mikroorganizmalar nitrojen döngüsünde temel ve önemli bir rol oynamaktadırlar. Gram pozitif izolatlardan *Bacillus spp.* biyopolimerlerin parçalanmasında önemli rol oynamaktadır. Bunlar proteinazlar, selülazlar, ksilanazlar ve karbonhidratları parçalayan enzimlere sahiptirler. Soda göllerinde *Streptomyces spp.*, *Bogoriella* cinsi ve *Dietzia* türleri ve *Nesterenkonia*'nın henüz tanımlanmamış akrabaları gibi yüksek G+C içeriğine sahip gram pozitif bakteriler bulunmaktadır. Tuzlalar en ekstrem alkalın çevreleri oluşturmaktadır ve bu ortamlarda kırmızı pigmentli halofilik Archaea baskındır. Bu organizmalar organotroflardır. Kompleks polimerlerin hidroliz ürünleri sadece alkalifilik *Halomanas spp.* için değil ayrıca anaerobik fermantatif bakteriler için de substrat olabilir. Kemoorganotrofik alkalifilik anaeroplara sayısı anoksik soda gölü sedimentlerinde oldukça fazladır. Bu bakteriler (Örneğin *Spirochaeta spp.* gibi) oldukça yaygındır. Bu organizmalar pentoz, heksoz ve asetat, laktat, etanol ve H₂ üreten disakkaritleri kullanabilmektedir. Soda göllerindeki obligat anaeroplara ikincil üreticilerdir. Aeroplara ve anaeroplara tarafından oluşturulan birincil hidroliz ürünlerini kullanırlar. Alkalın göllerde biyogenik metan üretimi olduğuna ilişkin kanıtlar mevcuttur. Soda göllerinden izole edilen metajenik bakteriler zorunlu olarak metilotroftir. Alkalın çevrelerde metanol, metilamin ve dimetil sülfid gibi bileşikler alg kütlelerinin anaerobik parçalanmasından ve bazı alkalifilik organotroflarda belirlenen betain ektoin gibi solütlerden elde edilir ve oldukça bol bulunur.

Ectothiorhodospira fotosentetik elektron alıcısı olarak redüklenmiş sülfür türlerine ihtiyaç duymaktadır. *Ectothiorhodospira* ektoin, betain ve glisin gibi azotlu bileşiklerin temel kaynağıdır (Jones ve Grant, 1999).

Soda gölleri ile yapılan çalışmalara baktığımızda ise; Elementeita Gölü Kenya' da alkalın salın bir göldür. Karbonat, sülfat ve kloridlerin yüksek konsantrasyonları sebebiyle pH 9' un üzerindedir ve sıcaklık 30-40 °C arasındadır. Gölün mikrobiyal çeşitliliği kültür bağımsız yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. 5 farklı örnekleme alanı seçilmiş ve DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Klon kütüphanesi oluşturulmuş ve dizileme için ARDRA

tekniki kullanılarak temsilci klonlar seçilmiştir. En çok Cyanobacteria üyeleri belirlenmiş, 2. sırada ise Firmicutes grubu yer almıştır. Su örneklerinden elde edilen DNA'ya ait klonlar Betaproteobacteria sınıfına bağlıdır. BLAST sonucuna göre örneklerin % 93'ü % 98 oranından aşağıda benzerlik göstermiştir (Mwrichia ve ark., 2011).

Kültür bağımlı çalışmalardan Doğu Afrika Yarığı Vadisi'ndeki soda göllerinde aerobik, organotrofik, halofilik, alkalifilik ve alkalitolerant mikroorganizmaların çeşitli temsilcileri gösterilmiştir.

Kültür bağımlı ve kültür bağımsız yöntemler kullanılarak Magadi Gölü'ndeki ve diğer göllerdeki mikrobiyal çeşitlilik çalışılmıştır.

Meksika Texcoco Gölü'nden 2 lagün arasındaki mikrobiyal çeşitlilik moleküler yöntemlerle kıyaslanmıştır. Facultativa Lagününün pH'ı 8.8 tuzluluğu ise %2'dir. Nabor Carillo Lagünün ise pH değeri 9.5 tuzluluğu ise 4.5'tir. Ribozomal dizi temelli moleküler ve filogenetik analizler Facultativa Lagünün temel olarak Alfa ve Betaproteobacteria, düşük G+C gram pozitif bakteriler ve Halobacteriaceae familyasından bazı üyeleri içerdiğini ortaya çıkarmıştır. Nabor Carillo Lagünü ise temel olarak halofilik ve alkalifilik düşük G+C gram pozitif bakteriler ve Alfa ve Betaproteobacteria üyelerini içermektedir. Bu lagünlerden izolatlar Alfa ve Betaproteobacteria'dan *Thauera aromatica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Halomonas magadiensis* ve *Halomonas eurihalina*, yüksek ve düşük G+C gram pozitif bakterilerden ise, *Thermobispora bispora*, *Natroniella acetigena*, ve *Bacillus halophilus* tanımlanmıştır (Jan-Roblero ve ark., 2004).

Hindistan Lonar Soda Gölü'nden 74 izolat elde edilmiştir ve 11 tanesi morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak tanımlanmıştır. Gölün pH değeri 10.5 olarak belirlenmiştir ve fosfat içeriği yüksektir. Karbonat, klorid ve sodyum konsantrasyonları oldukça yüksektir. İzole edilen izolatlar Firmicutes ve Proteobacteria'ya aittir. *Bacillus* türleri oldukça fazladır. Ayrıca yağ degrade edebilen *Alcanivorax spp.* izole edilmiştir (Deshmukh ve ark., 2011).

