

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**VAN GÖLÜ'NDEN TOPLANAN SEDİMENT ÖRNEKLERİNDEN
METİLOTROFİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Sedat KAVAK
DANIŞMAN: Dr. Öğr. Ü. Erdal ÖĞÜN

VAN -2018

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**VAN GÖLÜ'NDEN TOPLANAN SEDİMENT ÖRNEKLERİNDEN
METİLOTROFİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Sedat KAVAK
DANIŞMAN: Dr. Öğr. Ü. Erdal ÖĞÜN

VAN -2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Dr.Öğrt. Üyesi Erdal ÖĞÜN'ün danışmanlığında, Sedat KAVAK tarafından sunulan “**Van Gölü'nden Toplanan Sediment Örneklerinden Metilotrofik Bakterilerin İzolasyonu Karakterizasyonu**” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 04.07.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Dr.Öğrt. Üyesi Kerem ÖZDEMİR

İmza:

Dr.Öğrt. Üyesi Erdal ÖĞÜN

İmza:

Dr.Öğrt. Üyesi İbrahim KOÇ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim kurulunun07/2018 gün vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Suat SENSÖY
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Suat SENSÖY
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Sedat KAVAK



ÖZET

VAN GÖLÜ'NDEN TOPLANAN SEDİMENT ÖRNEKLERİNDEN METİLOTROFİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

KAVAK, Sedat

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Ü. Erdal ÖĞÜN

Temmuz 2018, 57 Sayfa

Bu araştırmada; metilotrofik bakterilerin izolasyonunda kullanılan sediment örneği Van Büyükşehir Belediyesi Atık Su Arıtma tesisinin açıldığı alandan sağlandı. Bu çalışmada metilotrofik bakterilerin izolasyonunda sadece bir izolatın % 1-5 oranında metanol içeren ortamda üredeği gözlemlendi. Halomonas S1 izolatu olarak adlandırılan bu izolatın morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikleri belirlenerek 16S rRNA gen bölgesinin dizi analizi gerçekleştirildi. İzolatlardan yalnız S1 kültürünün tek karbon ve enerji kaynağı olarak %1 metanol içeren besi yerinde üreyebildiği görüldü. Daha kesin bir sonuç elde etmek için S1 kültürü NMR tekniği kullanılarak test edildikten sonra S1 kültürünün metanolü yegane enerji ve karbon kaynağı olarak kullanma yeteneğine sahip olduğu gözlemlendi.

16S rDNA gen bölgesi; filogenetik analizde 1202 nükleotit'lik bir bölgede kıyaslanan S1 izolatının, 16 nükleotid fark ve % 98.6 benzerlik ile *Halomonas desiderata* (NR 026274)'ya benzediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak Gen Bankasındaki veritabanı ile karşılaştırılması sonucu suşun %100 benzerlikle *Halomonas desiderata* olduğu bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Halomonas desiderata*, Metanol, Metilotrof, Van Gölü

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF METHYL TROPHIC BACTERIA FROM SEDIMENT SAMPLES COLLECTING VAN LAKE

KAVAK, Sedat

M. Sc. Thesis, Department of Molecular Biology and Genetics

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Erdal ÖĞÜN

July 2018, 57 Page

In this study, the sediment sample used for the isolation of methylotrophic bacteria was supplied from the area where the Van Metropolitan Municipality Wastewater Enhancement Plant was opened. In this study, bacterial reproduction was observed in the isolation of methylotrophic bacteria only in a medium containing 1-5% methanol of one isolate. Sequence analysis of the 16S rRNA gene region was performed by determining the morphological, physiological and biochemical properties of this isolate called *Halomonas* S1 isolate. It was observed that only S1 isolate were able to produce only carbon from the isolates and 1% methanol in the feed as energy source. In order to obtain a more precise result, it was observed that S1 culture had the ability to use methanol as the only energy and carbon source after it was tested using NMR technique.

The S1 isolate compared to the 1202 nucleotideregion in the 16S rDNA gene region phylogenetic analysis was found to be similar to *Halomonas desiderata* (NR 026274) with 16 nucleotide differences and 98,6% similarity. It is also found that the database in the GenBank using BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) programme is *Halomonas desiderata* with 100% similarity to the comparator isolate.

Keywords: *Halomonas desiderata*, Methanol, Methylotroph, Van Lake



ÖN SÖZ

Yüksek lisans çalışmam boyunca bana böyle bir çalışma imkanı veren, araştırma konumun belirlenmesinde beni yönlendiren ve sonuçlanması için her türlü fedakarlığı yapan kıymetli danışmanım Dr.Öğrt. Üyesi Erdal ÖĞÜN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Başta Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof. Dr. İsmail ÇELİK olmak üzere Moleküler Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Dr.Öğrt. Üyesi Kerem ÖZDEMİR, Dr.Öğrt. Üyesi Metin ERTAŞ, Doktora öğrencisi Nevroz ARSLAN ve Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Arif KIVRAK'a göstermiş oldukları iyi niyet ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Benim bu aşamalara gelebilmemde her türlü fedakarlığı yapan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemedi her türlü zorlukta destekçim olan çok değerli ve sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

2018

Sedat KAVAK



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
EKLER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
2.1. Bir Soda Gölü Olan Van Gölü	3
2.2. Metilotrofik Metabolizma	3
2.3. Metan	6
2.3.1. Metanojenler	6
2.3.2. Metan üretimi (metanojenezis)	7
2.3.3. Metanotrofik bakteriler	8
2.3.4. Metan oksidasyonu	12
2.3.4.1. Toprakta anaerobik metan oksidasyonu	12
2.3.4.2. Deniz ve göl sedimentlerinde metan oksidasyonu	12
2.3.4.3. Aerobik şartlarda metan oksidasyonu	13
2.3.5. Soda göllerindeki metan döngüsü	13
2.4. Bazı Düşük Molekül Ağırlıklı Metanojenik Substratlar	14
2.4.1. Asetat	14
2.4.2. Metanol	15
2.4.2.1. Metanolün kaynağı	15
2.4.2.2. Metanol oksidasyonu	16

	Sayfa
2.4.3. Metillenmiş aminler	16
2.4.4. Metillenmiş sülfidler	18
2.5. Halomonas Cinsi	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Metilotrofik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyeri	23
3.1.1.1. Metilotrofik besiyeri	23
3.1.2. Kullanılan çözelti ve boyalar	24
3.1.2.1. Kristal Viyole boyası	24
3.1.2.2. Safranin boyası	24
3.1.2.3. Lügol çözeltisi	24
3.1.2.4. Alfa - naftol çözeltisi	24
3.1.2.5. Sülfanilik asit çözeltisi	24
3.1.2.6. %3'lük H ₂ O ₂ çözeltisi	24
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Sediment örneklerinin toplanması	25
3.2.2. Örneklerden metilotrofik bakterilerin izolasyonu	25
3.2.3. Metilotrofik bakterilerin saf kültürlerinin elde edilmesi	25
3.2.4. S1 kültürlerinin koloni ve hücre morfolojilerinin incelenmesi	25
3.2.5. Bakteri suşlarının gram boyama yöntemi ile boyanması	26
3.2.6. Biyokimyasal testler	26
3.2.6.1. İndol testi	26
3.2.6.2. Sitrat testi	26
3.2.6.3. Metil Red (MR) testi	27
3.2.6.4. Karbonhidrat oksidasyon / fermentasyon testleri	27
3.2.6.5. Nitrat indirgenmesi testi	27
3.2.6.6. Beta Galaktosidaz (ONPG) testi (OXOID ONPG DISCS Code: DD0013)	27
3.2.6.7. Oksidaz testi (Microbact Oxidase Strips MB0266)	28

Sayfa

3.2.6.8. Katalaz testi	28
3.2.6.9. Tween 80 hidroliz testi	28
3.2.6.10. Kazein hidroliz testi	28
3.2.7. Metanol kullanımının belirlenmesi	29
3.2.8. Moleküler yöntemler	29
3.2.8.1. Genomik DNA izolasyonu	29
3.2.8.2. 16S rRNA'nın PZR amplifikasyonu	31
3.2.8.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi	33
4. BULGULAR	35
4.1. Metilotrofik Bakterilerin Saf kültürlerinin Elde Edilmesi	35
4.2. Metilotrofik İzolatın Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	35
4.3. NMR Tekniğiyle S1 İzolatının Metanol Kullanımını Belirlemek	39
4.4. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi	40
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
KAYNAKLAR	49
EKLER	53
ÖZ GEÇMİŞ	57

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. PZR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar.....	30
Çizelge 3.2. 16S rRNA gen bölgesi PZR reaksiyon şartları.....	31
Çizelge 4.1. S1 izolatına uygulanan biyokimyasal testler.....	35





ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Calvin döngüsü.....	5
Şekil 2.2.	Metilotroflarda C ₁ özümlemesi için karakteristik enzimler.....	5
Şekil 2.3.	Deniz sedimentlerindeki organik maddenin adım adım degradasyon.....	8
Şekil 2.4.	Formaldehit özümlemesi ve metan oksidasyonunun yolları.....	10
Şekil 2.5.	Formaldehit fiksasyonu için RuMP yolu.....	10
Şekil 2.6.	Formaldehit fiksasyonu için serin yolu.....	11
Şekil 2.7.	Soda göllerindeki karbon döngüsü.....	14
Şekil 2.8.	Dimetilaminin degradasyonu ve oluşumu.....	17
Şekil 2.9.	Deniz sedimentlerindeki metillenmiş kükürt bileşiklerinin mikrobiyal dönüşümü.....	19
Şekil 3.1.	Van gölü ve diğer bazı sodalı göllerin dünya üzerindeki konumları ve resimleri.....	22
Şekil 4.1.	S1 izolatının alkali besiyerindeki görüntüsü.....	34
Şekil 4.2.	S1 izolatına ait Oksidaz testi.....	36
Şekil 4.3.	S1 izolatının Katalaz testi.....	36
Şekil 4.4.	S1 İzolatının gelişebildiği metanol aralığı.....	36
Şekil 4.5.	Nitrat ve diğer bazı testlerin sonuçları.....	36
Şekil 4.6.	Bazı şeker testlerinin sonuçlar.....	37
Şekil 4.7.	Kazein hidrolizi.....	37
Şekil 4.8.	S1 izolatın gelişebildiği tuz aralığı.....	37

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Negatif kontrol.....	38
Şekil 4.10. Pozitif kontrol.....	38
Şekil 4.11. Deneme.....	39
Şekil 4.12. 16S rDNA analizi için Neighbour-joining algoritması ile oluşturulan filogenetik ağaç.....	40



EKLER LİSTESİ

Ek	Sayfa
Ek 1. Besiyerleri.....	49
Ek 2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar.....	50





SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
Tg	1 Milyar kg
Bç	Baz çifti
G	Gram
M	Molar
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Nt	Nükleotit
µg	Mikrogram
°C	Santigrat Derece
sp.	Tür (tek)
spp.	Türler
subsp.	Alttür
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
S	Sedimentasyon (çökeltme) katsayısı
kDa	Kilo Dalton

Kısaltmalar	Açıklamalar
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetat

Kısaltmalar	Açıklamalar
TSB	Tryptic Soy Broth
STE	Sodium Chloride-Tris-EDTA
TBE	Tris Boric Asit EDTA
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TE	Tris EDTA
ddH₂O	Deionize saf su
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu



1.GİRİŞ

Soda gölleri dünya üzerindeki en ekstrem akuatik çevreler arasındadır ve yüksek pH (9.0-12.0) ve yüksek tuzluluk (%35 w/v'e kadar) oranıyla karakterizedir. Soda göllerinin anoksik alt sedimanlarındaki biyokütlenin dekopozisyonu metanojenezi destekleyen birçok substrat üretebilir (Antony ve ark., 2012).

Soda göllerinin çok bileşenli mikrobiyal kominiteleri stabil trofik ilişkilere ve hemen hemen kapalı bir organik madde döngüsüne sahiptir. Kalyuzhnaya ve ark. (1999, 2000) Güney Sibiryada soda göllerinden birçok haloalkalofilik metanotrof izole ettiler ve metan oksidasyon ara ürünlerinin (metanol, formaldehit ve format) kültür besiyerine salındığını gösterdiler. Mantıksal olarak haloalkalofilik heterotroflar, oligotroflar ve metanotroflar bu alkalın ekosistemlerdeki ortak organik madde havuzu içine tamamlanmamış metan oksidasyon ürünlerinde mevcut karbonun geri dönüşümü için C1 birimleri sağlayan aerobik metilobakterileri içermelidir (Doronina ve ark., 2003). Ayrıca Colne Estuary'nin ağız kısmında üst yüzey sedimentindeki metan konsantrasyonları 0,5-1µM arasında değişir. Flax Pond'ın bir nehir ağız sedimentinde 5-60 nM hesaplanırken Lowes Cove'un gelgitli sedimenletlerinde metanol ve monometilamin konsantrasyonları yaklaşık 3µM olarak hesaplandı. Bu C1 bileşiklerini sahil sedimanlarında önemli konsantrasyonlarda bulunduğunu ve bunun da metilotrofların bu bileşiklerin oksitlenmesi ve asimilasyonunda yer aldığını düşündürmektedir (Moussard ve ark., 2009).

Çevre kirliliği insan aktivitesi ve endüstriyel süreçlerin önemli bir sonucudur. Madencilik ve elektrokaplama gibi farklı endüstriler çeşitli toksik kimyasallar içeren sulu atıklar salarlar. Bu endüstrilerden kaynaklı atık sular insan ve çevre için kalıcı toksik etkilere sahiptir. Metanol popüler organik çözümlerden biridir ve endüstrilerde ve ev kullanımlarında geniş uygulama alanları bulur. Metanol solunum ve oral yolla hızlı ve iyi absorbe edilir. Metanotroflar bir çok ekosistemdeki mikrobiyal besin zincirinin önemli bileşenlerinden olan metanol, metan ve metilamin gibi C1 bileşiklerini kullanan metilotrofik bakterilerin özgün bir grubudur (Tambekar ve ark., 2013). Bu mikroorganizmalar oldukça hızlı adapte olur ve enerji ve karbon kaynağı olarak zararlı bileşiklerini kullanarak ekstrem şartlarda gelişebilirler (Tambekar ve ark., 2014).

Metilotrofik bakteriler filamentöz metan oksitleyici *Alphaproteobacteria* (type II methanotrophs) ve *Gammaproteobacteria* (type I methanotrophs) ve *Verrucomicrobia* gibi filogenetik olarak çeşitli filumlara ayrılmıştır ve biyokimyasal karbon döngüsüne önemli katkı yapar (Tambekar ve ark., 2013).

Metan oksidasyonunda başlangıç adımı, metanın metanole dönüşümü, metan monooksijenaz (MMO) tarafından gerçekleştirilir. MMO'nun iki farklı tipi bilinmektedir: bazılarında metanotroflarda bulunan bir stoplazmik çözünebilir form (sMMO) ve nerdeyse çalışılan tüm metanotroflarda bulunan membran bağımlı partikül form (pMMO). pMMO'nun 27 kDa'lık alt birimini kodlayan *pmoA* geni metanotrofik bakteriler arasındaki evrimsel ilişkileri yansıtır ve metanotroflar için uygun bir fonksiyonel gen markıdır (Moussard ve ark., 2009).

Metan ve ilgili C1 bileşiklerinin küresel döngüsü, iklim değişikliği ile ilgili çevresel fenomeni daha da etkilemektedir. Metanolün toksisitesi yaygın biçimde belgelenmiştir ve insan ve çevreye yönelik feci etkileri büyük önem taşımaktadır. Günümüzde C1 bileşiklerinin kullanımı onların toksisitesinden dolayı araştırmacı ve endüstriden birçok insanın dikkatini önemli ölçüde cezbetmiştir. Mevcut çalışma Van gölünden metilotrofik bakterileri izole etmeyi amaçladı. Bu bakteriyal izolatların filogenetik analizi çevredeki küresel gazların kirlilik düzeylerini azaltma ve mikrobiyal çeşitlilikle ilgili olarak gelecek araştırmalarda çok faydalı olabilir (Tambekar ve ark., 2013).

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Bir Soda Gölü Olan Van Gölü

Soda gölleri genellikle natron ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) ve trona ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{NaHCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) olarak mevcut sodanın yüksek konsantrasyonları ile karakterizedir. Bu çevreler diğerlerinin aksine önemli bir tamponlama kapasitesine sahiptir ve çok yüksek pH düzeylerinde stabildir. Sodalı göller doğal üretken sıvı çevrelerdir ve onların verimliliği alışılmışın dışında prokaryotlardan kaynaklanır. Son zamanlarda gösterildiği gibi alkali soda göllerindeki mikrobiyal kominiteler organik maddelerin sentezi ve yıkımına yol açan fototrofik, proteolitik, sellüloolitik, sülfat indirgeyen ve metanojenik prokaryotları içeren anahtar tropik grupların üyelerini barındırır (Doronina ve ark., 2003).

Bir soda gölü olan Van gölü dünya üzerindeki dördüncü en büyük göldür (607 km³ lük hacim, 3570 km²'lik alan, 450 m'lik maksimum derinlik, deniz seviyesinden 1648 m yüksekliğiyle). Van gölü aynı zamanda dünya üzerindeki en büyük soda gölüdür. pH'sı 9.7-9.8 arasında ve tuzluluk oranı %2,17'dir. Bu tuzluluğa NaCl ve sodyum karbonat eşit paylarda; magnezyum, potasyum ve sülfat az miktarlarda katkı yapar. Kalsiyum konsantrasyonu çok düşüktür (4.6mg/l) (Kempe ve ark., 1991).