Metanogenez pek çok ekosistemde karbon döngüsünde temel rol oynamaktadır. Bu işleme metanojenik Archaea aracılık etmektedir. Euryarchaeota filumunun Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales,

Methanosarcinales, Methanopyrales ve Methanocellales ordolarında görülmektedir. Metanojenler metanogenezdeki katabolik yollara göre 3 gruba ayrılabilir. Soda göllerinin birincil üretim oranları oldukça yüksektir. Soda göllerinin anoksik alt katmanlarındaki biyokütle ayrışması ile metanojenlerin sevdiği substratlar meydana gelebilir. Bununla birlikte, tuzlu ve alkalik ortamlarda metanojenik Archaea tanımlanması ve faaliyetleri az anlaşılmıştır. 16S rRNA ve fonksiyonel genler kullanılarak Lonar Gölü'ndeki metanojen çeşitliliği araştırılmıştır. Halobacteriales' e ait filotipler dominant olsa da Methanosarcinales ve Methanomicrobiales'e ait diziler de elde edilmiştir. Metanogenezdeki aktif metilotropik Archaea' ları tanımlamak için mcrA geni kullanılmıştır. Çünkü Metanogenez' in temel adımı metil koenzim M redüktaz enzimi tarafından katalize edilmektedir. Sonuçlara göre aktif Archaea'nın *Methanobrevibacterium smithii* e benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Antony ve ark., 2012).

Soda göllerinde sodyum karbonat veya bikarbonat bulunmaktadır ve farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Sodyum klorid' ten 2 kez daha zayıf bir elektrolittir. Hipersalin koşullarda oldukça yüksek sülfat redüksiyon oranı ölçülmüştür. Bunun için NaCl havuzlarında yaşamı sürdürebilmek için gerekenden daha az enerji harcanan ozmotik adaptasyona ihtiyaç vardır. Buna rağmen soda göllerinde yaşayan organizmalar ekstra stres faktörü oluşturan yüksek alkalik şartlarla başa çıkmak zorundadır. Bu yüzden soda göllerindeki mikrobiyal komünite yapısı ve bunun sodyum karbonat/bikarbonat konsantrasyon artışı ile nasıl etkilendiği ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Sülfür döngüsü soda göllerindeki en aktif döngü olduğu için sülfat redükleyen bakteriyel komüniteye özel önem verilmiştir. Bazı özel sülfat redükleyen bakteri grupları 130g/L üzerindeki tuz konsantrasyonlarında gelişmeyi durdurur. Bu yüzden bir tuz gradiyenti boyunca sülfat redükleyicilerin farklı filogenetik gruplarının varlığı araştırılmaktadır.

Rusya Kulunda Step'indeki göllerden sülfat redüksiyonu yapan bakterilerin aktivitesi ve çeşitliliği çalışılmıştır. Göllerin tuzluluğu 60 g/L ile 200 g/L ve pH değeri de 10 ile 10.3 arasındadır. Solusyon içerisindeki baskın tuz sodyum karbonat/ bikarbonattır. Sülfat konsantrasyonu ise kabul edilebilir bir oranda yüksektir. Çalışma kapsamında kültür bağımlı ve kültür bağımsız

yöntemler kullanılmıştır. Genel bakteri çeşitliliği ve sülfat redükte eden bakteri çeşitliliği için DGGE metodu kullanılmıştır. Sülfat redükte eden bakterilerin aktivitesi sülfat redüksiyon oranı ölçülerek belirlenmiştir. Sonuçlar az sayıda fakat oldukça aktif çoğunlukla Proteobacteria üyesi mikrobiyal popülasyonların varlığını göstermiştir (Foti ve ark., 2008).

Kemolitotrofik bakteriler inorganik bileşiklerin redox dönüşümleri için oldukça yüksek kapasiteye sahip olmaları ve doğal ve insanlar tarafından oluşturulmuş çevrelerde element döngüsünde temel rol oynamaktadır. Kimyasal sülfat oksidasyonunu oksijen ile başarabilirler. Sülfatin ya da thiosülfatın sülfata tam oksidasyonu kemosentez için en uygun reaksiyonlar arasındadır. Soda gölleri ile ilgili çalışmalarda iyi bir jeokimyasal karakterizasyon temeldir. Özel koşulların kemolitotroflar dahil olmak üzere haloalkalifilik bakterilerin büyüme ve aktivite üzerinde büyük etkileri olabilir. Sodalı ve tuzlu göllerle ilgili Orta Asya, Afrika ve Kuzey Amerika’da kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Çalışmada 100 üzerinde izolat elde edilmiştir. İzolatların büyük çoğunluğu Gammaproteobacteria içerisinde 2 yeni cins olan *Thioalkalimicrobium* ve *Thioalkalivibrio*’ya aittir. 3. cins *Thioalkalispira* tek bir tür içermektedir (Sorokin ve Kuenen, 2004).

Çalışmamızda belirlediğimiz sonuçları inceleyecek olursak; *Marinobacter* cinsi 1992 yılında tanımlanmıştır. *Marinobacter excellens* Japonya denizi Chazma Bay sedimentlerinden toplanan örneklerden izole edilmiştir (Gorshkova ve ark. 2003). *Marinobacter mobilis*’in izolasyonu Doğu Çin denizinden *Marinobacter zhejiangensis* ile gerçekleştirilmiştir ve bu iki türün de %0.5-10 arasındaki NaCl’de yaşamlarını sürdürebildikleri belirlenmiştir (Hua ve ark. 2007).

Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda *Halomonas* cinsine ait türlerin oldukça fazla sayıda oldukları saptanmıştır. *Halomonas* cinsi üyeleri % 5-25 NaCl konsantrasyonları arasında gelişim göstermektedir. *Halomonas* cinsi üyeleri farklı tuz konsantrasyonları ve pH aralıklarında gelişim gösterdiğinden farklı ortamlardan izolasyonu rahatlıkla gerçekleştirilebilmektedir. *Halomonas* cinsinin izolasyonu ilk kez Hollanda’ daki tuzlalardan 1980 yılında gerçekleştirilmiştir. (Vreeland ve ark., 1980). Çalışmamızda da *Halomonas* cinsi üyelerinin oldukça fazla sayıda olduğu saptanmıştır.

Marinobacter cinsi Proteobacteria' nın Gama alt sınıfında yer almaktadır. Bu cinsin üyeleri gram negatif, hareketli, aerobik, spor oluşturmeyen çubuk şekillidir. Bu cinsin bakterileri fermentatif metabolizmasının bulunmayışı, sınırlı bir besin profili ve nitratta anaerobik solunum kabiliyeti ile karakterize edilmektedir. Tip straini *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 alkenleri enerji ve karbon karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Bu strain Fransız-Akdeniz kıyısından yağ içeren sedimentten izole edilmiştir. Daha sonra 21 tür daha tanımlanmıştır. *Marinobacter* strainleri çeşitli fizikokimyasal özelliklere sahip deniz suyu, sediment, sıcak su kaynakları, derin deniz dipleri, tuzlu topraklar, açık denizlerde yağ üreten kuyular gibi denizsel ve halofilik habitatlardan izole edilmiştir. *M. algicola* ve *M. bryozorum* gibi *Marinobacter* türleri fitoplankton ve zooplanktonların bulunduğu ortamlarda bulunmaktadır. Sürekli habitatları ile pek çok *marinobacter* straini orta halofildir (Grimaud, R. , 2010). *Marinobacter excellens* Japon Denizi Chazma Bay sedimentlerinden izole edilmiştir. Çubuk şekilli, hareketli, polar flagellalı gram negatif aerobiktir. Organik gelişim faktörleri gerekli değildir. Gelişim için % 1-15 NaCl varlığında gerçekleşir. Optimum gelişim için sıcaklık 20-25°C pH ise 7.5' dir (Gorshkova ve ark., 2003)

Alkalimonas cinsi 3 türden oluşmaktadır. *Alkalimonas amyloplitica* Çin Chahannor Gölü'nden izole edilmiştir. *Alkalimonas delamerensis* Doğu Afrika Kenya' daki Elmenteita Gölü'nden izole edilmiştir. Hepsisi gram negatif, hafif halofilik, alkalifilik ve Gammaproteobacteria sınıfına aittir. Psikotolerant zorunlu alkalifilik kollagenolitik enzim üreten bakteri *Alkalimonas collegenimarina* (strain C40) Japonya Torishima Adası 4026 m derinlikten izole edilmiştir. Çubuk şekilli, gram negatif ve bir tek polar flagellumu ile hareketlidir. Gelişebildiği sıcaklık aralığı 5-30°C arası ve pH aralığı ise 7-10.5 arasındadır. Optimum gelişim ise 33°C ve pH ise 8.5-10.0 olarak belirlenmiştir. %0-10 NaCl konsantrasyonunda gelişim gösterebilmektedir. Fakat %1 NaCl ile optimum gelişim göstermiştir. Katalaz ve sitokrom oksidaz pozitifdir. Amilaz, lipaz, jelatinaz, proteaz ve kollegenolitik enzim için pozitif, agaraz ve DNaz için negatifdir. (Kurata ve ark., 2007).

Biyoteknolojik önemi ile ilgili ise kollegenolitik enzimler protein hidrolizinde bazı endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kollagen hayvancılık enüstrisinde büyük miktarlarda üretilmektedir ve son zamanlarda kollajenden üretilen peptidlerin yiyeceklerde ve tıbbi ürünlerde yararlı fizyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Kurata ve ark., 2007).

DGGE ile kompleks çevrelerde popülasyonların varlığı ve fonksiyonu belirlenebilmektedir. Takson spesifik problemler ile hibridizasyon analizi gerçekleştirilebilir. Ayrıca jellerden bantların kesimini takiben dizileme veya saf kültürlerin izolasyonu ile dizileme işlemleri ile komünite hakkında bilgiler edinmek mümkündür (Muyzer ve Smalla 1998).

DGGE orijinal olarak 1980'li yıllarda nokta mutasyonlarını tespit etmek amacıyla geliştirilmiştir. Mikrobiyal komünitelerin analizlerinde ilk kullanımı ise 1990 başlarında olmuştur (Muyzer ve ark.1993).

Teknik aynı veya benzer uzunlukta olan fakat farklı dizilere sahip DNA fragmentlerini doğrusal olarak azalan bir denatürant gradientinde elektroforez ile ayırmaktadır. Denatüre edici gradientte DNA fragmentleri elektriksel alanın etkisi altında göç eder. Fragment gradientte melting pozisyonuna ulaştığında fragmentin hareketi hızlıca yavaşlar. Fragmentlerin denatürasyonu “melting domains” denilen ayrımı gerçekleştirir. Domainlerdeki dizi farklılıkları denatürasyon sıcaklıklarının farklı olmasına sebep olmaktadır. Fragmentlerin dizi farklılıkları sayesinde denatüre edici gradient jellerde farklı pozisyonlarda göç olayı sonlanmaktadır. Bu sayede bunların ayrımları DGGE ile çok etkili bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir.