2.2. Metilotrofik Metabolizma

Çevredeki karbon akışı dünya üzerindeki çeşitli ekosistemlerin küresel karbon döngüsüyle açıklanabilir. Karbon dünya üzerinde en bol bulunan elementlerden biridir, yaşamın temel taşıdır. Bu yüzden insanlar için iklim, iklim değişkenliği ve enerji kaynaklarında önemli bir rol oynar. Ölü dokuların ve organik materyallerin bakteriyel ve fungal ayrışması, solunumun bir sonucu olarak karbondioksitin atmosfere atılmasına neden olur ve sonuçta fotosentez sürecinde bitkiler tarafından karbondioksit kullanılır. Metilotroflar CH₄ gibi sera gazlarını kullanan ve küresel ısınmanın etkisini azaltan önemli mikroorganizma grubudur. Metilotroflar çok sayıda bitki ve fotosentetik bakterinin yanı sıra enerji kaynağı için CH₄ kullanıcılarından biridir. Heterotroflarda gelişmek için organik bileşikleri kullanır ve onu CO₂ çevirir. Karbon döngüsündeki bu

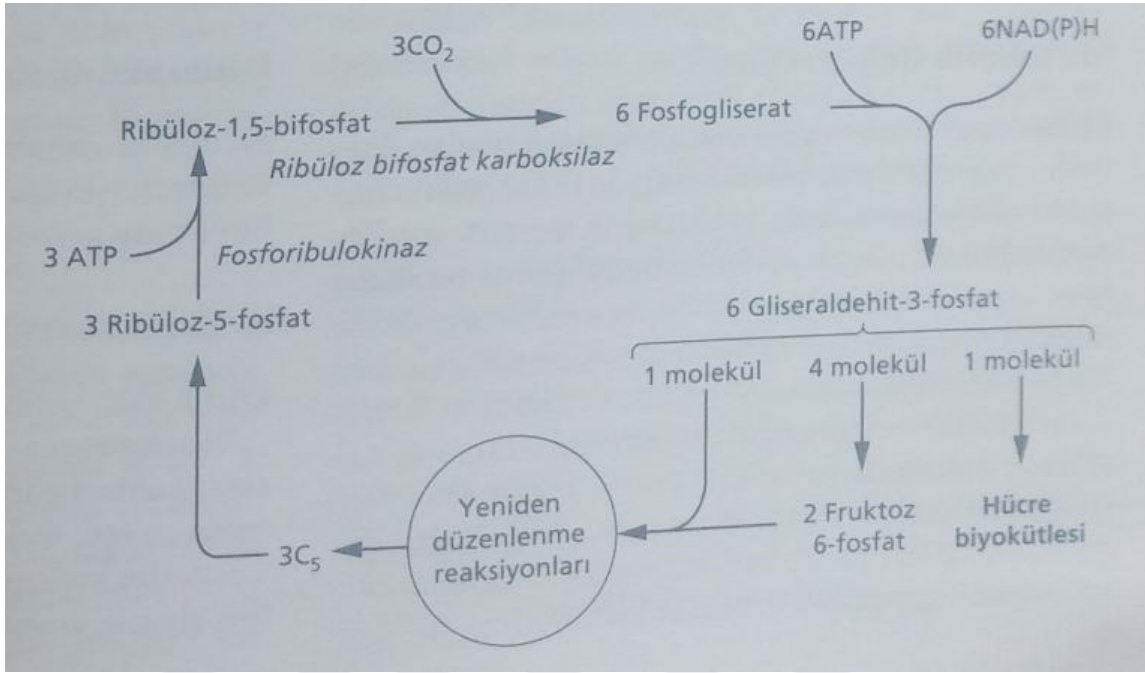
denge karbondioksit fiksasyonu, metanorofi, metanogenez, fermantasyon ve anaerobik solunum gibi çeşitli kimyasal dönüşümlerle sürdürülür (Kumar., 2017).

Metilotrofi, mikroorganizmaların CO₂ dışındaki bir karbonlu bileşikleri karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğidir. Bu tek karbonlu bileşikler metan, metanol, format, karbon monoksit, klorometan ve siyanür gibi bileşikleri kapsar. Bu tanım birden fazla karbon atomu içeren dimetilamin, trimetilamin ve tirimetilsülfid gibi karbon-karbon bağı içermeyen bileşikleri de içine alır. Metilotroflar aerobik ya da anerobik olabilirler ve 3 kategoriye ayrılırlar.

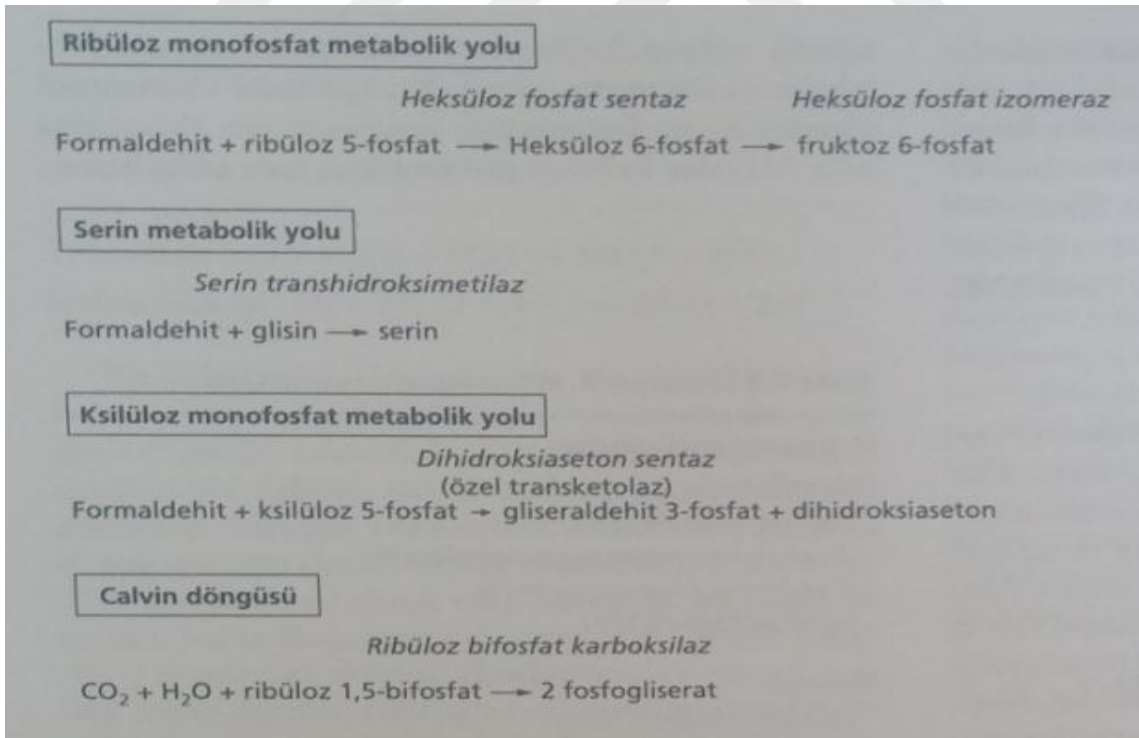
1. Heterotrof metilotroflar, polikarbon bileşikleri üzerinde heterotrof olarak gelişebilirler.
2. Zorunlu metilotroflar, polikarbon substratlarında ya da CO₂ üzerinde gelişemezler.
3. Ototrofik metilotroflar veya C1- kullanıcıları, indirgenmiş bir-karbonlu bileşikleri karbondioksite (CO₂) okside ederler ve ardından daha önce belirtildiği gibi Calvin döngüsü ile fiksasyonu gerçekleştirir.

Heterotrofik ve zorunlu metilotrofik bakteriler iki özümleme yolundan biri olan ribüloz monofosfat metabolik yolunu (Quayle Döngüsü) ya da serin metabolik yolunu kullanırlar. Ribüloz monofosfat metabolik yolunun iki değişik biçimi vardır ve evrimsel olarak Calvin Döngüsünden önce yer alıyor olabilir. Mayalar ksilüloz metabolik yolunu(dihidroksiaseton döngüsü) kullanırlar. Her metabolik yolun kilit enzimleri Şekil 2.1'de verilmiştir. Bu üç özümleme metabolik yolunda da indirgenmiş C1 bileşikleri formaldehit seviyesinde özümseilir ve 3 formaldehit molekülünün fiksasyonundan net olarak 1 üç karbonlu bileşik üretimi gerçekleşir. Calvin döngüsünde ise bunun yerine 3 CO₂ molekülü üretilir. Daha sonra bu üç karbonlu (C₃) bileşikler biyosentetik metabolik yollarına girmeye hazır hale gelir (Morgan ve ark., 2009).

Metilotroflarda karbon özümlemesi ve yıkımında (enerji üretimi) fonksiyonel farklılıklar vardır. Bazı bakterilerde bu yıkım fosfoglukonat yolunda meydana gelse de, çoğu organizma üretilen formaldehitin bir kısmının lineer metabolik yol üzerinden CO₂ üreterek enerji elde eder (Morgan ve ark., 2009).



Şekil 2.1. Calvin döngüsü.



Şekil 2.2. Metilotroflarda C₁ özümlemesi için karakteristik enzimler.

2.3. Metan

Metan en küçük fakat dünya üzerinde en bol bulunan hidrokarbondur. En potent sera gazlarından biri olan metan dünya üzerindeki sera gazı etkisi, atmosferik kimya, küresel karbon döngüsü ve deniz sedimentlerinde gaz hidratların oluşumunda önemli rol oynar. Mikrobiyal metan üretimi organik madde degradasyonunda terminal basamaktır. Atmosferik metanın temel kaynağı sulak alanlar, hayvanlardaki bağırsak fermantasyonu (termitler, ruminantlar), pirinç üretimi, yakılan biyokütle ve fosil yakıtlardır (Zhuang, 2014).

CH₄ topraklarda hem üretilmekte hem de tüketilmektedir. Atmosfere verilen toplam CH₄ emisyonu yaklaşık 410 Tg CH₄-C/yıl'dır. Bu toplam emisyonun yaklaşık % 32'si bataklıklardan ortaya çıkmaktadır. Doğal bataklıklardan yılda 86, çeltik arazilerinden ise 45 Tg CH₄-C' u atmosfere karışmaktadır. Termitler ve hayvansal atıklar da dahil edildiğinde, metanın topraktan kaynaklanan miktarı % 44'e çıkmaktadır (Okur ve ark., 2008). Küresel metan döngüsüne okyanusların katkısı sınırlı olmasına rağmen, deniz sedimentleri dünyanın en büyük metan rezervuarlarıdır (Zhuang, 2014).

2.3.1. Metanojenler

Dünyadaki tüm canlılar temelde bakteri, arkea ve ökaryot olmak üzere 3 domaine ayrılır. Metanojenler *Euryarchaeota* filumuna dahil meabolizmanın temel son ürünü olarak metan üreten katı bir şekilde anaerobik arkealardır (Zinder, 1993).

Biyolojik metanogenezis dünyadaki karbon döngüsünde önemli bir rol oynar. Metanojenez, deniz ve tatlı su çökeltileri, jeotermal yaşam alanları ve hayvan gastrointestinal yolları gibi birçok anaerobik habitatta karbon akışı için terminal adımdır. Anaerobik habitatlardan kaçan CH₄ aerobik metanotrofik bakteriler için bir karbon ve enerji kaynağı olarak görev alabilir. Metan atmosferik kimyasal reaksiyonlarda önemli bir bileşendir aynı zamanda önemli bir sera gazıdır (Zinder, 1993).

Metanojenezin birçok pratik uygulaması vardır. Organik atıkların anaerobik arıtım, atık su arıtma tesislerinde neredeyse bir asırdır kullanılmaktadır. Metanojenik karışık kültürler kullanarak çeşitli endüstriyel ve tarımsal atıkların iyileştirilme

çalışmalarına artan bir ilgi vardır. Çünkü metanojenik atık arıtma sistemleri enerji tasarrufu yapabilir hatta enerji üretebilir bile. Metanojenik karışık kültürler, halojenize ve aromatik organik bileşiklerde dahil olmak üzere bazı toksik atıkların tedavisinde ciddi olarak düşünülmektedir. Bir başka insan yapımı metanojenik habitat düzenli çöp toplama alanlarıdır (Zinder., 1993).

Çevredeki atıkların arıtılması ve enerji korunumundaki rolü nedeniyle, metanojenik habitatlar üzerinde önemli çalışmalar yapılmıştır. Metanojenlerin ekolojisinin incelenmesi birçok diğer mikrobiyal gruptan daha kolaydır. Çünkü metanojenler, anaerobik habitatlardaki karbon akışının önemli bir bölümünü oluşturan iyi tanımlanmış reaksiyonları yürütürler ve metanojenler onların doğal habitatlarındaki sayımlarını kolaylaştıran eşsiz özelliklere (antibiyotiklere direnç, F₄₂₀'nin mevcudiyeti gibi) sahiptir (Zinder, 1993).

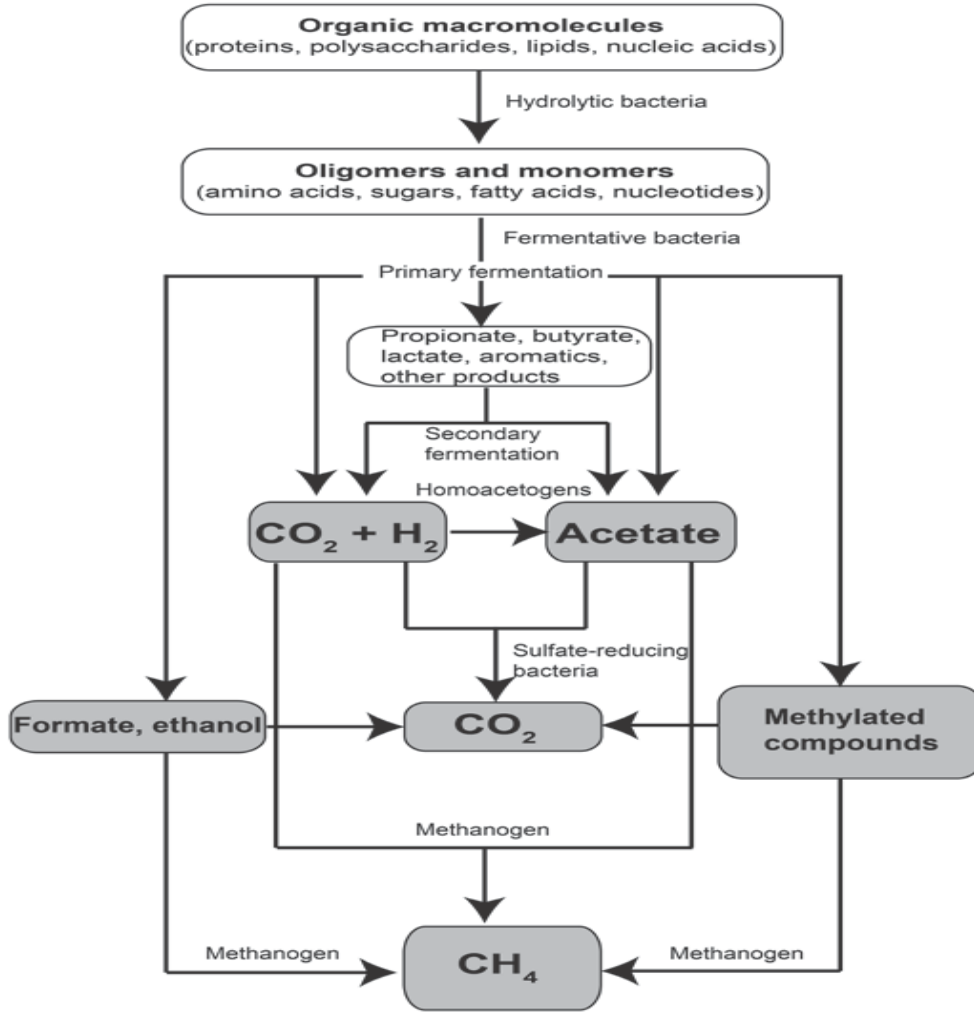
2.3.2. Metan üretimi (metanojenezis)

CH₄, methanojenler olarak bilinen bir grup anaerobik bakteri tarafından üretilir. Bu bakteriler -100 mV'dan daha düşük redoks potansiyellerine ihtiyaç duyan obligat anaerobiktirler. Bu nedenle redoks potansiyeli, CH₄ üretimini başlatan veya sonlandıran bir anahtar konumundadır. Redoks potansiyeli yeterince düştüğünde CH₄ üretimi başlamakta ve bu aşamada CH₄ üretim hızı üzerinde substrat miktarı ve sıcaklık ana kontrol edici faktörler olmaktadır. Methanojenler metanı toprakta iki şekilde üretirler:

1. CO₂ + H₂ \longrightarrow CH₄ (CO₂ Redüksiyonu)
2. CH₃COOH \longrightarrow CH₄ + O₂ (Asetat fermantasyonu) (Okur, 2008).

Deniz sedimentlerinde metan başlıca organik maddelerin bozunmasıyla oluşur. Bu durum mikrobiyal ya da termokimyasal yolla meydana gelebilir. Fotosentez yoluyla okyanusun ışık alan bölgelerinde oluşan bu organik maddeler sedimentasyon boyunca ekseriyetle oksik su kolonunda mineralizedir ve sadece küçük bir kısmı sediment yüzeyine taşınır. Çeşitli mikroorganizmaların müdahalesiyle organik maddelerin bu küçük kısmının degradasyonu erken diyajenez için itici güç olacaktır. Yapısal karbonhidratlar, proteinler, nükleik asitler ve lipit kompleksleri gibi makromoleküller prokaryotik organizmalar tarafından direk metabolize edilemediği için bu polimerler bakteriler tarafından üretilen ekstraselüler enzimlerle ilk olarak oligomer ya da

monomerlere hidrolize edilir. Ardından fermente edici bakteriler H_2 ve CO_2 'in yanı sıra uçucu yağ asidi ve alkolleri(format, asetat, propiyonat, etanol gibi) içeren sınırlı sayıda fermantasyon ürünleri olan monomerik bileşikleri degrade eder. Daha ileri bir fermantasyon adımı boyunca ürünler H_2 , asetat ve CO_2 gibi anahtar metabolitlere dönüştürülebilir (Zhuang., 2014).



Şekil 2.3. Deniz sedimentlerindeki organik maddenin adım adım degradasyonu.

2.3.3. Metanotrofik bakteriler

Metanotrofik bakteriler ya da metanotroflar metilotroflar olarak bilinen bakterilerin bir fizyolojik alt grubudur. Metanotrof bakteriler yegane enerji ve karbon

kaynağı olarak metan, metanol ve metilamin gibi C1 bileşiklerini kullanabilen eşsiz mikroorganizmalardır (Tambekar ve ark., 2014).

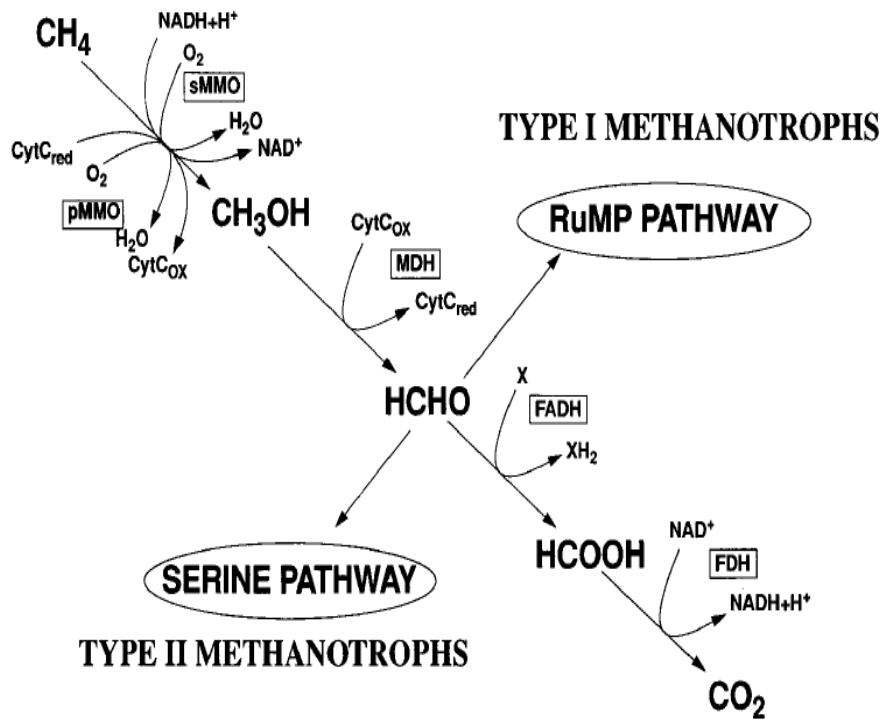
Metanotroflar metanı tek enerji ve karbon kaynağı olarak kullanmalarıyla diğer mikroorganizmalardan ayrılırlar. Ancak fizyolojik ve filogenetik olarak farklıdır (Arkeanın Euryarchaeota filumunun yanı sıra γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria Verrucomicrobia ve NC10 bakteriyal filumlarıyla bağlantılıdır.). Başlangıçta sadece aerobik metanotroflar bulunmuştu fakat şimdi sülfat, demir, nitrit ve mangan indirgenmesiyle bağlantılı anaerobik olarak farklı mikroorganizmalar tarafından da metanın oksidize edilebildiği bilinmektedir (Dourado ve ark., 2012).

Metanotroflar ubikütözdür ve küresel karbon ve azot döngüsünde önemli bir rol oynarlar ayrıca zararlı organik materyallerin biyodegradasyonu için faydalı oldukları bulunmuştur (Semrau ve ark., 2011).

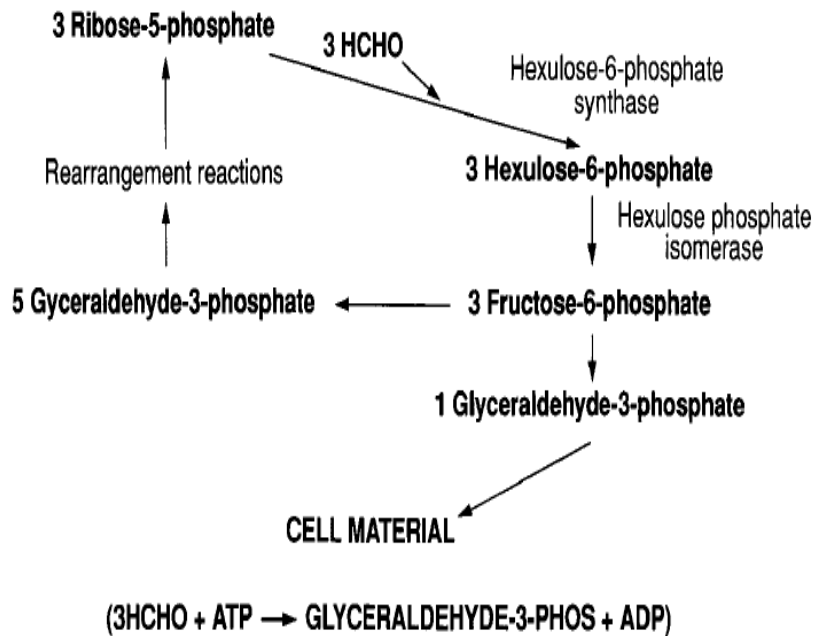
Metilotrofik bakteriler ise enerji ve karbon kaynağı olarak formik asitten daha fazla indirgenmiş bir karbonlu bileşiklerini kullanan aerobik bakterilerdir. Metilotrofik bakteriler metan, metanol, metillenmiş aminler, halometanlar ve metillenmiş kükürt bileşiklerini gibi çeşitli bir karbonlu bileşiklerini kullanırlar. Bazıları kolin, pestisit, karbofuran dahil organik bileşiklerden metil gruplarını ayırır ve onları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar. Format, siyanat ve karbonmonoksit kullanan bakteriler bir karbonlu bileşiklerini asimile etmek için farklı metabolik yollara sahiptir (Hanson ve ark., 1996).

Metanın metanole oksidasyonunu katalizlemek için metan monooksijenaz olarak bilinen enzimleri kullanmak metanotrofların karakteristik bir özelliğidir. Şekil 2.4'de, substratların metanotroflar tarafından metabolizmasını, katabolizma ve anabolizmada bir ara madde olarak formaldehitin merkezi rolü ve merkezi metabolik yolların ara ürünlerinin sentezi için kullanılan eşsiz yolları içeren onların metabolizmalarının ortak özelliklerini göstermektedir. Metanotrofik bakterilerde bulunan formaldehit asimilasyonunun iki yolu Şekil 2.5 ve 2.6'da gösterilmiştir.

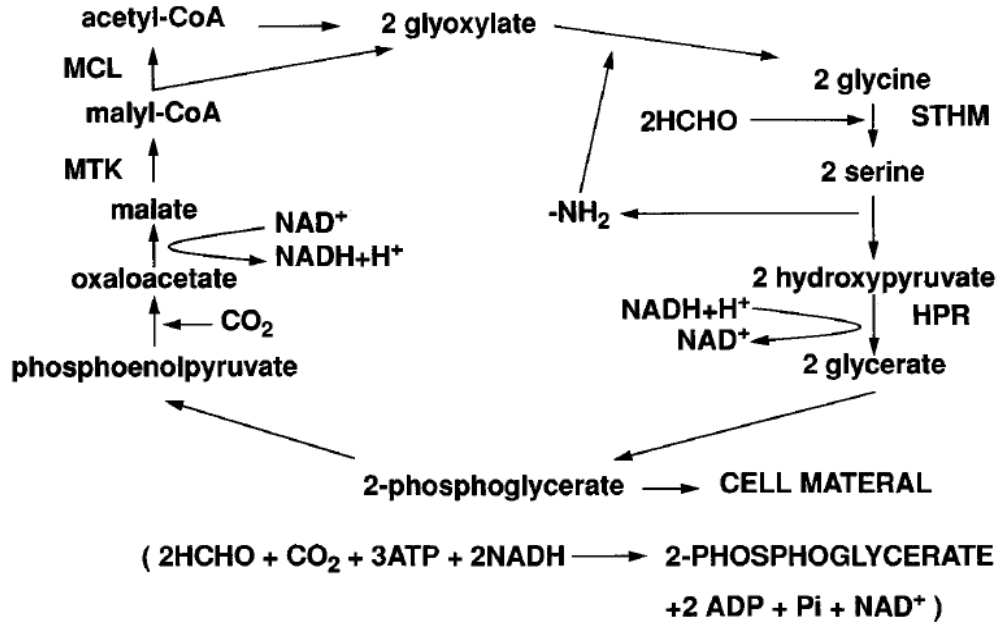
Metanol üzerinde gelişen maya suşları formaldehit asimilasyonu için dihidroksiaseton olarak bilinen başka bir yol izlemektedir. Metan anaerobik çevrelerdeki en stabil karbon bileşiğidir ve nihayetinde organik maddenin mineralizasyonuna yol açan reaksiyonlarda çok önemli bir ara bileşiktir (Hanson ve ark., 1996).



Şekil 2.4. Formaldehit özümlemesi ve metan oksidasyonunun yolları.



Şekil 2.5 Formaldehit fiksasyonu için RuMP yolağı.



Şekil 2.6. Formaldehit fiksasyonu için serin yolağı.

Metan metanotroflar tarafından oksidize edilmediği zaman anaerobik çevrelerden atmosfere kaçar. Metanın atmosfere salınması küresel ısınmanın artması ve atmosferin kimyasal kompozisyonundaki başka değişimlerle sonuçlanır. 1906'da Shöngen metanın büyük miktarlarda üretildiğini fark etti ve bu gazın düşük atmosferik konsantrasyonunun mikroplar tarafından metanın okside edilmesinden kaynaklandığını ileri sürdü. O ilk metan okside eden bakteriyi izole etti ve onu *Bacillus methanicus* olarak adlandırdı. Anaerobik metan oksidasyonunun mikrobiyolojisi ve biyokimyası hakkındaki yayınlar kısıtlı olmasına rağmen, metan oksidasyonunun hem aerobik hem de anaerobik çevrelerde meydana geldiği bilinmektedir. Metan kullanan bakteriler, bazı kemolitotrofik bakterilerle birlikte okyanustaki soğuk gaz sızıntılarının ve hidrotermal deliklerin yakınında fotosentezden bağımsız bir besin zincirinin tabanını oluşturuyor (Hanson ve ark., 1996).

Metanotrofları çok sayıda biyotransformasyon kataliz etme yeteneğinden dolayı ticari değeri olan kimyasalların üretimi için metan monooksijenaz içeren bakterilerin kullanımında ve toksik kimyasalların degradasyonu(biyoremedasyon) için biyolojik metotların gelişimi konularında bilim adamlarının ilgisini cezbetmiştir (Hanson ve ark., 1996).

2.3.4. Metan oksidasyonu

2.3.4.1. Toprakta anaerobik metan oksidasyonu

Metanotroflar, su ile kaplı toprakların üst tabakaları ile yüksek yerlerin kuru topraklarını da içeren birçok anaerobik ortamda bulunmaktadır. Su ile kaplı alanlardaki (doğal bataklık ve çeltik arazilerinde) metanotroflar, aerobik zonun altındaki anaerobik zonda üretilen metanı kullanırlar. Orman, çayır arazileri ve tarım toprakları gibi diğer topraklarda ise metanotroflar atmosferik metanı kullanırlar. Bu topraklarda atmosferik CH₄ tüketimi büyük ölçüde toprak profiline nüfuz olan metanın miktarı ile ilişkilidir. Tarım alet ve makinelerinin trafiği ve diğer aktiviteler sonucu toprak sıkışmasının artması, toprakta hava ile dolu boşluk miktarını azaltmakta ve bu da CH₄ tüketimini azaltmaktadır. Birçok toprakta CH₄ tüketimi alt toprak tabakalarında ve genellikle de A ile B horizonu arasında gerçekleşir. Yüzey toprak tabakaları ise H₂, CO, NO ve N₂O gibi gazların en fazla üretildiği ve tüketildiği yerlerdir. CH₄ oksidasyonu, yoğun bir azot gübrelemesinden sonra toprakta artan yüksek amonyum konsantrasyonu ile de engellenebilmektedir. Bu reaksiyon birçok ekosistemde saptanmıştır. Artan azotlu gübre kullanımı ve atmosferik azot birikimi küresel CH₄ tüketimini azaltabilir. Bu da atmosferde daha yüksek CH₄ konsantrasyonuna ve daha fazla sera etkisine neden olabilir (Okur, 2008).

2.3.4.2. Deniz ve göl sedimentlerinde metan oksidasyonu

Anoksik sularda ve deniz sedimentlerindeki metan oksidasyonu atmosfere metan salınımında önemli bir düzenleme olarak rol alır. Derin sedimentlerde üretilen metan yukarı doğru difüze olur ve sülfatın terminal oksidant olarak görev aldığı bir süreçle prokaryotların bir popülasyonu tarafından tüketilir. Bu işlemin net modern atmosferik metan akışının % 5-20'sine eşdeğer metan tükettiği tahmin edilmektedir. Denizel sedimentler, anoksik sular, soda gölleri ve kıta kenarı sedimentleri de dahil olmak üzere, sülfat bağımlı metan oksidasyonunun (SDMO) olduğu düşünülen çeşitli farklı ortamlar mevcuttur (Zhuang, 2014).

2.3.4.3. Aerobik şartlarda metan oksidasyonu

Fizyolojik olarak aerobik CH₄ oksidasyonu ve NH₃ oksidasyonu benzer süreçlerdir. Hem metanotroflar hem de nitrifiye edici bakteriler birincil substratlarına ek olarak birbirlerini substratlarını oksidize etme kapasitesine sahiptirler. Metanotrofik bakteriler aerobik şartlar altında metanı karbondioksit (CO₂) okside eder (Joye ve ark.,1999).

Aerobik metanotroflar için metan, başlangıçta MMO tarafından metanole dönüştürülür. Metanol daha sonra metanol dehidrojenaz ile formaldehite oksitlenir. Formaldehit daha sonra serin döngüsü ya da ribuloz monofosfat (RuMP) yollarını kullanarak biyokütle içine asimile olabilir ya da metanın ilk oksidasyonu için gerekli olan indirgenme eşdeğerlerini oluşturmak için format ve karbondioksit oksidize olur. MMO'nun en az iki formunun var olduğu bilinmektedir. Biri partiküllü metan monooksijenaz *M. Oxyfera*'nın yanı sıra en bilindik aerobik metanotroflarda bulunur. Diğer formu bazı aerobik metanotrofların (şu ana kadar yalnızca az sayıda γ - ve α -Proteobacteria'da) stoplazmalarında bulunan çözünebilir metan monooksijenazdır (sMMO) (Semrau ve ark., 2011).

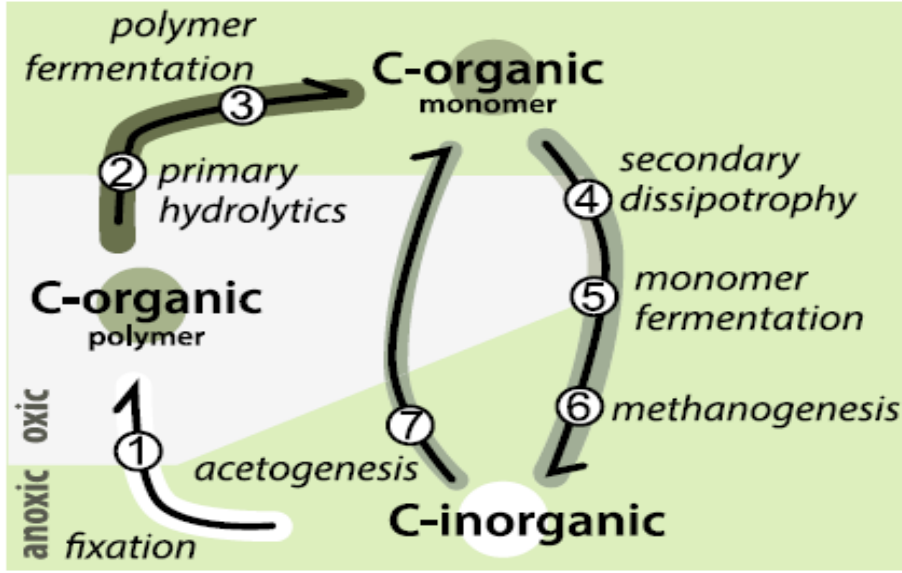
Metan oksidasyonu anaerobik şartlar altında da meydana gelebilir. Hem aerobik hem de anaerobik metan oksidasyonu göllerde meydana gelebilir. Oksidasyon metan konsantrasyonunu düşürür ve kararlı karbon izotopu oranını değiştirir. Aerobik metan oksidasyonu göl çapında O₂ miktarını etkiler ayrıca azot öngüsünü de etkileyebilir (Joye ve ark.,1999).

2.3.5. Soda göllerindeki metan döngüsü

Metan döngüsünün soda göllerindeki mikrobiyal karbon döngüsünün önemli bir parçası olduğu keşfedilmiştir. Kuzey Amerika ve Orta Asya soda göllerinden anaerobik sedimentlerdeki metanojenik aktiviteyi tespit etmek için ciddi çabalar gösterildi. Sonuçlar asetoklastik süreçlerin yoksunluğunu ve metanojenik metanojenezisin baskınlığını açık bir şekilde gösterdi. Soda göllerindeki metanojeneziste anahtar rol oynayan bazı haloalkalofiller saf kültüre izole edilmişti. Bunlar *Methanlobus taylorii*

ve *Methanosalsum zhilinae*, bir yüksek tuz toleranlı litotrof *Methanocalculus natronophilus*'dur (Sorokin and ark, 2014).

Soda göllerindeki aerobik metanotroflar Gammaproteobacterial'dan baskın olarak düşük tuz toleranlı alkalofillerden oluşur (Sorokin and ark, 2014).



Şekil 2.7. Soda göllerindeki karbon döngüsü.

2.4. Bazı Düşük Molekül Ağırlıklı Metanojenik Substratlar

2.4.1. Asetat

Uçucu yağ asitleri organik madde degradasyonu boyunca önemli ara ürünlerin diğer bir sınıfını oluşturur. Suda çözünen C2 bileşiği asetat acetyl-CoA yolağı (asetogenezis) aracılığıyla CO₂ indirgeme ya da organik madde fermantasyonundan üretilebilir (Zhuang, 2014).