Tekniğin güçlü yönü jelden bant kesilebilmesi ve daha sonra filogenetik ilişkinin saptanabilmesi için dizi analizi gerçekleştirilebilmesidir. Ayrıca komünite profilleri karşılaştırılarak farklı örnekleme alanlarının popülasyon çeşitliliği ve yoğunluğu üzerine direkt bir görüş sağlanabilmektedir. Bireysel bir popülasyonun varlığı da bu teknikle gerçekleştirilebilmektedir. Bunun için özel problemlerle hibridizasyon işlemi uygulanabilmektedir.

DGGE yönteminin sınırlamalardan bir tanesi sadece 500 baz çifti kadar küçük fragmentleri ayırabilmesidir. Ayrıca dizi çeşitliliğine rağmen DNA fragmentlerinin ayrımı her zaman mümkün olmamaktadır. Çünkü DNA

fragmentleri arasında benzer melting noktasına sahip diziler olabilmektedir. Bazı bakterilerin genomlarında çoklu gen kopyalarının varlığı 16 S rRNA' da dizi heterojeniteleri oluşturmaktadır. Ayrıca çok sayıda farklı bakteriyel populasyon içeren habitatlardan elde edilen DNA patternleri bir smear görüntüsü oluşturabilmektedir (Muyzer ve ark. 2004). 16S rRNA 'nın farklı bölgelerinin kullanılması ve farklı DGGE koşulları ayırma farklı çözünürlüklerde sonuçlanabilmektedir. DNA fragmentlerinin birlikte göçü bantlardan temiz diziler elde edilmesinde problem yaratmaktadır. (Muyzer ve Smalla 1998).

DGGE yöntemi kültürlerin zenginleştirme ve izolasyonlarının incelenmesi, rRNA operon mikroheterojenitelerinin belirlenmesi, farklı DNA ekstraksiyon protokollerinin karşılaştırılması, PCR ve klonlamadaki hataları belirlemek, klon kütüphanelerinin taranması, komüniteyi profillendirmek, mikrobiyal komüniteler içerisindeki populasyon dinamiklerini çalışmalarında kullanılmaktadır.

Çalışmamızda DGGE yöntemi komüniteyi profillendirmek amacıyla kullanılmıştır.

Çalışmamızda DGGE işlemi sadece Bacteria domaini için gerçekleştirilebilmiştir. Bunun sebebi Archae domaini için DGGE için özel primerlerle PCR işlemi gerçekleştirilmiş olup pozitif sonuç alınamamıştır. PCR'dan pozitif sonuç alınamamasının nedeninin ortamdaki Archae popülasyon yoğunluğunun oldukça az olması olabileceği düşünülmektedir. Bacteria için DGGE için özel primerlerle kurulan PCR'lardan pozitif sonuçlar alınmıştır. İşlemden verimli sonuçlar alabilmek için elde edilen PCR ürünleri konsantre edilerek jele yüklenmiştir. Ancak birkaç deneme yapılmış ve DGGE jelinden verimli sonuç alınamamıştır. Optimizasyon için çeşitli denemeler yapılmıştır. Bu optimizasyon çalışmaları kapsamında jelin gradient aralığı değiştirilmiştir ve jel tamponunun konsantrasyonu yarı yarıya azaltılmıştır ve ancak bu şekilde sonuç elde edilmeye çalışılmıştır. Sonuç elde edilmesine rağmen bantların tam ayırımının sağlanabilmesi için daha uzun süre jelin elektrik akımına maruz bırakılarak yürütme süresinin arttırılması gerektiği ve gradient aralığının değiştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

DGGE jelinden kesimi gerçekleştirilen az sayıdaki bantlar için dizi analizi gerçekleştirildiğinde; *Citrobacter* sp., kültüre alınmamış bakteri klonları, kültüre

alınmamış DGGE jel bantları ve düşük oranda *Entrobacter ludwigii* strainlerine benzerlik gösteren diziler elde edilmiştir. Bu bantların elde edildiği kaynaklar genellikle Tibetan Gölü ve Rusya Kulunda Step'indeki soda gölleridir. Ayrıca ıstridyelerdeki algal kültürler ve kanalizasyon gibi ortamlardan elde edilen dizilerle benzerlik göstermektedir.

Filogenetik boyama olarak ilk uygulama 1989'da gerçekleştirilmiştir ve o tarihten bu yana floresan etiketli rRNA hedefli oligonükleotid problemler bireysel bakteri hücrelerinin doğrudan, kültür-bağımsız tanımlanmaları için ortak bir araç haline gelmiştir. FISH bir ortamdaki mikroorganizmaları saymak ve tanımlamak amacıyla kültüvasyona ihtiyaç duymaksızın kullanılabilir.

Yöntemin dezavantajlarından biri kullanılan tek etiketli oligonükleotid problemler düşük ribozom içerikli hücreler için düşük sinyal yoğunluğunda yetersiz kalmasıdır. Ayrıca tüm bakteriyel ve arkeal hücreler standart fiksasyon protokolleri ile oligonükleotid problemlere geçirgenlik göstermeyebilir.

Kültüre alınmamış prokaryotlar için rRNA hedefli problemlerin özel hibridizasyon ve yıkama koşulları tam olarak tespit edilememesi bir başka sınırlamadır. Diğer sınırlamalar ise nükleik asit problemler için hedef molekül olarak rRNA'dan yararlanılmasından kaynaklanmaktadır. Bu molekülün mutasyon oranı nispeten düşük olduğundan genellikle prokaryot türün strainleri arasında ayırma yapan hedef bölgelere sahip değildir (Wagner ve ark., 2003).

Hatalı pozitif ve hatalı negatif sonuçlar da yöntemin sınırlamaları arasındadır. Hatalı pozitif sonuçlar otofloresan özellik gösteren örnekler sebebiyle ortaya çıkmaktadır. Siyanobakteriler, maya, küf ve metanojenler gibi gruplarda bu sorunla karşılaşmaktadır. Hatalı negatif sonuç ise yetersiz penetrasyon ve düşük rRNA içeriği gibi durumlarda ortaya çıkabilmektedir. Yetersiz penetrasyon kalın hücre duvarlı hücrelerde karşılaşılan bir durumdur. Ayrıca fotoğraflama süresince probun sinyal yoğunluğunun azalması hatta kaybolması da ciddi sorunlar yaratmaktadır. Bu problemin çözümünde daha stabil siyanin boyalar kullanılabilir.

Van Gölü çeşitli örnekleme bölgeleri için gerçekleştirilen FISH uygulamasında Arc344 ve Arc915 problemleriyle sinyal bazı örneklerden hiç alınmamış, bazı örneklerde ise oldukça az sayıda hücre pozitif sonuç vermiştir. Eub338 probuyla ise pozitif sinyaller alınmış ve hemen hemen DAPI kadar hücre

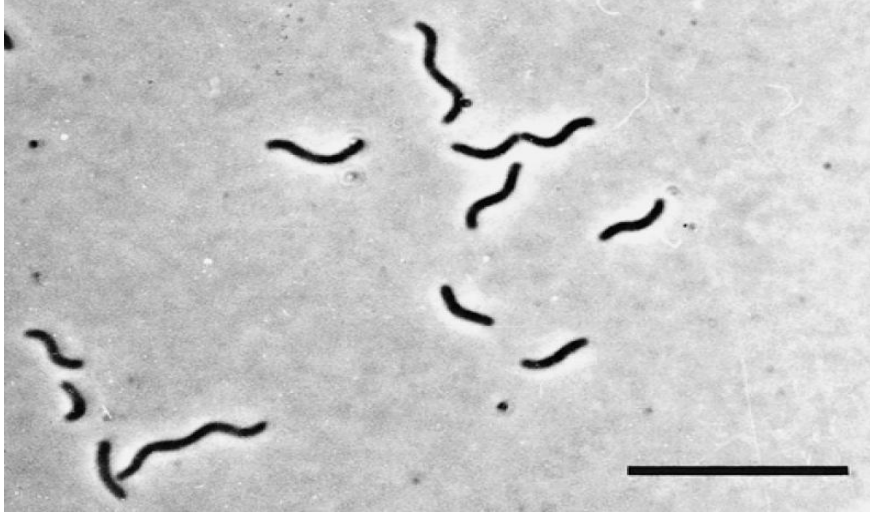
sayısının bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu problemlere ilave olarak alfa-beta-gama proteobacteria için özel olarak dizayn edilmiş problemlerin kullanımı da denenmiştir.

Archaea için özel olan problemlerden sinyal alınamamasının veya düşük sinyal alınmasının nedeni ortamda Archaea popülasyon yoğunluğunun oldukça düşük olması ve yöntemin duyarlılığı arttıracak şekilde modifiye edilmesinin gerekliliğidir. Ayrıca Alfa-Beta-Gama Protobacteria için özel olarak dizayn edilmiş problemlerin de bazılarında pozitif sinyaller alınmış fakat sinyal kalitesinin düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Bu durumun çeşitli modifikasyonlar yapılarak optimize edilebileceği düşünülmektedir. Fikse edilen örnek miktarı konsantre edilebilir ve fiksasyon için kullanılan formaldehit miktarı değiştirilebilir, hibridizasyon tamponundaki maddelerin miktarları değiştirilebilir ve prob konsantrasyonu değiştirilebilir, probun penetrasyonunu arttırmaya yönelik modifikasyonlar gerçekleştirilebilir, hibridizasyon süresi arttırılabilir, duyarlılığı ve stabilitesi daha kaliteli olan floresan işaretli prob kullanılabilir ya da farklı dizilere spesifik problemler kullanılabilir. Bu şekilde denemeler yapılarak daha kaliteli pozitif sinyallerin elde edilmesi mümkün olabilir.

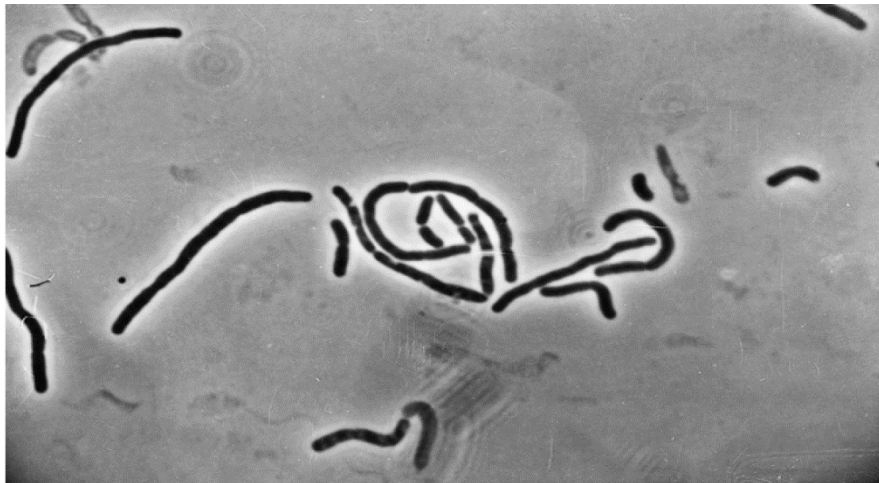
Eub 338 probu ile Bacteria için alınan pozitif sinyaller incelendiğinde ışığa veren hücrelerin uzun ve kısa basiller, spiral şeklindeki hücreler, kok şeklindeki hücreler, iğ şeklindeki hücrelerin varlığı tespit edilmiştir.