Sülfat indirgeme ve metanojenesis organik maddenin tam anaerobik mineralizasyon sürecinde iki ana terminal süreçtir. Son yıllarda yeterli sülfat bulunduran habitatlarda metanojenesisin, sülfat indirgeyici bakterilerin aktivitesiyle açık bir şekilde inhibe edildiği iyi bilinmektedir. Bu durum ortak substratlar için rekabette kaynağını. H₂ rekabeti durumunda H₂ substratı için farklı afiniteye sahip olmalarıyla aşırı substrat varlığında her iki sürecin yer alabildiğini göstermiştir. Tipik bir sülfat indirgeyicinin K_s

değerinin benzer bir habitattan izole edilen bir metanojeninkinden 5 kat daha düşük olduğu bulundu. Ancak asetat daha önemli bir substrattır. Çünkü o biyolojik olarak oluşan metanın yaklaşık olarak %70'nin öncüsüdür ayrıca sülfat indirgemedede temel elektron vericidir. Bu yüzden sülfat indirgeyen bakteriler ve metanojenler arasında bu parametrede bir fark olup olmadığını anlamak için asetat kullanan organizmaların K_s değerlerini belirlenmesi önemlidir (Schönheit ve ark., 1982).

2.4.2. Metanol

Metanol atmosferde metandan sonra ikinci en bol bulunan organik gazdır ve fotokimyasal oksidasyon boyunca atmosferdeki troserik CO'in önemli bir kaynağı olan ubikuitözdür. Atmosferik oksidan kimyasında önemli bir rol oynar, örneğin, doğrudan formaldehit, hidrojen radikalleri ve ozon kaynağı olan ürünleri oluşturan hidroksil radikalleriyle reaksiyona girer. Bulut suyunda metanol fotokimyasal reaksiyonlarının, bulut ve yağmur suyu asiditesine katkıda bulunan formik asit ürettiği düşünülmektedir ancak Jacob (1986) bulut-içi formik asit üretiminin pH değişimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmayacak kadar yavaş olduğunu öne sürmektedir. Biyokütle yakımı, kentsel emisyonlar, bitki büyümesi ve çürümesi sonucu oluşan küresel kaynaklarla 122-350 Tg a⁻¹ arasında değişen atmosferik üretimle, atmosferik metanol miktarında büyük bir belirsizlik vardır. Moleküler çalışmalar çeşitli prokaryot ve ökaryotların gelişmek için metanolü kullanabildiğini göstermiştir (Dixon ve ark., 2011).

2.4.2.1. Metanolün kaynağı

Metanol göl ve deniz sedimentlerindeki önemli metabolitlerdendir. Metil alkol; CH₃OH formülü ile gösterilen, berrak, süspansiyon halinde safsızlıklar içermeyen, su ile her oranda karışabilen sıvı bir organik bileşiktir. Metanol; metil alkol, karbinol, odun ruhu, odun alkolü, metilol, proksilik alkol, metil hidroksit, monohidroksimetan gibi isimlerle de anılmakta olan bir alifatik alkoldür. Metanol, doğada pektinin ya da lignin pektolitik enzimlerle (pektin esteraz) parçalanması sonucu da oluşabilmektedir (Altınay, 2008).

Lignin fenolik bir polimerdir ve damarlı bitkilerin doğal kompozitini oluşturur. Ligninin metoksillenmiş monomerleri, bakteri ve funguslar tarafından degradasyon süresince metanolün oluşumuyla metoksi gruplar açığa çıkarabilir. Pektin bitki ve alg hücrelerinin yaygın bir bileşenidir ve karboksi gruplarından kısmi olarak metillenen bir α -(1,4)-galakturonik asittir. Aynı şekilde metoksi grup pektinin anaerobik dekompozisyonu süresince metanol olarak açığa çıkar. *Clostridium*, *Erwinia* ve *Pseudomonas* türlerinin çeşitli fenolitik suşları pektin üzerinde gelişimi boyunca bir ana son ürün olarak metanol üretir (Zhuang, 2014).

2.4.2.2. Metanol oksidasyonu

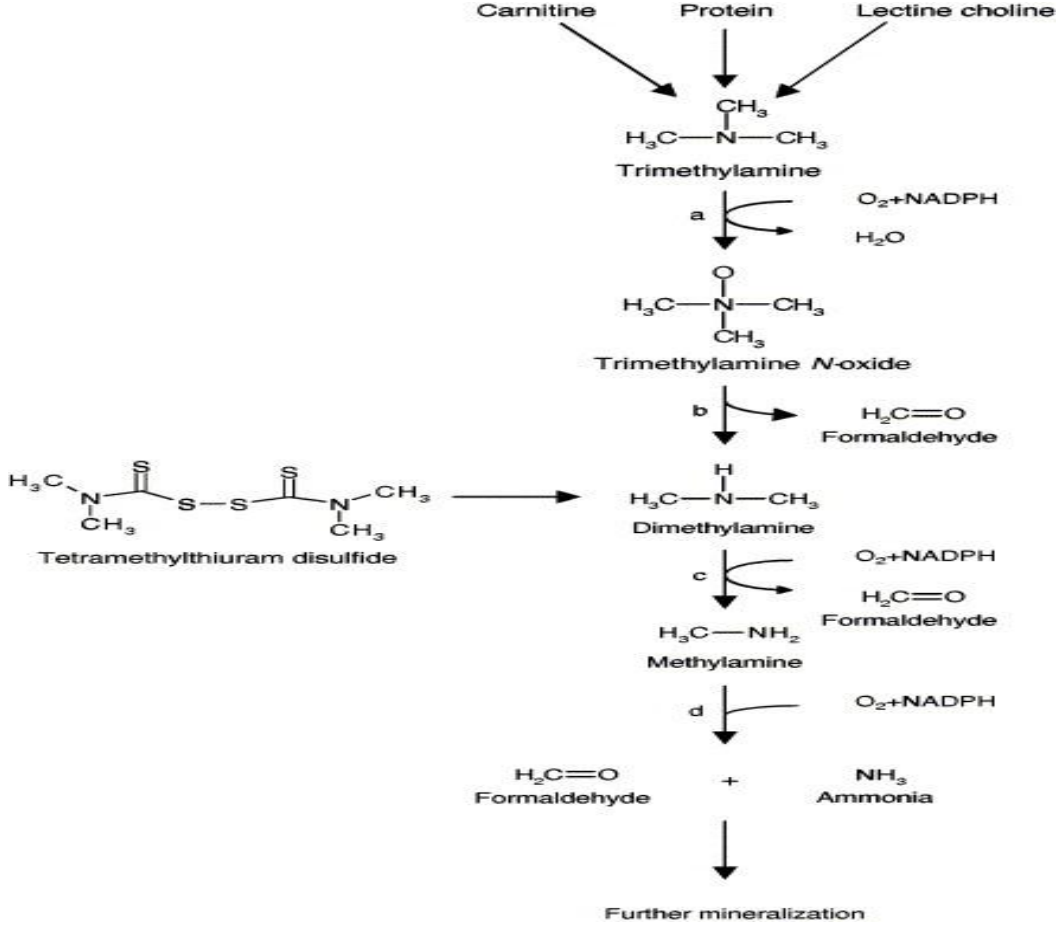
Endojen (metanın MMO aracılığıyla oksidasyonu) ve ekzojen (pektin ve lignin ayrışması örnektir) kaynaklardan elde edilen metanol gram negatif metilotroflarda bir periplazmik metanol dehidrojenaz (MDH) tarafından formaldehite oksidize edilir. MDH (8.5-kDa) küçük ve (60- to 67-kDa) büyük alt ünitelerinden oluşan bir $\alpha_2\beta_2$ tetramerdir. Elektronlar MDH için spesifik elektron akseptörü olarak görev alan MDH'den sitokrom c_L 'ye transfer edilir. Sitokrom c_L daha sonra metanolün oksidasyonu için spesifik olan bir tipik 1. Sınıf bir sitokrom c (sitokrom c_H) tarafından oksidize edilir. MDH ve iki sitokrom çözünmüş halde gram-negatif metilotrofların periplazmasında yerleşmiştir. Bu proteinler büyük miktarda bulunur ve onlardan herhangi birinin bulunmaması metanol üzerinde gelişmesinin başarısız olmasına neden olur. Fakat fakültatif metilotroflar heterotrofik substratlar ya da metilaminler üzerinde gelişebilirler (Hanson ve ark., 1996).

Metanol gram-pozitif metilotroflardaki bir NAD-bağlı metanol dehidrojenaz vasıtasıyla ve metanol oksitleyici maya türlerinde bir metanoloksidaz sistemi aracılığıyla oksidize edilir. Fakat bu enzimler gram-negatif metanotrofik bakterilerde saptanmamıştır (Hanson ve ark., 1996).

2.4.3. Metillenmiş aminler

Metil aminler (monometilamin, dimetilamin, trimetilamin gibi) denizel çevrelerdeki ubikuitöz ve küçük organik azotlu bileşiklerdir. Metil aminlerin ana

kaynağı trimetilamine N-oksit (TMAO), kolin (N,N,N-trimetiletanolamin) ve betain (N,N,N-trimetilglisin) gibi glisin içeren çeşitli öncüllerin degradasyonlarıdır (Zhuang, 2014).



Şekil 2.8. Dimetilaminin degradasyonu ve oluşumu

Uçucu aminler birçok endüstriyel aktivitedeki kötü kokuların temel sorumlularındadır. Özellikle trimetilamin (TMA) (CH₃)₃N kokuşan balığın kötü kokusunun temel sorumlusudur ve domuz gübresi, besi hayvancılığı, balık yemi üretme süreci gibi birçok endüstriyel aktivitede ortaya çıkan sıkıntılı kokunun temel kaynaklarından biridir (Aguire ve ark., 2016)

Trimetilamin, lektin kolin, karnitin ve birkaç proteinin biyolojik degradasyonu esnasında üretilir. Trimetilaminin birkaç fungi ve alg tarafından degradasyonu sürecinde dimetilamin bileşiği oluşur. Dimetilamin başlıca pestisit ve deterjanların üretiminde ve

deri tabakalama boyunca kauçuk volkanizasyon sürecinde hızlandırıcı olarak kullanılır. Dimetilamin oda sıcaklığında gaz haldedir (Agteren ve ark. 1998).

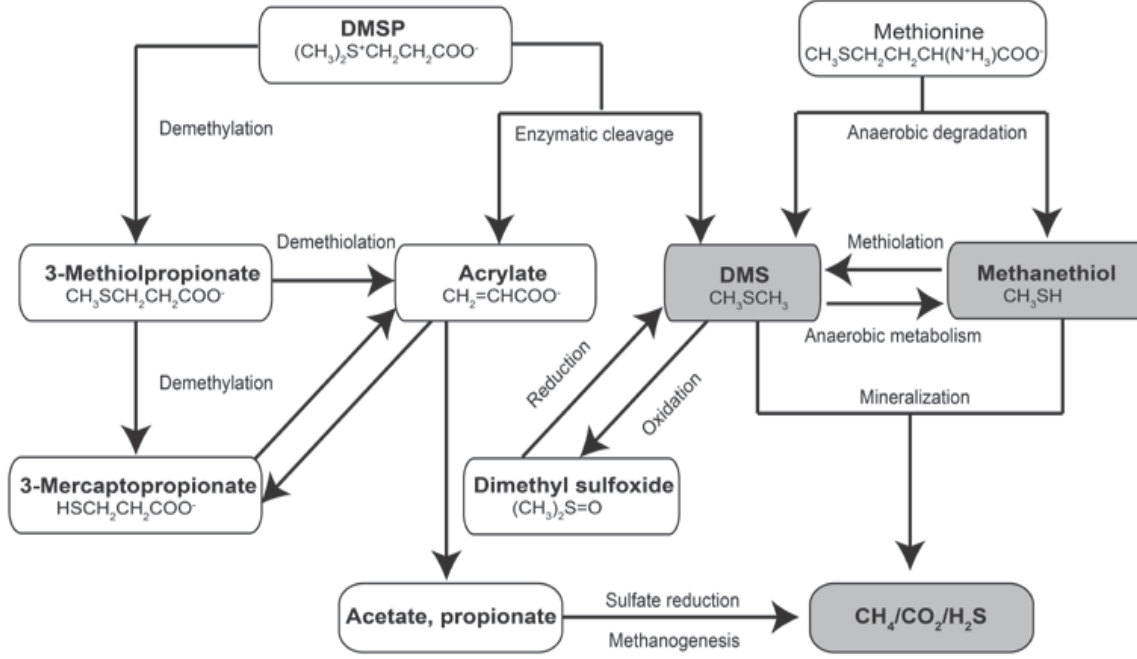
Smith ve Aubin (1992) tarafından yapılan bir çalışma tarım topraklarında dimetilaminin birikmediğini hızlı bir şekilde mikroorganizmalar tarafından metabolize olduğunu göstermiştir (Agteren ve ark. 1998).

Aerobik şartlar altında dimetilamin metabolizması formaldehit ve metilamine dönüşüm ile başlar. Oluşan metilamin daha ileri tepkimeyle formaldehit ve amonyuma degrede olur. Nitrat varlığında anaerobik şartlar altında, dimetilamin ilk olarak N-nitrosdimetilamin'e dönüşür. N-nitrosdimetilamin formaldehit ve nitrit oluşumunun eşlik ettiği tepkimeyle metilamine degrede olabilir (Agteren ve ark., 1998).

2.4.4. Metillenmiş sülfidler

Okyanus kaynaklı dimetilsülfid (DMS) atmosferdeki biyojenik kükürtün en önemli kaynağıdır. Bu yüzden okyanus kaynaklı DMS küresel sülfür döngüsünün önemli bileşenlerinden biridir. DMS ve onun temel prokürsörü olan dimetilsülfoniopropionatın (DMSP) okyanusal dağılımları biyolojik ve biyolojik olmayan yolların kompleks karşılıklı etkileşimlerinden kaynaklanır (bir taraftan DMS'nin DMSP'ye mikrobiyal parçalanması ve fitoplanktonlar tarafından oluşturulması diğer taraftan DMS'nin atmosfere kaybolması ve fotokimyasal oksidasyonun yanı sıra mikrobiyal tüketimi). Dimetilsülfoksit (DMSO) okyanuslardaki önemli bir kükürt rezervuarı olarak bilinmesine rağmen onun üretim ve tüketim yolları iyi anlaşılmamıştır. DMSO için başlıca üretim mekanizması denizel alg hücreleri tarafından direk sentezin yanı sıra DMS'nin bakteriyal ve fotokimyasal oksidasyonudur. Bakteriya tüketim, DMS'ye indirgeme, dimetilsülfon'a (DMSO₂) oksidasyon, partiküllerin batması yoluyla derin sulara inme ışık alan tabakada DMSO'nun azalmasına sebep olan olası yollardır. DMS, DMSP ve DMSO'nun okyanusal besin döngüsünde önemli roller oynadıkları iyi bilinen bir durumdur. Onlar okyanustaki ubikütozlardır ve planktonda farklı beslenimsel düzeyler arasındaki sülfür ve karbon döngüleri ve transferlerinden sorumludur. Örneğin DMSP bakteriyoplanklar için gerekli olan kükürtün tamamını karşılayabilir mikrozooplanktonlar için gerekli kükürtün %48'ini verebilir. Ek olarak DMSP bakteriler için %8-15 oranında karbon

sağlayabilir ve bir enerji kaynağı olarak işlev görebilir ki bu onu deniz bakteriyoplanktonları için en önemli yegane substrat yapar. DMSO'nun DMSO'yu elektron ya da karbon kaynağı olarak kullanan özelleşmiş bakteriler için önemli bir substrat olduğu görülür (Zhuang, 2014).



Şekil 2.9. Deniz sedimentlerindeki metillenmiş kükürt bileşiklerinin mikrobiyal dönüşümü.

Metan başlıca organik madde mikrobiyal dekompozisyonun bir parçası olarak metanogenezis yoluyla üretilir. Gerçekte metanogenezis şiddetle anaerobik bir ortam gerektirmesine rağmen atmosferdeki denge konsantrasyonun üzerindeki metan konsantrasyonları genellikle havalandırılmış (yani oksik) açık okyanus yüzey katmanında bulunur. Bu durum açık okyanusun atmosfere gerçekten bir CH_4 kaynağı olduğuna işaret eder. Bu açık “okyanusal metan paradoksu” için birkaç açıklama önerilmiştir. Örneğin metanojenlerin, gömülü organik partiküllerde ve zooplankton bağırsaklarında bulunmaları anoksik mikroniş içerisinde yaşayabildiklerini gösterir. Alternatif fosfat kaynağı olarak metilofosfat kullanabilen *Trichodesmium* tarafından kullanılan bir aerobik metan üretim yolağı gösterildi. DMSP'nin degradasyon ürünleri

(metantiyol, metimerkaptopropiyonat ve DMS) oksik şartların yanı sıra anoksik şartlar altında denizel mikrobiyal metan üretimi için önemli metillenmiş öncüller olarak belirtilmiştir. Metanojenik arkeaların, DMSP ve onun degradasyon ürünlerini metan üretme yoluyla metabolize etme yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. Okyanusta DMSP bağımlı metan birikimi bir fitoplanton blumun yanı sıra oligotrofik şartlar altında gözlemlenmiştir (Lee ve ark., 1999).

2.5. Halomonas Cinsi

Halofiller toprakta, sulak alanlarda, tatlı su ve deniz suyu sedimentlerinde bulunabilirler. Hücresel gelişim normalde aşırı tuzlu ortamlarda inhibe olur fakat bu ortamların taksonomik olarak çeşitli bakteri gruplarını barındırdığı bilinir. Orta düzey halofilik bakteriler % 5-10 (w/v) NaCl düzeylerinde en iyi gelişim gösterirken ekstrem halofilik bakteriler optimal gelişimi % 10 (w/v)'dan büyük NaCl konsantrasyonlarında gösterir. Bu bakterilerin çoğu bu ekstrem şartlar altında hayatta kalmak için farklı yapı-fonksiyon adaptasyonları geliştirmişlerdir. Böyle adaptasyonlar metabolik düzeyde nihai değişikliklere neden olan halofilik türlerin yakınsak evrimini düşündüren DNA'nın fiziksel özelliği ve protein stabilitesi ile ilgilidir (Roy and ark., 2013).

Halomonas bakteriler, gelişmek için yüksek düzeyde NaCl gerektiren halofillerdir. Bunlar çeşitli sıcaklık ve pH koşullarında başarılı bir şekilde büyüebilmeleri açısından oldukça çok yönlüdürler. Bu çok yönlülük sonuç olarak Halomonas türlerinin nişasta türevi ham materyallerin kullanılması için bir alternatif olarak kullanılmasına yol açabilir. Halomonaslar, genellikle pigmentless veya sarı renkli olan Gram-negatif çubuk şekilli hücrelerdir. Halomonas türlerindeki bazı majör hücre yağ asitleri $C_{18:1\omega 7c}$, $C_{16:0}$ ve $C_{19:0}$ siklo $\omega 8c$ içerir. Aynı zamanda, yana doğru uzanan ya da kutupsal olarak bulundurdukları kamçılarından dolayı tam hareket kabiliyetine sahip geleneksel ekstrem halofillerdir. Nitratın varlığı olmadan, glikoz yardımıyla anaerobik büyüme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca, bazı Halomonas türlerinin nitratın nitrojene işlenmesi yoluyla enerji elde etmek için denitrifikasyon gerçekleştirebildiği belgelenmiştir (Arahal ve ark., 2007).

Halomonas cinsinin üyeleri 0'dan %25'e hatta daha yüksek konsantrasyondaki geniş aralıklı bir tuzlulukta gelişebilirler. Buna ek olarak halomonas türleri *Halomonas*

maura, *Halomonas ventosae*, *Halomonas anticariensis* ve *Halomonas almeriensis* tarafından üretilen eksopolisakkaritler; *Halomonas Pantelleriensis* tarafından üretilen polihidroksibütürat; *Halomonas organivorans* tarafından aromatik bileşiklerin degradasyonu; *Halomonas elongata*, *Halomonas salina*, *Halomonas halodenitrificans*, *Halomonas desiderata*, *Halomonas campisalis*, *Halomonas neptunia*, *Halomonas sulfidaeris*, *Halomonas axialensis*, *Halomonas hydrothermalis* ve *H. Maura* tarafından denitrifikasyon; *H. salina*, *Halomonas halophila*, *H. maura* ve *H. Sulfidaeris* tarafından H₂S üretimi gibi çeşitli biyokimyasal fonksiyonlara sahiptirler. Bu çeşitli yetenekler kirletilmiş tuzlu toprakaların biyoremedasyonu için faydalı adaylar olarak *Halomonas* cinsi üyelere olan ilginin artmasına yol açmıştır (Wu ve ark., 2008).

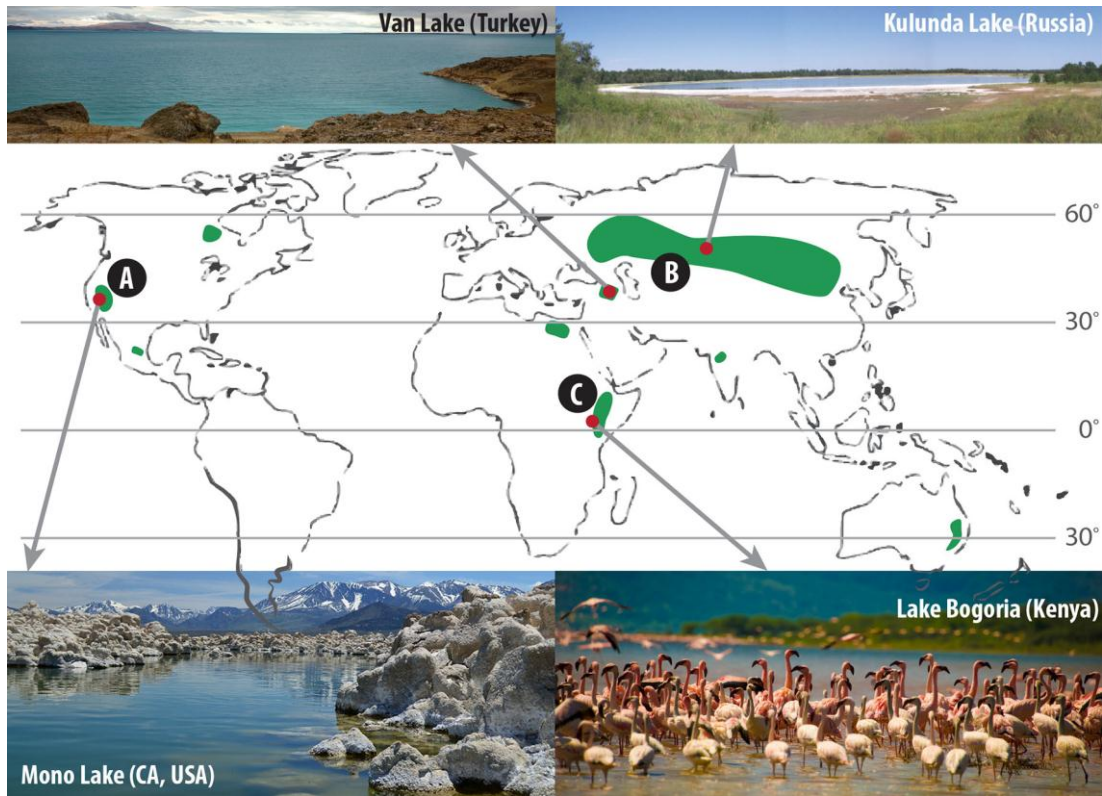
Halomonas türlerinin çok sayıda teknolojik olarak kullanılabilir özellikleri vardır. Hem bu bakterilerin tuzlu çevrelere adaptasyonunun bir parçası olarak biriktirdikleri uygun çözenler hem de hücreyi çevresel strese koruyan ve biyofilm oluşumuna yardımcı olan ekstraselüler polimerler ilaç, gıda işleme ve biyoteknolojik endüstrilerde kullanılır. Ayrıca enerji depo ürünleri olarak bu bakteriler tarafından biriktirilen polihidroksialkanoatlar biyolojik olarak parçalanabilen materyalleri üretmek için kullanılabilir. Sonuç olarak hem katlanmış hem de katlanmamış durumlarda *Halomonas* proteinlerinin yüksek çözünürlük kapasiteleri onların rekombinant olarak eksprese edilen proteinlerin çözünürlüğünü geliştirmek için füzyon etiketleri olarak kullanılmasına yol açmıştır (Williamson ve ark. 2016).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu araştırmanın materyalini; metanol kullanma kabiliyeti olan suşların belirlenmesi ve karakterizasyonu için Van Gölü'nden 25.07.2016 alınan örneklerinden izole edilen suşlar oluşturdu.



Şekil 3.1 Van gölü ve diğer bazı sodalı göllerin dünya üzerindeki konumları ve resimleri

3.1.1. Metilotrofik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyeri

3.1.1.1. Metilotrofik besiyeri

Metilotrofik bakterilerin izolasyonu için Nitrate Mineral Salts (NMS) besiyeri kullanıldı. Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk süre ile sterilize edildi.

3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve boyalar

3.1.2.1. Kristal Viyole boyası

Kristal Viyole boyası havanda dövüldü. Üzerine 10ml % 96'lık Fenol kristali ve distile su ilave edildi. 24 saat bekletildi ve filtre kağıdından geçirilerek gram boyama yönteminde kullanıldı (Çotuk ve Küçükler, 1992).

3.1.2.2. Safranin boyası

Safranin etil alkolde çözüldü, distile su ilave edilip iyice karıştırılarak hazırlandı. Bu çözelti gram boyama yönteminde kullanıldı (Çotuk ve Küçükler, 1992).

3.1.2.3. Lügol çözeltisi

Bu çözelti gram boyama yönteminde kullanıldı (Çotuk ve Küçükler, 1992).

3.1.2.4. Alfa-naftol çözeltisi

Alfa-Naftol Çözeltisi; Alfa-Naftolün etanolde çözülmesi ile hazırlandı. Bu çözelti nitrat indirgenmesi testinde kullanıldı (Çotuk ve Küçükler, 1992).

3.1.2.5. Sülfanilik asit çözeltisi

Nitrat indirgenmesi testinde kullanıldı (Çotuk ve Küçükler, 1992).

3.1.2.6. %3'lük H₂O₂ çözeltisi

%3'lük H₂O₂ Çözeltisi katalaz testi için kullanıldı (Çotuk ve Küçükler, 1992).

3.2. Yöntem

3.2.1. Sediment örneklerinin toplanması

Van Gölü'nden alınan sediment örnekleri 1000ml'lik steril polietilen torbalar içerisine bırakılarak toplandı ve 12 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

3.2.2. Örneklerinden metilotrofik bakterilerin izolasyonu

Van Gölü'nün farklı alanlarından toplanmış sediment örnekleri deney tüplerine dağıtılmış NMS besiyerlerine ekildi ve %1 metanol eklendikten sonra deney tüplerinin ağzı metanolun uçmasını engelleyecek şekilde pamuklandıktan sonra parafilm ile kapatıldı ve 37°C'de 1 hafta inkübasyona bırakıldı. Bir hafta sonunda alınan sıvı NMS besiyeri çözeltilerinin 5 kat seyreltilmiş örneklerinin her birinden otomatik pipet ile 0.1 ml alındı NMS katı besiyeri yüzeyine steril L şeklindeki cam baget kullanılarak yayma plak yöntemiyle ekim yapıldı ve %1 metanol ilave edilerek petri kapları hava almayacak şekilde parafilmle kapatıldı. 37 °C'de etüvde gelişmeye bırakıldı. Ekim yapılan petri kaplarında gelişen bakterilerin koloni morfolojileri dikkate alınarak seçildi.

3.2.3. Metilotrofik bakterilerin saf kültürlerinin elde edilmesi

NMS agar besiyerinde gelişen kültürden steril alkali katı besiyerlerine öze yardımıyla çizgi plak yöntemi ile ekimler yapılarak saf kültürler elde edildi. İyi izole edilmiş koloniler seçildi ve 4 °C'de stok kültür olarak saklandı.

3.2.4. S1 kültürünün koloni ve hücre morfolojilerinin incelenmesi

İzole edilen suşların koloni morfolojisi özellikleri binoküler mikroskop kullanılarak belirlendi. Hücre morfolojisinin belirlenmesi için gram boyama yöntemi kullanıldı (MacFaddin, 2000).

3.2.5. Bakteri suşlarının gram boyama yöntemi ile boyanması

Gram boyama yapılacak saf kültürlerden fizyolojik tuzlu su ile yayma preparat hazırlandı. Preparat havada kurutulup alevde fikse edildi. Fiksasyon işleminden sonra preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatıldı. İki dakika beklendi. Fazla boya dökülerek lügol çözeltisi ilave edilip 1 dakika beklendi. Preparat %96'lık etil alkol ile 6-10 sn dekolorize edildi. Saf su ile yıkandı. Son olarak Safranin boyası ilave edildi. 30 sn kadar beklenip preparat saf su ile yıkandı. Kurutma kağıdı kullanılarak preparat kurutuldu. Kuruduktan sonra preparatın üzerine 1 damla immersiyeon yağı damlatılarak 100'lük objektifte incelendi mor-menekşe görülenler gram pozitif, kırmızı-pembe görülenler gram negatif olarak değerlendirildi (Benson, 2002).

3.2.6. Biyokimyasal testler

3.2.6.1. İndol testi

İncelenecek bakteri kolonisinden özeyle alınarak temiz bir tüp içinde bulunan triptofan bulunan TSB besiyerine ekim yapıldı. Tüpler etüvde, 30 °C'de 2-4 gün inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra üzerine, tüpün kenarından yavaşça akıtmak suretiyle 0,5 ml kovaks ayırıcı ilave edildi ve tüp çalkalandı. 1-2 dakika içinde besiyerinin üst kısmında parlak kırmızı bir halka oluşması testin pozitif olduğunu (indol formasyonunu), sarımsı halka ise testin negatif olduğunu (indol oluşmadığını) gösterir (York ve ark., 2007).

3.2.6.2. Sitrat testi

İncelenecek bakteri kolonisinden iğne öze ile alınarak tüpteki Simon's Sitrat Yatık Agar besiyerinin yüzeyine ekim yapıldı. Tüpler etüvde, 30 °C'de 2-4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda orijinal rengi yeşil olan ve indikatör olarak % 0,2'lik Bromo timol mavisi kullanılan besiyerinde besiyeri renginin maviye dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilir (Benson, 2002).

3.2.6.3. Metil Red(MR) testi

İncelenecek bakteri kolonisinden öze ile alınarak tüpteki TSB besiyerine ekim yapıldı. Tüpler etüvde, 30 °C'de 2-4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra üzerine birkaç damla metil kırmızısı ilave edildi ve karıştırıldı. Belirgin bir kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilirdi. Renk değişimi olmadığından sonuç negatiftir. (York ve ark., 2007).

3.2.6.4. Karbonhidrat oksidasyon/fermentasyon testleri

İzolatlar, içerisinde % 1 oranında test edilecek şeker ve fenol red bulunan Triptic Soy Agar tüplerine ekildi. Tüpler 30 °C'de 24/72 saat inkübasyona bırakıldı. Bakterinin şekeri kullanıp kullanmadığı inkübasyon sonucunda besiyeri içerisinde bulunan indikatör boyanın renk değiştirmesi ile anlaşıldı (Benson, 2002).

3.2.6.5. Nitrat indirgenmesi testi

İçerisinde %1 oranında KNO₃ ve Durham tüpü bulunan alkalifilik broth tüplerine test edilecek kültürlerden ekim yapıldı. Tüpler 37 °C'de bir hafta süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip tüplere %1'lik sulfanilik asit ve %0.6'lık Alfa-naftol ayraçlarından birer mililitre ilave edildi. Kalıcı kiremit kırmızısı rengin oluşması nitrat indirgenmesi pozitif olarak değerlendirildi (Çotuk ve Küçüker, 1992; MacFaddin, 2000).

3.2.6.6. Beta Galaktosidaz (ONPG) testi (OXOID ONPG DISCS Code: DD0013)

Oxoid firmasının üretmiş olduğu fosfat tamponu ile emprenye edilmiş O-nitrophenyl-b -D-galacto-pyranoside'diskler kullanıldı. Bir disk steril bir tüpe yerleştirildi ve 0.1 ml steril fizyolojik su ilave edildi. Steril koşullarda öze ile alınan koloni bu tüp içerisine iyice emülsifiye edildi ve 30 ° C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresince 6 saatte bir kontrol edildi. Tüp içerisinde sarı renk oluşumu pozitif sonuç ve renksiz olması negatif sonuç olarak değerlendirildi.

3.2.6.7. Oksidaz testi (Microbact Oxidase Strips MB0266)

Bu test için Oxoid firmasının üretmiş olduğu Microbact Oxidase Strips MB0266 kiti kullanıldı. Bu kitte bulunan şeritler, bakteri sitokrom oksidaz enziminin tespiti için NNN'N 'tetrametil-p-fenilen-diamin dihidroklorür ile emprenye edilmiştir. Bakteri içeren solüsyona bırakıldığı zaman mavi renk oluşumu oksidaz pozitif olduğunu göstermektedir.

3.2.6.8. Katalaz testi

Öze ile alınan izolatlar lam üzerine yayıldı ve üzerlerine 100µl %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatıldı. Alkalofilik agar üzerinde geliştirilen kolonilerden öze ile bir miktar alınarak lam üzerine yayıldı ve 100µl %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) muamele edildi. Koloniler üzerinde köpük oluşması pozitif katalaz reaksiyonu, köpük gözlenmemesi ise negatif katalaz reaksiyonu olarak değerlendirildi (Çotuk ve Küçüker, 1992; MacFaddin, 2000).

3.2.6.9. Tween 80 hidroliz testi

İçerisinde %3 oranında Tween 80 bulunan TSA izolatlar öze yardımı ile yoğun bir çizgi şeklinde ekildi. Petri kapları 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, petrilerin yüzeyini kapatacak şekilde %0,001'lik Rhodamin B ilave edildi. Kolonilerin etrafında oluşacak zonlar lipaz aktivitesi için pozitif sonuç olarak değerlendirilecekti. Ancak zon oluşmadığından sonuç negatif olarak değerlendirildi (Karnetova ve ark., 1984).

3.2.6.10. Kazein hidrolizi testi

İçerisinde %1 oranında skim milk powder bulunan TSA, izolatlar öze yardımı ile yoğun bir çizgi şeklinde ekildi. Petri kapları 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip besiyerinde koloni etrafında oluşan şeffaf zon proteaz varlığını gösterecektir (Nayab, 2015).

3.2.7. Metanol kullanımının belirlenmesi

Metanol kullanımının belirlenmesi için bakteriyel izolatlar nutrient broth besiyerine ekildi ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Bu 24 saatlik kültür yegane enerji ve karbon kaynağı olarak %1 metanol içeren NMS besiyerine aktarıldı. Metanollü ortamda üreyebilen S1 suşuna Yüzüncüyıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi tarafından NMR tekniği uygulandı.

3.2.8. Moleküler yöntemler

3.2.8.1. Genomik DNA izolasyonu

Bakterilerden genomik DNA izolasyonu için Ausubel ve ark. (1994), metodu modifiye edilerek kullanıldı (Ertaş, 2016).

Metodun uygulanışı aşağıdaki gibidir.

1. Steril, ağzı kapaklı ependorflara 800 µl STE tamponu konularak içerisine 4-5 öze dolusu daha önceden alkalifilik agar besiyerinde geliştirilmiş bakteri bioması ilave edildi.
2. Tüpler 2700 rpm'de vortekslenerek homojenizasyon sağlandı.
3. Vortekslenen tüpler 10000 rpm'de 10 dk. santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alındı ve pellet üzerine tekrar 800 µl STE tamponu eklenerek 10 dk. 10000 rpm'de santrifüj yapıldı.
4. Santrifüj sonrası oluşan üst faz atılıp pellet üzerine 400 µl STE tamponu ilave edildi. Tamponun pelletle tamamen karışması sağlandı.
5. Tüpler 75°C'ye ayarlı su banyosunda 30 dk. inkübe edildi.
6. Su banyosundan çıkartılarak 50 µl % 10'luk SDS ve 2 µl proteinaz K eklenen tüpler 40°C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat bekletildi.
7. İnkübasyon sonrası tüplere ortamdaki tuz konsantrasyonu 0.75 - 0.8 olacak şekilde 5M NaCl ve 0.1 hacim %10 CTAB / 0.7 M NaCl eklendi.
8. Tüpler 65°C'ye ayarlı su banyosunda 10 dk. inkübe edildi.
9. Eşit hacimde 24:1 kloroform : izoamilalkol ilave edilen tüpler 10 dk. oda sıcaklığında hematoloji çalkalayıcısında karıştırıldı.