Işığa veren hücreleri incelediğimizde kıvrılmış basil görünümüne sahip hücrelerin Halorhodospira cinsine ait olabileceği düşünülmektedir. Özellikle *Halorhodospira halochloris* morfolojik açıdan ışığa veren hücrelerle benzemektedir. Bu cinsin gelişimi için NaCl gerekli olup pH 8.5- 9.0' da gelişim gösterirler. *Halorhodospira halochloris* 2.5-8 mikrometre uzunluğundadır ve fotosentetik pigment bakteriyoklorofil içeren anaerobik bir mikroorganizmadır (Garrity, 2005)



Şekil 4.2 *Halorhodospira halochloris* 'e ait faz-kontrast mikrografi

Uzun çubuklar şeklinde yoğun olarak görülen hücrelerin ise *Halomonas* cinsine ait olabileceği düşünülmektedir. *Halomonas* cinsi üyeleri düz veya kıvrık çubuklar şeklindedir. Gram negatiftirler ve koloniler beyaz, sarı veya açık kahverengidirler. Halotoleranttır ve %0.1 ile % 32.5 aralığındaki tuzlulukta gelişebilmektedirler. *Halomonas elongata* pH 5.0-9.0 arasında % 8 NaCl içeren ortamda 30-37 °C' de gelişebilmektedir (Garry, 2005). Ayrıca bu hücreler *Halomonas halophila*, *Halomonas halodurans*, *Halomonas eurihalina*, *Halomonas magadii*, *Halomonas salina* gibi diğer *Halomonas* türlerine de ait olabilir.



Şekil 4.3 *Halomonas elongata* strain 1H9 'a ait uzun ve kısa hücre formlarını gösteren faz-kontrast mikrografi

Işıma veren diğer hücrelerin morfolojisine baktığımızda kok, virgül ve spiral şekilli hücreler belirlenmiştir. Bu hücrelerin *Vibrio* cinsi ve *Marinobacter* cinsi gibi çeşitli Proteobacteria üyeleri ve Cyanobacteria üyelerine ait hücreler olabileceği düşünülmektedir. Alkalın ortamlarda aktinomisetler de bulunabileceğinden aktinomiset türlerine de bu tip ortamlarda rastlanabilmektedir.

Örnekleme alanlarını kıyaslayacak olursak; Tatvan ve Edremit kıyılarından alınan su örneklerinin çeşitlilik bakımından oldukça zengin olduğu belirlenmiştir. İzole edilen tür sayısı ve çeşitliliği yönünden Ahlat ve Merkez örneklerinden farklılık göstermektedir. FISH çalışmaları da bu sonucu desteklemektedir. FISH çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlara baktığımızda filtreden 3' er ml örnek geçirildiği halde Merkez ve Ahlat örneğinde hücre yoğunluğu oldukça azdır ve morfolojik olarak da çeşitlilik fazla değildir. Edremit ve Tatvan örneklerinden ise filtrelerden 1'er ml örnek geçirildiği halde hücre yoğunluğu ve morfolojik çeşitlilik oldukça fazla görünmektedir.

Sonuç olarak;

1. Van Gölü prokaryotik çeşitliliğinin belirlenmesine yönelik kültür bağımlı ve kültür bağımsız çalışmalar ilk kez gerçekleştirilmiştir.

2. Van Gölü çeşitli örnekleme bölgelerinden belirlenen *Halomonas*, *Marinobacter*, *Vibrio*, *Alkalimonas*, *Pseudomonas*, *Beliella*, *Dietzia*, *Rhodococcus* gibi cinslere ait türler belirlenmiştir. *Alkalimonas*, *Beliella*, *Rhodococcus* cinsine ait türler ülkemizde ilk kez belirlenmiştir.

3. Yapılan kültür bağımlı çalışmalarda Archaea izole edilememiş, izole edilen Bacteria domaini üyelerinin çoğunluğunun gram negatif ve Proteobacteria' ya ait olduğu belirlenmiştir.

4. Yapılan DGGE çalışmalarından verimli sonuçlar alınamamıştır. Elde edilen bantlar kesilerek dizi analizi gerçekleştirilmiş Enterobacteriaceae üyelerine benzerlik gösterdikleri saptanmıştır.

5. FISH sonuçlarından elde edilen verilere göre yoğun olarak Bacteria domainine ait türler mevcuttur. Archaea domainine ait spesifik problemlerle gerçekleştirilen FISH'de ise zayıf ışına sonuçları elde edilmiştir.

6. Alkalifilik mikroorganizmalar biyoteknolojik olarak oldukça önemli mikroorganizmalardır. Çalışmamızda biyoteknolojik olarak önemli türleri içeren *Halomonas* cinsi üyeleri, *Alkalimonas* cinsi üyeleri ve çeşitli aktinomiset türleri izole edilmiştir. Bu türlerin biyoteknolojik potansiyellerinin araştırılmasına yönelik çalışmalar yapılabilir.

Çalışmamız için gelecekte yapılması önerilen uygulamalar;

1. Van Gölü' nün prokaryotik çeşitliliğini belirleyebilmek için 16 S rRNA dizi analizleri tamamlanmayan izolatlar için dizi analizleri sonuçlandırılmalıdır. Yeni tür olma ihtimali olan izolatlar için tür tayini amacıyla DNA-DNA hibridizasyon teknikleri uygulanmalıdır.

2. Çalışma ortamında kültüre edilemeyen organizmalar bulunduğundan DGGE analizi gerçekleştirilmelidir. DGGE için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmelidir. Bu kapsamda denaturasyon gradienti ve elektroforez şartları değiştirilmelidir.

3. FISH çalışmalarında Archaea ve alfa-beta-gama proteobacteria problemlerinden sinyal verimi alınmamıştır. Hibridizasyon koşulları, hibridizasyon tampon bileşenleri konsantrasyonları ve prob konsantrasyonları değiştirilerek optimizasyon gerçekleştirilmelidir. Düşük hücre yoğunluğuna sahip su örnekleri konsantre edilmeli veya filtreden daha fazla miktarda örnek geçirilmelidir.

4. Çalışmamızda Archaea domainine ait herhangi bir sonuç elde edilememiştir. Ortamdaki az yoğunluktaki Archaea domaini üyelerini belirlemeye yönelik farklı izolasyon ve ekstraksiyon metodları denenebilir.

5. Çalışmamızda aktinomiset izolasyonu amacıyla da çeşitli besiyerleri kullanılmış ve bu besiyerlerinden çeşitli aktinomisetler izole edilebilmiştir. Ancak aktinomisetler daha çok yaygın olarak topraktan izole edilmektedirler. Bu yüzden çalışmamızın devamında Van Gölü çevresi kıyılarından toprak örnekleri alınarak aktinomisetlerin izolasyonu, tanımlanması ve çeşitliliğine yönelik çalışmalar yapılabilir.

6. Son dönemlerde alkalik ortamlarda siyanobakteriler yaygın olarak çalışılmaktadır. Van Gölü için de siyanobakterilerin üzerine çalışmalar gerçekleştirilebilir. Siyanobakteriler için özel izolasyon besiyerleri kullanılabilir.

Ayrıca özel primerler ve probler tasarlanarak moleküler çalışmalar gerçekleştirilebilir.

7.Çalışmamız sonucu elde edilen izolatlar alkalifilik izolatlar olduğu için biyoteknolojik çalışmalarda yaygın ve potansiyel bir uygulama alanına sahiptirler. Bu amaçla elde edilen izolatlardan biyoteknolojik uygulamalara yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Amann, R., Fuchs, B.M. ve Behrens, S. (2001), 'The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation.' *Current Opinion in Biotechnology*, 12:231–236.
- Antony, C.P., Murell, J.C., Souche, Y.S. (2012) 'Molecular diversity of methanogens and identification of *Methanolobus* sp.' as active methylotrophic Archaea in Lonar crater lake sediments' *FEMS Microbiol Ecol* 81 43–51
- Aono, R. (1990a). Taxonomic distribution of alkali-tolerant yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.*, 13, 394-397.
- Aono, R., ve Horikoshi, K. (1991). Carotenes produced by alkaliphilic yellow-pigmented strains of *Bacillus*. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2643-2645.
- Berber, İ., Yenidünya E. (2005), 'Identification of Alkaliphilic *Bacillus* Species Isolated from Lake Van and Its Surroundings by Computerized Analysis of Extracellular Protein Profiles.' *Turk J Biol* 29 181-188.
- Bilgili, A., Sağmanlıgil, H., Çetinkaya, N., Yarsan, E., Türel, İ. (1995), 'Van Gölü Suyunun Doğal Kalitesi ve Buradan Avlanan İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) Örneklerinde Bazı Ağır Metal Düzeyleri.' *Ankara Oniv Vet Fak Derg* 42: 445-450.
- Boone, D.R., Mathrani, I.M., Liu, Y., Menaia, J.A.G.F., Mah, R.A. ve Boone J.E. (1993). Isolation and characterization of *Methanohalophilus-portucalensis* sp.-nov. and DNA reassociation study of the genus *Methanohalophilus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43, 430-437.
- Bywaters, K., Braswell, S., Crowther, D., Leonis, B., Memmott, J., Moazeni F., Fritsen, C.H. (2010), 'Chemical Investigation of Soda Lake.' *Undergraduate Research Opportunities Program (UROP)*.
- Çiftçi, Y., Işık, M.A., Alkeveli, T., Yeşilova, Ç. (2008), 'Van Gölü Havzasının Çevre Jeolojisi.' *Jeoloji Mühendisliği Dergisi* 32 (2).
- Devereux, R., ve Wilkinson, S.S. (2004), 'Amplification of ribosomal RNA sequences.' *Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition* 3.01: 509–522