10. Tüpler 16000 rpm'de 15 dk. santrifüjlendikten sonra üst faz yeni steril endorf tüplere aktarıldı. Her bir tüpe 0.1 hacim %10 CTAB / 0.7 M NaCl ilave edildi.
11. 65°C'ye ayarlı su banyosunda tüpler 10 dk. bekletildi.
12. Tüplere eşit hacimde 25 : 24 : 1 fenol : kloroform : izoamilalkol eklendi ve tüpler 10 – 20 dk. oda sıcaklığında, hematoloji çalkalayıcısında çalkalandı.
13. Tüpler 16000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Oluşan üst faz yeni steril bir endorfa alındı ve üzerine eşit hacimde 24 : 1 kloroform : izoamilalkol eklendi.
14. Hafif şekilde tüpler 10 dk. karıştırıldı.
15. Üst faz tekrar yeni steril bir endorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 0.8 hacim isopropanol (– 20°C) ilave edilerek tüpler – 20°C'de bir gece bekletildi.
16. Daha sonra tüpler 16000 rpm de 15 dk. santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
17. Her bir suş için steril endorf tüplerine %70'lik etil alkolden 100 µl konuldu. Pipetin yardımıyla DNA bu tüplerde yıkandı.
18. Tekrar 16000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
19. Kalan etil alkolün uçması ve DNA'nın kuruması için DNA'lar şeffaf bir görünüm alana kadar oda sıcaklığında bekletildi.
20. Elde edilen DNA miktarına göre steril endorf tüplerine 30 -100 µl TE çözeltisi konuldu.
21. DNA iyice çözüldükten sonra tüplere 2 µl RNAz ilave edildi.
22. 2-3 sn. santrifüj edilen tüpler 37°C'de 30 dk. bekletildi.
23. Sonra tüpler etiketlenerek +4°C'de muhafaza edildi.

DNA numuneleri, izolasyon işleminin sonunda agaroz jel elektroforeze koşturularak kontrol edildi. İzole edilen DNA numunelerinin agaroz jelde görünür hale gelmesi için jel içerisine floresans özellik gösteren etidyum bromid boyası ilave edildi. Etidyum bromid çift zincirli DNA'nın baz çiftlerine bağlanarak 254 veya 312 nm dalga boyunda UV transillüminatörde kırmızı floresans yayma özelliği gösterir. Bu özellik DNA izole edilmiş ise UV translillüminatör üzerinde agaroz jelde bantların görünmesini sağlar. Bunun için 0,4 gr (%1) agaroz 40 ml 1X TBE tamponu bulunan 100 ml'lik erlene ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra mikro dalga fırın yardımıyla tamamen agarozun erimesi sağlandı ve ortalama 60°C'ye soğuyunca içerisine 6 µl etidyum bromid (10mg/ml) ilave edildi. Erlen hava kabarcığı oluşmayacak şekilde hafifçe karıştırıldı.

Elektroforez tablası düz bir zemine yerleştirildikten sonra jel solüsyonu hava kabarcığı oluşturulmadan döküldü. Taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Agarozun donmasından sonra tarak çıkarıldı (15-20 dk) ve içinde 1X TBE pH 8 tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Tarağın oluşturduğu boşluklara her bir DNA numunesinden 10 µl ve 8 µl yükleme boyası (Brom Fenol Mavisi) ile birlikte toplam 18 µl olarak yüklendi. Agaroz jel 100 voltta ortalama 20 dk elektroforez edildi ve UV transillüminatör’de gözlemlendi. Jel görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflandı.

3.2.8.2. 16S rRNA’nın PZR amplifikasyonu

16S rRNA’nın polimeraz zincir reaksiyon işlemleri 0,2 ml’lik PZR tüplerinde Termal Cykler (MyGenie-96 Gradient Thermal Cykler, Korea)’da yapıldı. Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki primer (27f : 5’-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3’ ve 1492R: 5’ TACGGYTACCTTGTTACGACTT) kullanıldı. PZR reaksiyonu için hazırlanan bütün stok solüsyonlar steril ddH₂O ile hazırlandı. Stok solüsyonlar kontaminasyon riskine karşılık küçük miktarlarda (25-100 µl) steril endorf tüplere bölündü kullanıma kadar -20 °C’de saklandı.

Çizelge 3.1. PZR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar

ThermoScientific PCR Master Mix (2X)	25 µl
27f	6 µl
1492R	6 µl
DNA	6 µl
ddH ₂ O	7 µl
Toplam Hacim	50 µl

Hazırlık:

1. Primer stoklar (10 µM)

27f (forward primer: 16S rDNA’nın başlangıç bölgesine bağlanan evrensel primer, 5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’)

1492R (reverse primer: 16S rDNA'nın son bölgesine bağlanan evrensel primer, 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')

2. ThermoScientific PCR Master Mix (2X) (Katalog No:0172)
3. DNA (50-100 ng)
4. ddH₂O

Uygulama:

1. Reaksiyon karışımı 1,5 ml'lik PZR tüplerinde her bir örnek için toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı ve daha sonra 0,2 ml'lik PZR tüplerine buz üzerinde 22 µl transfer edildi.
2. Reaksiyon karışımından ayrı olarak her bir örnek için DNA örnekleri 3µl olacak şekilde steril 0,2 ml'lik PZR tüplerinin içerisine transfer edildi. DNA örneklerinin eklenen miktarı toplam hacimi 25 µl yaptı.
3. Transfer işleminden hemen sonra PZR reaksiyonu (MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler, Korea) Çizelge 3.5'deki şartlarda başlatıldı.
4. 3 µl PZR ürünü, % 1'lik agaroz jelde kontrol edildi.

Çizelge 3.2. 16S rRNA gen bölgesi PZR reaksiyon şartları

Denatürasyon	Amplifikasyon			Bitiş	Soğuma
	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama		
95 °C	95 °C	50 °C	72 °C	72 °C	4 °C
10 dk	00:25 dk	00:25 dk	1 dk	5 dk	----
1 döngü		30 döngü		1 Döngü	

Purifikasyon kiti ile PCR sonrası saflaştırma işlemi (ROCHE'un High Pure PCR Product)

1. 50 µl.lik PCR ürününün üzerine 250 µl "Binding Buffer" koyulur, iyice karıştırılır.
2. Filtreli tüp toplama tüpünün içine yerleştirilir.
3. Örnek filtreli tüpe koyulur.

4. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.
5. Aşağıya geçen sıvı atılır.
6. 500 µl “Wash Buffer” eklenir.
7. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.
8. Aşağıya geçen sıvıyı atılır
9. 200 µl “Wash Buffer” eklenir.
10. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.
11. Toplam tüpü atılır ve filtreli tüp 1.5 ml.lik temiz bir tüpe yerleştirilir.
12. 30 µl “Elution Buffer” eklenir.
13. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.
14. Aşağıya geçen DNA örneğimizdir.

Dizileme Reaksiyonu

Örnekleriniz ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazı ile ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit kullanılarak dizileme işlemi BMLabosis firmasına hizmet alımı olarak yaptırılmıştır.

3.2.8.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi

16S rRNA bölgesi dizileme işleminden sonra gelen ab1 dosyaları alınarak Codon Code Aligner V.6.0.2 programı ile her suş için kromatogramlar tek tek incelendi ve zayıf nitelikli baz dizilerinin (belirsiz yani ‘N’ kodlu birkaç baz) genellikle sekans başları ve sonlarındaki bölgelerinde kesilerek uzaklaştırıldı ve contiqler oluşturuldu. Tüm izolatların 16S rDNA nükleotid baz dizileri filogenetik dendogramların oluşturulması için kullanıldı. NCBI’da blast yapılarak her suşa yakın türlerin access kodları alındı. Hem veri tabanındaki yakın türlerle hem de kendi aralarında analiz edildi. Mega7 programı ile bu dizilemesi yapılan suşlar ve Gen Banktaki suşların fasta formatları programa çağrıldı. Daha sonra Clustal W yapılarak korunmuş bölgeler kıyaslandı. Bu işlemin ardından Mega7 programındaki bu dosya fasta şeklinde kaydedildi. Bu işlemden sonra Mega 7.0.18 paket programı ile Maksimum Olabilirlik

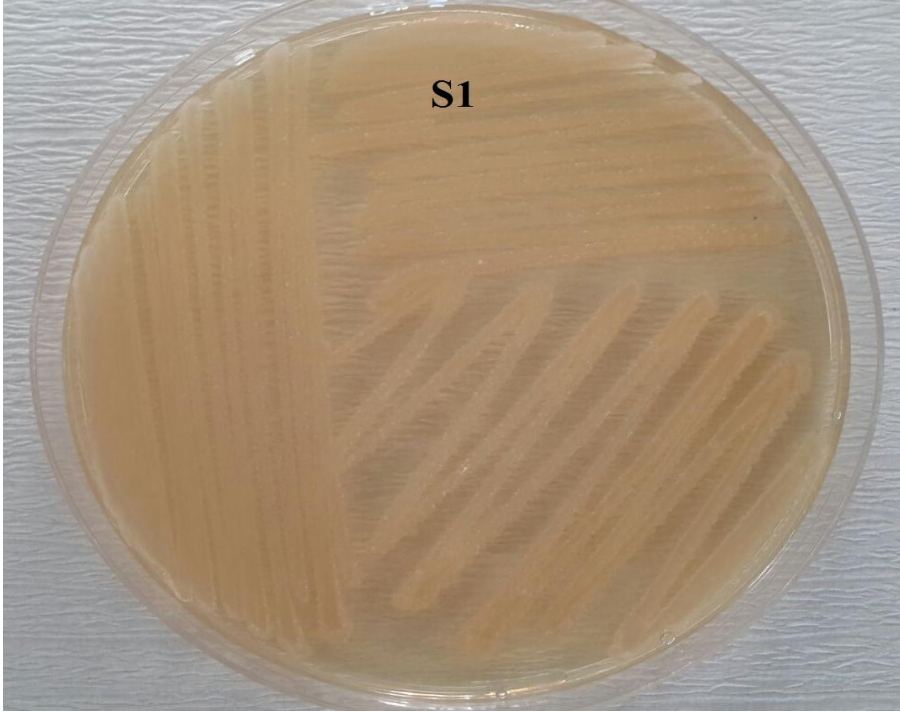
algoritması seçilerek Jukes ve Cantor'un uzaklık matrisi ile filogenik ağaçlar oluşturuldu.



4. BULGULAR

4.1. Metilotrofik Bakterilerin Saf Kùltürlerinin Elde Edilmesi

İzolasyon işleminden sonra saf kùltür elde edilinceye kadar saflaştırma işlemi devam ettirildi. Elde edilen saf kùltür 4 °C’de stoklandı.. Şekil 4.1’de S1 suşunun alkali ortamdaki ortamındaki saf kùltürü ve NMS ortamındaki kùltürü gösterilmiştir.



Şekil 4.1. S1 izolatının alkali besiyerindeki görüntüsü.

4.2. Metilotrofik İzolatın Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Van Gölü’den toplanan sediment örneklerinden, yapılan izolasyon çalışmalarında elde edilen yegane karbon ve enerji kaynağı olarak metanol bulunduran ortamda üreyen S1 bakterisinin gram boyama sonucu gram negatif olduğu belirlendi.

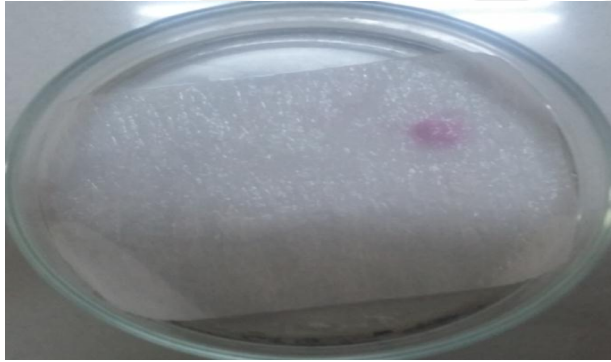
İzole edilen izolat S1 olarak numaralandırıldı. Bu izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlendi. İndol, oksidaz (Bkz Şekil 4.4.), katalaz (Bkz Şekil 4.5.), kazein hidrolizi (Proteaz), tween 80 hidrolizi (lipaz), nitrat redüksiyonu, sitrat kullanımı, Metil Red(MR), beta galaktosidaz, gelişebildiği tuzluluk ve metanol aralığı ve bazı şekerlerin kullanımı ile ilgili biyokimyasal özellikleri tespit edildi (Çizelge 4. 1).

Çizelge 4.1. S1 izolatına uygulanan biyokimyasal testler

No	Testler	S1
1	Haraketlilik	+
2	Pigmentasyon	Beyaz
3	Hücre şekli	Basil
4	Gram reaksiyonu	-
5	D-Maltoz	-
6	Sitrat testi	+
7	MR testi	-
8	L-Arabinoz	-
9	D-Mannitol	-
10	Sükroz	-
11	NaCl %2,5-5	Üreme var
	NaCl % 10-20	Üreme yok
12	Metanol %1-5	Üreme var
	Metanol % 10-20	Üreme yok
13	Laktoz	-
14	D-Mannoz	+
15	D-Fruktoz	+
16	Trahelez	-
17	D-Galaktoz	+
18	MacConkeyAgar(MAC)	Üremez
19	Gelişme durumu	Fakültatif anaerob
20	Asetat	-
21	Laktat	-
22	Üre	-
23	D-Ksiloz	+
24	Nitrat	-

Çizelge 4.1. S1 izolatına uygulanan biyokimyasal testler (devamı)

No	Testler	S1
25	D-glikoz	+
26	Katalaz	+
27	Nitrat Redüksiyonu	-
28	Gliserol	-
29	Oksidaz	+
30	Arjinin	-
31	Salmonella Sigella(SS) Agar	Üremez
32	Tween 80 hidrolizi	-
33	Kazein hidrolizi	+



Şekil 4.2. S1 Oksidaz testi

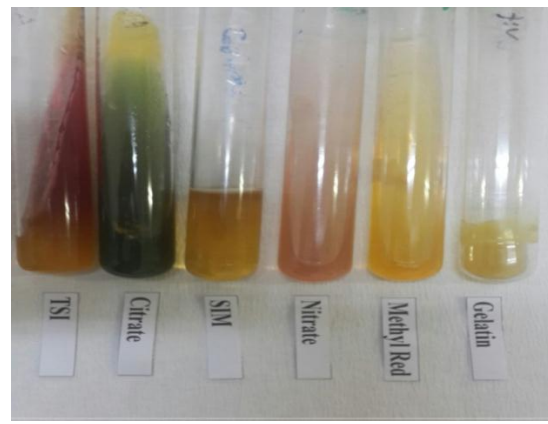


Şekil 4.3. S1 Katalaz testi

S1 izolatın nitrat indirgemesi bakımından negatif katalaz ve oksidaz testleri bakımından ise pozitif olduğu gözlemlendi.



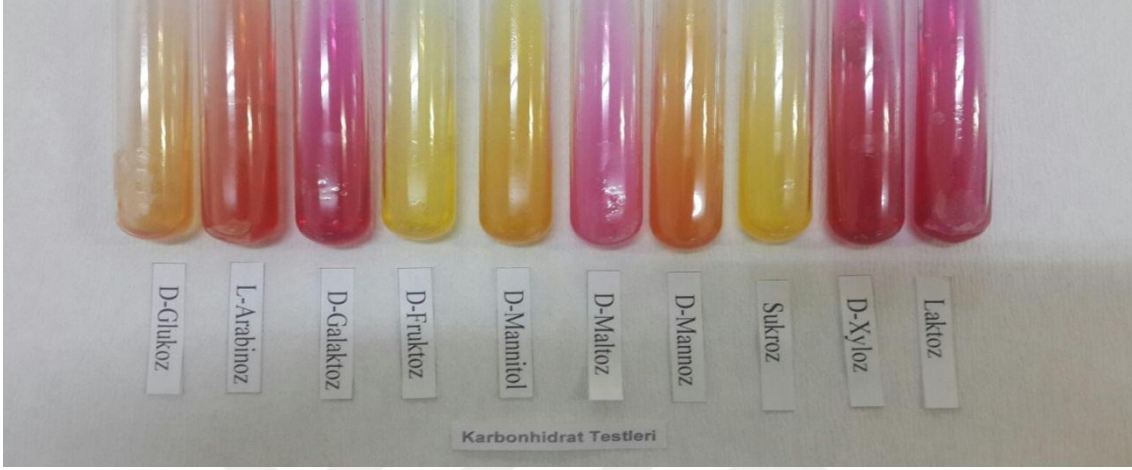
Şekil 4.4. İzolatın geliştiği metanol aralığı



Şekil 4.5. Nitrat ve diğer bazı testlerin sonuçları

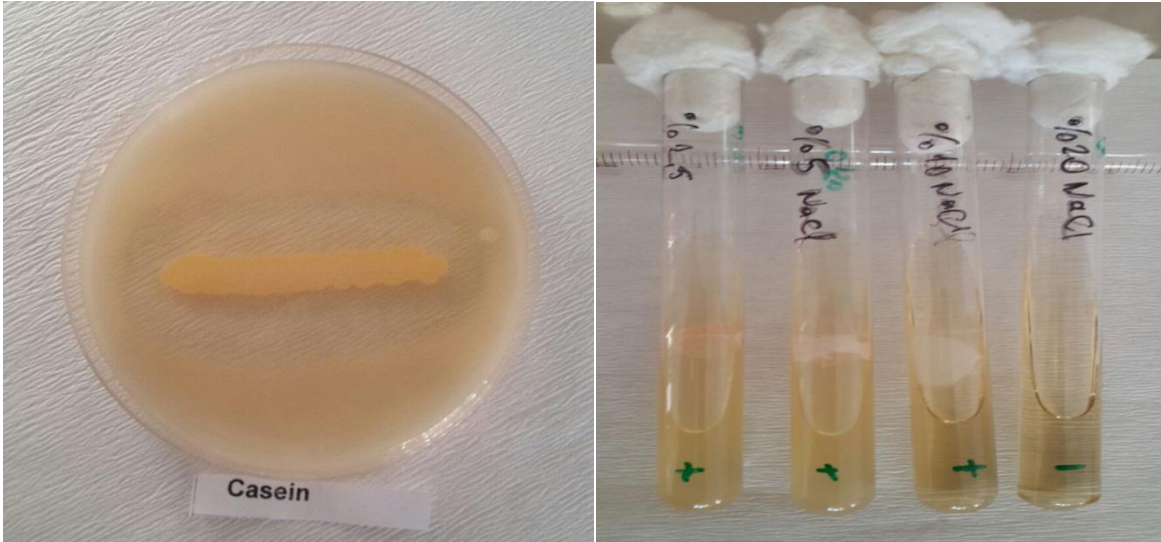
S1 izolatın %1 ve %5 metanol içeren besiyerinde gelişebildiği, %10 ve üzerinde metanol içeren ortamlarda ise üremenin gerçekleşmediği gözlemlendi.

İzolatın nitrat indirgenmesi ve metil red testlerinin negatif sonuç verdiği sitrat testinin ise pozitif sonuç verdiği gözlemlendi.



Şekil 4.6. Bazı şeker testlerinin sonuçları.

İzolatın glikoz, galakatoz, fruktoz, mannoz ve ksilozu karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiği arabinoz, mannitol, maltoz, sükroz ve laktozu ise kullanamadığı gözlemlendi.

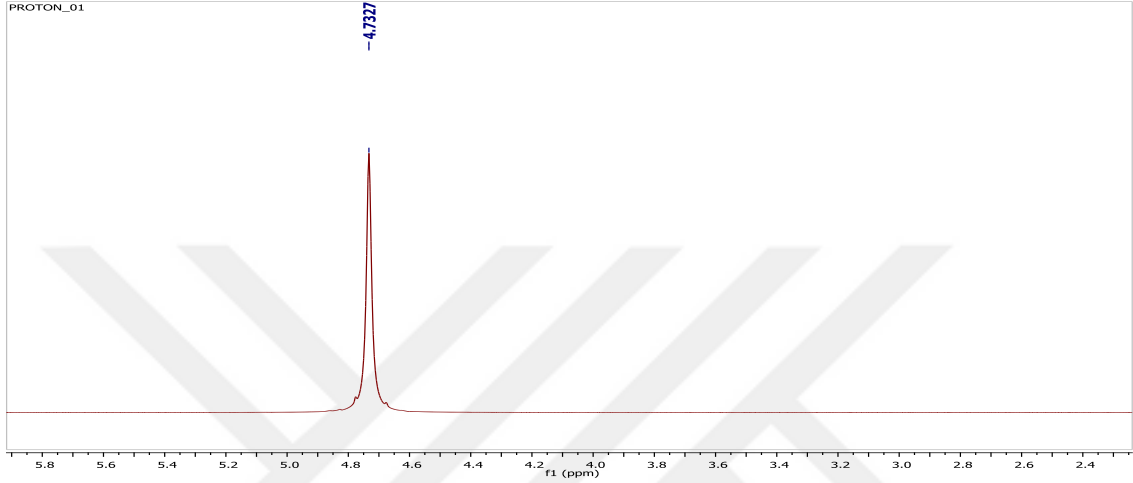


Şekil 4.7. Kazein hidrolizi testi.

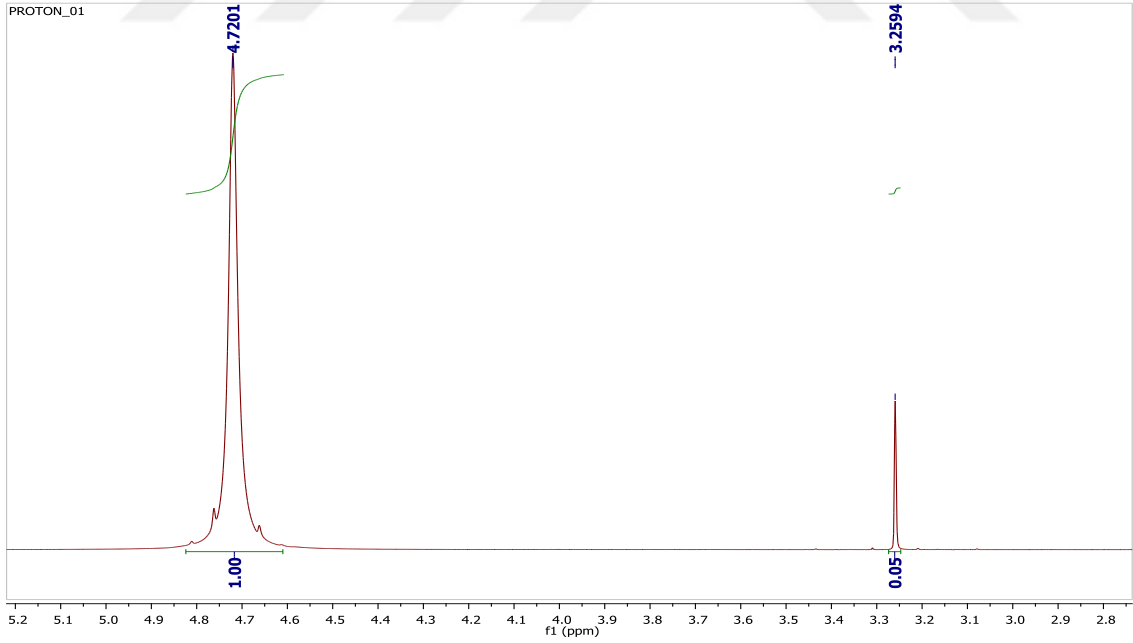
Şekil 4.8. S1 izolatın gelişebildiği tuz aralığı.

İzolatanın kazeini hidrolize tespit edildi. İzolatanın %2.5, %5 ve %10'luk NaCl içeren besiyerlerinde üreyebilirken %20 gibi yüksek oranda NaCl içeren besiyerinde üremediği gözlemlendi.

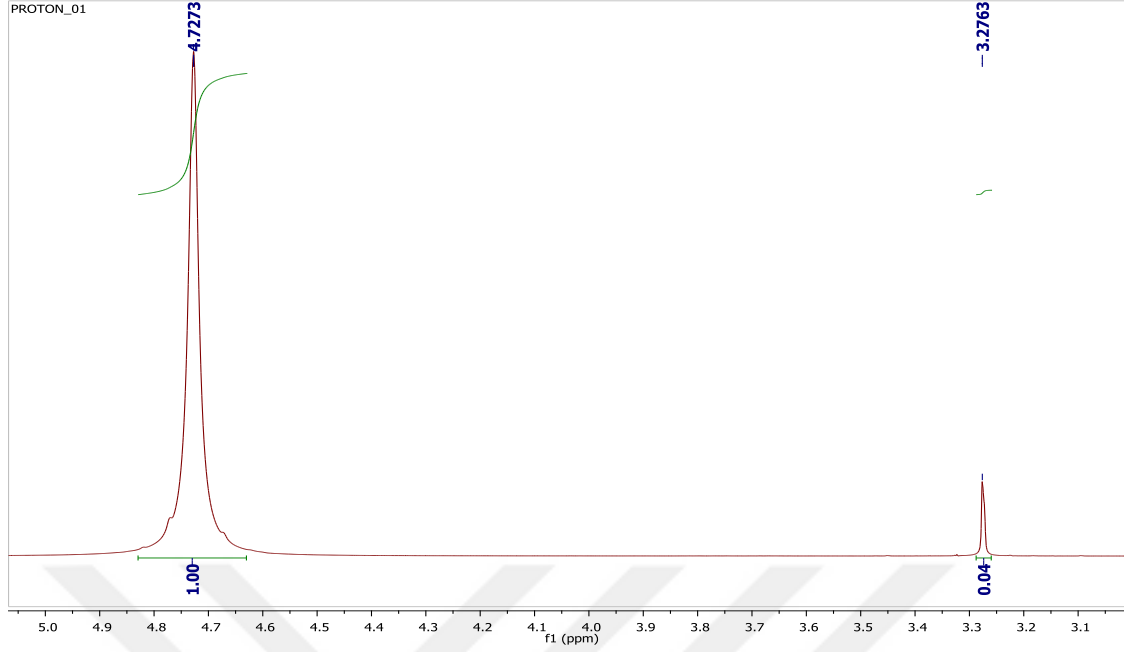
4.3. NMR Tekniğiyle S1 İzolatının Metanol Kullanımını Belirlemek



Şekil 4.9. Negatif kontrol (Metanol bulunmaz S1 izolatu bulunur).



Şekil 4.10. Pozitif kontrol (Metanol var S1 izolatu yok).



Şekil 4.11. Deneme (Hem metanol hem de S1 izolatu var).

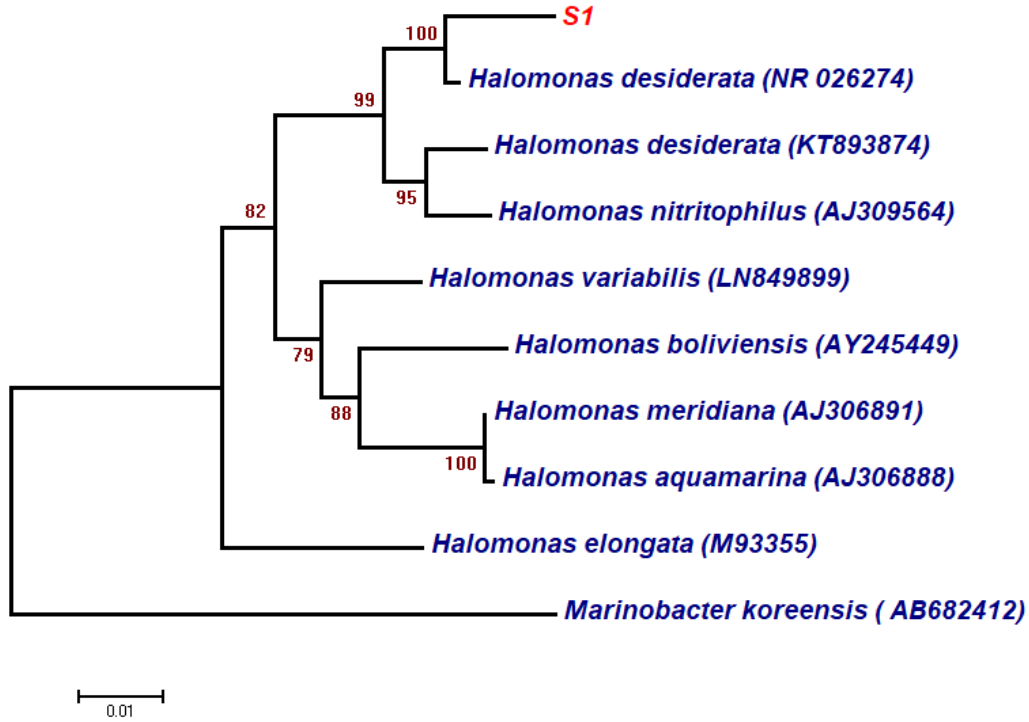
Grafiklerde görüldüğü gibi Deneme aşamasında S1 izolatu varlığı Pozitif aşamaya kıyasla CH_3 'ü temsil eden pikin kısmi integrasyonunda azalmaya sebep olmuştur. Bu durum S1 izolatu metanolu kullanmasından kaynaklanır.

4.4. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi

Test organizmasından saf olarak elde edilmiş DNA örneğinin 16S rDNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki primer (27F and 1492R; Lane, 1991) kullanılarak Thermal Cycler (MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler, Korea)' da PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplifiye ürünler %1,5'lik kontrol agaroz jelde (40 ml 1xTBE tampon, 0,4 g agaroz) 100 Voltta 45 dakika DNA markör ile birlikte yürütüldükten sonra görüntüleme sisteminde fotoğflanarak kaydedilmiştir. Test izolatlarının 16S PCR amplifikasyon ürünlerinin %1'lik kontrol agaroz jeldeki görüntüsü Şekil x verilmiştir.

İzolatu 16S rDNA gen sekanslarını taksonomik hiyerarşiye sokabilmek için BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak Gen Bankasındaki veritabanı ile karşılaştırılmıştır.

Test organizması ve ilgili cinslerin tip türlerinin dizi analizine bağlı filogenetik dendrogramları Neighbour-joining algoritması kullanılarak oluşturulmuştur. Neighbour-joining algoritması için filogenetik uzaklık matrisi Jukes-Cantor metodu izlenerek gerçekleştirilmiştir (Jukes ve Cantor, 1969). Filogenetik analizler için oluşturulan filogenetik ağacın bootstrap analizleri 1000 tekrarlı olarak MEGA 7 paket programında gerçekleştirilmiştir. Dış grup olarak *Marinobacter koreensis* AB682412 seçilmiştir. *Halomonas* cinsini temsil eden çalışma izolatu ve ilgili tip türlerinin 16S rRNA nükleotit dizileme analizleri sonucu Neighbour-joining matrisiyle oluşturulan filogenetik ağaçlar Şekil x'te verilmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaçta S1 izolatu *Halomonas desiderata* (NR 026274) nolu izolat ile kümelenmiştir. *Halomonas* cinsi bakteriler ve S1 izolatu güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir.



Şekil 4.12. 16S rDNA analizi için Neighbour-joining algoritması ile filogenetik ağaç.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya küresel ısınma ve iklim değişimi problemlerini çözmek için mücadele ediyor. Bu iki sorunun arkasındaki temel neden, hem doğal süreçler hem de insan faaliyetleri tarafından çevreye salınan sera gazlarında (GHG'ler) büyük rol oynayan sanayi devrimidir. Küresel iklim değişimi bir günde çözülebilecek bir konu değildir. Bu sorunun çözümü için tek tek her milletin harekete geçmesi gerekir. Sera gazı emisyonları, kullanılan yakıtların türleri değiştirilerek ve düşük karbonlu tarzlarına geçilerek azaltılabilir. Etki azaltma raporları, atmosferdeki mevcut sera gazlarının miktarının azaltılmasıyla iklim değişiminin yavaşladığını ortaya koymaktadır. Atmosferdeki GHG'lerin miktarının düşürülmesi enerji kullanımının azaltılmasıyla başarılmıştır. Ayrıca büyük bir mikroorganizma grubu da bu zararlı gazların azaltılmasında ve indirgenmesine rol alır. CO₂, CH₄ ve N₂O dahil olmak üzere GHG'lerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde mikroorganizmaların rolü yaygın olarak kabul edilmektedir. Sera gazı emisyonlarını kısıtlamak için güneş enerjisi, gel-git enerjisi, hidrojen yakıt hücreleri, rüzgar enerjisi ve jeotermal enerji gibi bir dizi yeni teknoloji kullanılmaktadır.

İklim değişiminin yavaşlatılmasında mikrobiyal kominitelerin yoğun katılımı vardır. Sulak alanlarda, okyanuslarda Rumenlerde ve termit bağırsaklarında yaşayan metanojenler gibi bazı mikrobiyal topluluklar çevreye sera gazı (metan) katmaktadır. Öte yandan metanotroflar mikroorganizmalar, metanı karbon kaynağı olarak kullanma ve böylece ortamdaki sera gazı seviyesini azaltma kapasitesine sahiptir. Mikroorganizmaların küresel iklim değişikliğini yavaşlatılmasında kilit rol oynayabileceğini gösteren çeşitli raporlar bulunmaktadır. Karasal mikrobiyal kominiteler küresel iklim değişikliğine tepki verir. İklim değişikliği, özellikle sıcaklık ve nem içeriğindeki değişim, mevcut mikrobiyal popülasyonların fizyolojisini modifiye ederek ve/veya mikrobiyal topluluğun bileşimini değiştirerek, iki yolla sera gazı akışı gibi süreçleri etkiler. Mikrobiyal kominitelerin manipülasyonu küresel iklim değişimini hafifletmek için potansiyel olarak güçlü bir araç sunar. Yaralı mikrobiyal kominiteleri yönetmek için onların ekolojisini ve işlevlerini anlamak önemlidir. Metan biyolojik

döngüsü diğer sera gazlarının döngülerinden daha açıktır. Çünkü metan yolağı basit ve özelleşmiş mikroorganizmaları içerir.

Metilotroflar karbon-karbon bağı içermeyen indirgenmiş karbon substratlarını kullanan mikroorganizmaların fonksiyonel bir grubunu temsil eder. Metilotrofik bakteriler metanotroflar (metan tüketen) ve metilotroflardan (metan dışındaki indirgenmiş karbon substratlarını kullananlar) oluşur. Metilotroflar metan hariç metanol, formaldehit, format, dimetilamin gibi bileşikleri tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler. Metanotroflar tarafından metanın biyolojik oksidasyonu küresel atmosferik metan havuzunun sadece yaklaşık %5'ini oluşturur. Metanotroflar ayrıca atmosfere kaçmadan önce topraktaki metanın %90 kadarını oksidize eder.

Metilotrofik bakteriler tarafından gerçekleştirilen bozunma ve ayrıştırma süreçleri çevredeki karbon döngüsünün devamlılığını sağlar. Organik moleküllerin biyodegradasyonu CO₂ üretimi ile sonuçlanır. Metilotrofik bakterilerden başka Actinomycetes, Firmicutes, Arthrobacters ve Pseudomonads gibi prokaryotlarda zararlı karbon ve karbon türevlerinin biyodegradasyonunda kritik bir öneme sahiptir (Kumar., 2017).