- Deshmukh, K.B., Pathak, A.P., Karuppayil, M.S. (2011), ‘ Bacterial Diversity of Lonar Soda Lake of India’ *Indian J Microbiol* (Jan–Mar 2011) 51(1):107–111
- Dyall-Smith, M. (2004), *Halohandbook*, www. microbiol.unimelb.edu.au / staff/mds/ HaloHandbook.
- Erinç, S. (1953), *Doğu Anadolu Coğrafyası*, İst. Üniv. Yay. No: 572, İstanbul.
- Foti, M. J., Sorokin, D., Zacharova, E.E., Pimenov, N.V., Kuenen, J.G., Muyzer, G. (2008), ‘Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia)’ *Extremophiles* 12:133–145
- Garrity, G.B., Don J.;Krieg, Noel, R.; Staley, James T. (2005), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Two: The Proteobacteria (Part C)*, Springer, 2005.
- Gorshkova N.M., Ivanova E.P., Sergeev A.F., Zhukova N.V., Alexeeva Y., Wright J.P., Nicolau D.V., Mikhailov V.V., Christen R. (2003), *Marinobacter excellens* sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003 Nov;53(Pt 6):2073-8.
- Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (2010), 10.1007/978-3-540-77587-4_122 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Horikoshi, K., *Alkaliphiles*, Springer, 2006.
- Horikoshi, K. (1999), ‘Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology’ *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999, 63(4):735.
- Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A.T., Robb, F.T., Stetter, K.O. (2011), *Extremophiles Handbook* , Springer.
- <http://www.dunyaharikalari.com/afrikada/turkana-golu>
- http://www.jmo.org.tr/resimler/ekler/a529a33dcc02eb3_ek.pdf?dergi=HABER%20DCLTE N%DD
- Humayoun, S.B., Bano, N. ve Hollibaugh, J.T. (2003), ‘Depth Distribution of Microbial Diversity in Mono Lake,a Meromictic Soda Lake in California,’ *Appl and Env Mic.*, 1030–1042.
- Huo, Y., Wang, C., Yang, J., Wu, M. ve Xu, X. (2008), ‘*Marinobacter mobilis* sp. nov. and *Marinobacter zhejiangensis* sp. nov., halophilic bacteria isolated

- from the East China Sea,' *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*., 58: 2885–2889.
- Jones, B.E., Grant, W., Grant, A.D., Duckworth, A.W. ve Owenson, G.G. (1998), 'Microbial diversity of soda lakes' *Extremophiles* 2:191-200.
- Jones, B.E., Grant, W., (1999), 'Microbial diversity and ecology of the Soda Lakes of East Africa' *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*.
- Kadıoğlu, M., Şen Z., Batur E. (1997), 'The greatest soda-water lake in the world and how it is influenced by climatic change.' *Ann. Geophysicae* 15, 1489±1497.
- Kanekar, P.P., Joshi, V.A.A., Kelkar, A.S., Borgave, S.B., Sernaik S.S. (2008), 'Alkaline Lonar Lake, India –A treasure of Alkaliphilic and Halophilic Bacteria', *The 12th World Lake Conference* :1765-1774.
- Kurata, A., Miyazaki, M., Kobayashi, T., Nogi, T., Horikoshi, K. (2007), 'Alkalimonas collagenimarina sp. nov., a psychrotolerant, obligate alkaliphile isolated from deep-sea sediment', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1549–1553.
- Lopez-Garcia P., Kazmierczak J., Benzerara K., Kempe S., Guyot F., Moreira D. (2005), 'Bacterial diversity and carbonate precipitation in the giant microbialites from the highly alkaline Lake Van, Turkey.' *Extremophiles* 9:263–274.
- Madigan T.M., Martinko J.M. (2010), *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. 11. Baskı.*, Palme Yayıncılık.
- Mwirichia, R., Cousin, S., Muigai, A.W., Boga, H. I. ve Stackebrandt E. (2011), 'Bacterial Diversity in the Haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya' *Curr Microbiol (2011)* 62:209–221
- Muyzer, G. (1999a), 'DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems,' *Current Opinion in Microbiology*., 2: 317-322.
- Muyzer, G. ve Smalla, K. (1998), 'Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology,' *Antonie van Leeuwenhoek.*, 73: 127-141.

- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schafer, H. ve Wawer, C. (2004), 'Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology' *Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition* 3.13:743-770.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. ve Vitterlinden, A.G. (1993), 'Profiling in complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA,' *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 695-700.
- Oremland R.S., Cloern J.E., Sofer Z., Smith R.L., Culbertson C.W., Zehr J., Miller L., Cole, B., Harvey R., Iversen N., Klug M., Des Marais D. J. ve Rau, G. 'Microbial and biogeochemical processes Soda Lake, Nevada' (http://sfbay.wr.usgs.gov/publications/pdf/oremland_1988_microbial.pdf)
- Oren, A. (2002a), '*Halophilic microorganism and their environments,*' Kluwer Academic Publishers, Boston, London, Dordrecht.
- Oren, A. (2002b), 'Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications,' *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.*, 28: 56-63.
- Öztürk, B., Balkıs, N., Güven, K.C., Aksu, A., Görgün, M., Ünlü, S., Hanilci, N. (2005), 'Van Gölü Sedimentü Üzerinde Araştırmalar II. Ağır metal ve Kükürt, Hidrojen sülfid ve Tiosülfurik asit S – (2-amino etil ester) içeriği.' *J. Black Sea/ Mediterranean Environment Vol 11*: 125- 138
- Reitner, J., Thiel, V. (2011) *Encyclopedia of Geobiology*, Springer.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, New York.
- Vetrovsky, T., Baldrian P. (2013), 'The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses.' *PLoS ONE* 8(2): e57923. doi:10.1371/journal.pone.0057923
- Wagner, M. ve Haider, S. (2012), 'New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes.' *Current Opinion in Biotechnology* , 23:96-102

- Wagner, M., Horn, M. ve Daims, H. (2003), 'Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes.' *Current Opinion in Microbiology*, 6:302–309
- Yıldız N., Yener, G., (2010), 'Van Gölü'nde Sediment Birikim Hızı, Radyoaktif ve Ağır Metal Kirliliğinin Tarihlemesi.' *Ekoloji* 19, 77, 80-87
- Yıldız, M. Z.ve Deniz O., (2005), 'Kapalı Havza Göllerinde Seviye Değişimlerinin Kıyı Yerleşmelerine Etkisi:Van Gölü Örneği.