Metilotrofik bakteriler toksik bileşiklerin bozunmasında rol almasına ek olarak ağır metalleri de tolere eder. Hiperakümülyasyon yapan bitki *Thlaspi goesigense*'nin rizosfer ve endosferi üzerinde bulunan *Methylobacterium* izolatları nikel, kadmiyum, bakır, çinko ve krom da dahil olmak üzere çoklu ağır metal dirençliliği göstermiştir. *Methylobacterium* ayrıca bitkilerdeki nikel ve kadmiyumun toksisitesini azaltır, bitki büyümesini destekler ve çim liflerinin fitotoksitesini kolonize eder ve azaltır. Magrov bitkisi içindeki bakteriyal çeşitliliğin tanımlanması bu ekosistemdeki mikroorganizmaları tanımamıza katkı yapar. Bu yüksek düzeyde adapte olmuş bakteriyal türler, kirlenmiş bir ortamın biyoremedasyonunu destekleyecek bakterileri araştırmak gibi gelecek çalışmalar için biyoteknolojik araçların potansiyel bir kaynağıdır. Endofitler kendi bitki konakçılarının iç dokularında hastalığa neden olmadan kolonize olurlar ve konaklarıyla mutualist bir ilişki kurabilirler (Dourado ve ark., 2012).

Farklı kaynaklardan gelen (doğrudan antropojenik kaynaklardan ya da kuzey kutbu'ndaki hızlı potansiyel salınımdan) metan salınımı, gelecekte iklim uyumu için potansiyel bir risk oluşturabilir. Bu yüzden metan emisyonunun azaltılması için çeşitli stratejilerin benimsenmesi yönünde ciddi bir ilgi vardır.

Metilotrofik bakterilerin metan dahil C1 bileşiklerinden faydalandığı bilindiğinden, metan degrade eden bakterilerin yeni cinslerin izole etmek ve karakterize etmek için sürekli bir amaç vardır. Bu nedenle, keşfedilen ve keşfedilecek yeni metilotrofik bakteriler metanı verimli şekilde kullanarak küresel ısınma etkisini azaltmaya yardımcı olabilir (Kumar., 2017).

Bu çalışmada amaç Van Gölü'nün farklı alanlarından toplanan sediment örneklerinden metanolü yegane enerji ve karbon kaynağı olarak kullanma yeteneğine sahip metilotroflar olarak bilinen metanotrofların bir alt grubu olan bakterilerin keşfedilmesiydi. Van Gölü'nün farklı alanlarından toplanan sediment örnekleri, %1 metanol içeren NMS besiyeri kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda sadece S1 suşunun yegane enerji ve karbon kaynağı olarak metanol içeren ortamda üreyebildiği gözlemlendi.

Mikroorganizmaların kendilerine has biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik özellikleri vardır. Her bakteri veya arkea kendine has enzimlere sahiptir ve yine belirli maddeleri kendine özgü bir şekilde metabolize ederek çeşitli yapım ve yıkım ürünleri oluşturur. Biz de Van Gölü gibi ekstrem bir ortamda yaşayan bu bakterimizin biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik özelliklerini belirlemek için izolasyondan sonra çeşitli testler uyguladık. Bakterimizin gram negatif, basil, hareketli, oksidaz pozitif, katalaz pozitif ve fakültatif anaerob olduğu gözlemlendi.

S1 suşunun tek karbon ve enerji kaynağı olarak metanollu ortamda ürettiği gözlemlenmesine rağmen S1 suşunun metanolü kullandığına dair daha güçlü bulgular elde etmek için daha önce metilotrofların tespitinde kullanılmıyan bir yöntem uygulandı. Bu yöntemde metilotrofik bakterilerin bulunduğu ortamda metanolün miktarındaki değişimi gözlemlemek için NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) cihazı kullanıldı.

Deneyi üç aşamada gerçekleştirdik. İlk olarak Negatif kontrolde metanol ya da S1 suşu kullanılmadan yalnızca besi yeri ve çözücü olarak D₂O kullanıldı. Negatif kontrolde Şekil 4.9. 'daki grafikte görüldüğü gibi 4.7'de sadece bir pik oluştu. Bu pik besiyerinin içeriğinde bulunan H₂O'nun OH'ından kaynaklanmaktadır. İkinci olarak Pozitif kontrolde her üç aşama için ortak hazırlanmış besiyeri %1 metanol içerecek şekilde hazırlandı. S18 suşunu içermeyen ve diğer aşamalarla eşit madde miktarına sahip örneğin NMR sonuçlarında biri 4.7 diğeri 3.25'te iki pik oluştu. 4.7'deki pik yine

OH'dan kaynaklanırken 3.25'teki pik CH_3 'ü temsil eder. Son olarak Deneme aşamasında ise belirli bir süre %1 metanol içeren aynı miktar besi yerinde üremeye bırakılmış örneğin NMR sonuçlarına bakıldı ve yine pozitif örnekte olduğu gibi 4.7 ve 3.25'te iki farklı pik oluştuğu gözlemlendi. Pozitif kontrol ve Denemede piklerin kısmi integrasyonları hesaplandığında şekil 4.11.'den de görüldüğü gibi denemede kısmi integrasyon değeri 0,04 iken pozitif kontrolde (Şekil 4.10.) 0.05'tir. Yani S1 suşunun kullanıldığı örnekte CH_3 'ü gösteren pikin kısmi integrasyonun daha küçük olduğu gözlemlendi. Bu durum S1 suşunun metanolu kullandığını gösterir.

Metilotrofların sera gazlarını degridere edebilme yeteneği bu mikroorganizmaların küresel iklim değişikliğinde çok önemli ve seçkin bir rol almasını sağlar. Toprak, bitki ve su ekosistemlerinde rapor edilen metilotrofik potansiyeli olan bir dizi bakteri, iklim değişikliğinin hafifletilmesinde büyük ölçüde katkıda bulunur. Metilotrofların bu önemli katkıları göz ardı edilemez. Bu yüzden yeni metilotrofik mikroorganizmalar ve üstün yetenekleri keşfedilmeye devam edilmelidir.

16S rRNA gen dizileme bakteriler arasındaki filogenetik ilişkilerin açıklanmasında, herhangi bir ortamdan izole edilen bakterilerin tanımlanmasında 1980'lerden beri kullanılan güçlü bir tekniktir (Busse ve ark 1996). 16S rRNA gen bölgesinin bakteriler arasında evrensel ve işlevinin sabit olması, korunaklı bölgelerin yanında türe özgü değişiklik gösteren bölgelerin varlığı, bakterileri cins veya tür seviyesinde tüm araştırmacılara açık veritabanlarını kullanarak tanımlanmasına imkân sağlamaktadır (Vandamme ve ark 1996; Cavalier-Smith 2002). Karşılaştırmalı 16S rRNA gen dizi analizleri modern taksonominin vazgeçilmezleri arasındadır. 2000'li yıllardan itibaren PCR kullanımının ve DNA dizilemenin yaygınlaşmasının sonucu olarak 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteriyal izolatların doğru şekilde tanımlanmasında ve yeni bakteriyal izolatların literatüre kazandırılmasında kilit nokta olmuştur.

16S rDNA gen bölgesi filogenetik analizinde 1202 nt'lik bir bölgede kıyaslanan S1 izolatının, 16 nükleotid fark ve % 98.6 benzerlik ile *Halomonas desiderata* (NR 026274)'ya benzediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak Gen Bankasındaki veritabanı ile karşılaştırılması sonucu suşun %100 *Halomonas desiderata* olduğu ortaya çıkmıştır.

Bu filogenetik ağaç içerisinde *Halomonas* türleri güçlü bir homoloji ile kümelenmiş olup dış grup olarak seçilen *Marinobacter koreensis* AB682412 türü ile ayrı bir kladda yer alması ve kendi aralarında güçlü bir homoloji oluşturması bu çalışmanın güvenilir olduğunu desteklemektedir. Çalışmamızda S1 suşu morfolojik, biyokimyasal ve 16S rDNA analizine göre *Halomonas desiderata* olarak teşhis edilip bazı ekstraselüler hidrolitik enzim kabiliyetleri ortaya çıkarılmıştır.





KAYNAKLAR

- Agteren, M. H. V., Keuning, S., Janssen, D. B., 1998. Introduction, Chap. 1. ***Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds*** (Editor: S. Keuning, J. Oosterhave). Kluwer Academic Publishers, Groningen. 3-8.
- Aguirre, A., Cáceres, M., San Martín, R., Gentina, J. C., Aroca, G. 2016. Comparison of the Biodegradation of Trimethylamine by *Hyphomicrobium vulgare* and *Aminobacter aminovorans*. ***Chemical Engineering Transactions***, **54**: 301-306.
- Antony, C. P., Doronina, N. V., Boden, R., Trotsenko, Y. A., Shouche, Y. S., Murrell, J. C., 2012. *Methylophaga lonarensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic methylotroph isolated from the soda lake sediments of a meteorite impact crater. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, **62**(7): 1613-1618.
- Antony, C. P., Murrell, J. C., Shouche, Y. S., 2012. Molecular diversity of methanogens and identification of *Methanolobus* sp. as active methylotrophic Archaea in Lonar crater lake sediments. ***FEMS Microbiology Ecology***, **81**(1): 43-51.
- Arahal, D. R., Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Mormile, M. R., Tindall, B. J., Oren, A., Ventosa, A., 2007. Recommended minimal standards for describing new taxa of the family Halomonadaceae. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, **57**(10), 2436-2446.
- Benson, J. K., 2002. ***Microbiological Application: Laboratory Manual in General Microbiol.*** 8th Edition. McGraw Hill, New York, 471-478
- Altınay, B., 2008. ***Metanol Hakkında Genel Bilgi, TAPDK Raporu***, 15-17.
- Busse, H.J., Denner, E.B.M., Lubitz, W., 1996. Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. ***Journal of Biotechnology***, **47**(1): 3-38.
- Cavalier-Smith, T., 2002. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, **52**(1): 7-76.
- Çotuk, A., Anđ Küçüker, M., 1992. ***Biyologlar için Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu***, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 129.
- Dixon, J. L., Beale, R., Nightingale, P. D., 2011. Rapid biological oxidation of methanol in the tropical Atlantic: significance as a microbial carbon source. ***Biogeosciences***, **8**(9): 2707-2716.
- Doronina, N. V., Darmaeva, T. D., Trotsenko, Y. A., 2003. *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, **53**(1): 223-229.
- Doronina, N., Darmaeva, T., Trotsenko, Y., 2003. *Methylophaga natronica* sp. nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, restricted-facultatively methylotrophic bacterium from soda lake of the Southern Transbaikal region. ***Systematic and Applied Microbiology***, **26**(3): 382-389.
- Dourado, M. N., Ferreira, A., Araújo, W. L., Azevedo, J. L., Lacava, P. T., 2012. The diversity of endophytic methylotrophic bacteria in an oil-contaminated and

- an oil-free mangrove ecosystem and their tolerance to heavy metals. *Biotechnology Research International*, **2012**: 1-8..
- Hanson, R. S., Hanson, T. E., 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, **60**(2): 439-471.
- Joye, S. B., Connell, T. L., Miller, L. G., Oremland, R. S., Jellison, R. S., 1999. Oxidation of ammonia and methane in an alkaline, saline lake. *Limnology and Oceanography*, **44** (1): 178-188.
- Kayıkçıoğlu, H. H., 2008. Global gases produced by soil microorganisms. *Journal of Ege University Faculty of Agriculture*, **45** (1): 49-55
- Kempe, S., Kazmierczak, J., Landmann, G., Konuk, T., Reimer, A., Lipp, A., 1991. Largest known microbialites discovered in Lake Van, Turkey. *Nature*, **349** (6310): 605.
- Kumar, M., Saxena, R., Tomar, R. S., Rai, P. K., Paul, D., 2018. Role Of Methylophilic Bacteria In Climate Change Mitigation, Chap. 8. *Microbes For Climate Resilient Agriculture* (Editors: P. L. Kahsyap, A. K. Srivastava, S.P. Tiwari, S. Kumar). SPI Global, Pondicherry, India. 376.
- Lee, P. A., de Mora, S. J., Levasseur, M., 1999. A review of dimethylsulfoxide in aquatic environments. *Atmosphere-Ocean*, **37**(4): 439-456.
- MacFaddin, J. F., 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd edition. Williams & Wilkins, USA. 312.
- Moussard, H., Stralis-Pavese, N., Bodrossy, L., Neufeld, J. D., Murrell, J. C., 2009. Identification of active methylophilic bacteria inhabiting surface sediment of a marine estuary. *Environmental Microbiology Reports*, **1**(5): 424-433.
- Roy, S., Sahoo, S., Maiti, S., 2013. Isolation of Halomonas sp. sm-sr10, an Extreme Halophilic, Hydrocarbon (engine-oil) Degrading and Mega Plasmid Harboring Bacteria, from Bay of Bengal, India. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **7**(3): 2261-2270.
- Schönheit, P., Kristjansson, J. K., Thauer, R. K., 1982. Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out-compete methanogens for acetate. *Archives of Microbiology*, **132**(3): 285-288.
- Semrau, J., 2011. Bioremediation via methanotrophy: overview of recent findings and suggestions for future research. *Frontiers in microbiology*, **2**(209): 1-7.
- Sorokin, D. Y., Berben, T., Melton, E. D., Overmars, L., Vavourakis, C. D., Muyzer, G., 2014. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles*, **18**(5): 791-809.
- Tambekar, D. H., Pawar, A. L., 2013. Molecular characterization and methylophilic activities of Pseudomonas spp. from Lonar lake. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, **2**(142-148): 2013.
- Tambekar, D. H., Rajgire, A. V., Gaikwad, J. N., 2014. Bioremediation of C1 Compounds from Methylophilic Bacteria isolated from Lonar lake. *Int J Adv Pharm Biol Chem*, **3**(3): 612-616.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, **60**(2): 407-438.
- Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., Higton, G., 2009. *Industrial Microbiology: an Introduction*. 1 st Edition. Blackwell Science, London, UK. 287.

- Williamson, A., De Santi, C., Altermark, B., Karlsen, C., Hjerde, E., 2016. Complete genome sequence of *Halomonas* sp. R5-57. *Standards in Genomic Sciences*, **11**(1): 62
- Wu, G., Wu, X. Q., Wang, Y. N., Chi, C. Q., Tang, Y. Q., Kida, K., Luan, Z. K., 2008. *Halomonas daqingensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**(12): 2859-2865.
- York, M. K., Traylor, M. M., Hardy, J., Henry, M., 2007. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. MR-VP (Methyl Red–Voges-Proskauer) Tests. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. Update*, ASM Press, Washington, USA. 2516.
- York, M. K., Traylor, M. M., Hardy, J., Henry, M., 2007. . Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Indole test. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd edition. ASM Press, Washington, USA. 2516.
- Zinder, S. H. 1994. Physiological Ecology of Methanogens, Chap. 3. *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics* (Editor: James G. Ferry). Springer, Boston. 536.
- Zhuang, G., 2014. *Methylotrophic Methanogenesis and Potential Methylated Substrates in Marine Sediment*. Doctoral dissertation, Staats-und Universitätsbibliothek Bremen, Germany.



EKLER

Ek 1. Besiyerleri

Ek.1.1.Metilotrofik Besiyeri

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
KNO ₃	0.5 g
NH ₄ Cl	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.35 g
Na ₂ HPO ₄	0.65 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.2 g
NaCl	7.5 g
ddH ₂ O	1000 ml
FeSO ₄	0.002 g

Ek.1.2. Alkali Besiyeri

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Glikoz	10 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Pepton	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.2 g
Na ₂ CO ₃	10 g
Agar	15 g
ddH ₂ O	1000 ml

Not: Na₂CO₃ ayrı olarak otoklavlanmalıdır ve otoklav sonrası besiyerine katılmalıdır.

Ek 1. 3. Nişasta agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Nişasta	2g
Agar	2g
Tryptic Soy Broth	100ml

Ek 1.4. Skim milk agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Skim milk	0.1g
Agar	2g
Tryptic Soy Broth	100ml

Ek 1. 5. Tween 80 Agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Tween 80	3ml
Agar	2g
Tryptic Soy Broth	100ml

Ek 1.6. Nitrat broth

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
KNO ₃	1g
Tryptic Soy Broth	100ml

Ek 1.7. Karbonhidrat Fermentasyon Ortamı

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Fenol Red	0.03g
Tryptic Soy Broth	100 ml

Ek 2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar

Ek 2. 1. Agaroz jel hazırlama

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Agaroz	0.4g
TBE	40ml
Ethidium Bromid	4µl
1.5 dalga fırın	

Ek 2.2. CTAB+0.7 M NaCl

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
CTAB	10g
NaCl	4.1g
Steril distile su	100ml

Ek 2.3. Fenol-kloroform-izoamilalkol

Kullanılan Maddeler	Oranlar
Fenol-kloroform-izoamilalkol	25:24:1

Ek 2.4. T.E. (Tris-Edta) çözeltisi

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Tris	1.211g
0.5 M EDTA	4ml

Ek 2.5. 0.5M EDTA

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
EDTA	1862g
Saf su	100ml

Ek 2.6.Ethidium bromide

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Ethidium Bromid	0.01g
Distile su	1ml

Ek 2.7. RNAaz hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
RNAase	25µl
Stril saf su	1ml

Ek 2.8. SDS çözeltisi

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
SDS	10g
Distile su	100ml

Ek 2.9. Kloroform-izoamilalkol çözeltisi

Kullanılan Maddeler	Oranlar
Kloroform-izoamilalkol	24:1

Ek 2.10. Loading dye Hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Sukroz	30g
EDTA (0.5 M PH:8)	20 ml
Bromo Blue	10mg
Steril saf su	50 ml

Ek 2.11. TBE Hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Tris HCl	10.78g
Borik asit	5.503g
EDTA	0.5845g
Saf su	1000ml

Ek 2.12.TAE(tris-asetat) çözeltilisi

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Tris HCl	4.84 g
Asetik asit	1.142 g
EDTA	2ml



ÖZ GEÇMİŞ

1989 yılında Bitlis’te doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Adana’da tamamladı. 2009 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2013 yılında mezun oldu. 2015 yılında Yüzüncüyıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.



T.C
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 19.11/2018

Tez Başlığı / Konusu:

Van Gölünden Toplanan Sediment Örneklerinden
Metiltrofik Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 57 sayfalık kısmına ilişkin, 18.11/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNİTİN intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 10 (on) dır.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

19.11.2018


Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Sedat KAVAK

Öğrenci No: 148102319

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı:

Statüsü: Y. Lisans Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR



(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

(Unvan, Ad Soyad, İmza)


Dr. Dr. Ferihsen SOY
Enstitü Müdürü