

**PETROL HİDROKARBONU KİRLİTİCİLERİNİN HALOFİLİK
BAKTERİ ve *ARCHAEA* TÜRLERİ KULLANILARAK
BİYODEGREDASYONU**

Nurahir BALTACI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Mayıs 2013
ANKARA**

Nurahir BALTAÇI tarafından hazırlanan PETROL HİDROKARBONU KİRLETİCİLERİNİN HALOFİLİK BAKTERİ VE ARCHAEA TÜRLERİ KULLANILARAK BİYODEGRADASYONU adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr.Ebru YILMAZ
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Gazi Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 29/05/2013

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü 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.

Nurahir BALTACI

**PETROL HİDROKARBONU KİRLİTİCİLERİNİN HALOFİLİK BAKTERİ
ve ARCHAEA TÜRLERİ KULLANILARAK BİYODEGREDASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

Nurahir BALTACI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Mayıs 2013

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye’de bulunan çeşitli halofilik bölgelerden halofilik mikroorganizmalar izole edilmiştir. İzole edilen 12 suşun, 16S rDNA dizi analizi ile moleküler tanımlamaları yapılmıştır. Tanımlama sonucunda 1 suşun *Halomonas aquamarina*, 6 suşun *Halobacillus trueperi*, 1 suşun *Thalassobacillus devorans*, 3 suşun *Halobacterium salinarium* ve 1 suşun *Halobacterium halobium* oldukları belirlenmiştir.

Çevre kirliliğine neden olan benzen, toluen, ksilen (BTX) petrol hidrokarbonu kirleticilerinin izole edilen halofilik bakteri ve arke türleri üzerinde toksik etkileri ve hidrokarbonlarını biyodegrede edebilme yetenekleri araştırılmıştır. Bu amaçla suşlar üzerinde farklı konsantrasyonlardaki benzen, toluen ve ksilen denenerek minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIK) tespit edilmiştir. Halofilik bakteri olan *Halobacillus trueperi* NB8 ve NB11 suşlarının %5’in üzerinde hidrokarbonlara dirençli olduğu belirlenmiştir. Biyodegradasyon çalışmaları, elde edilen MIK değerleri esas alınarak yapılmıştır. Araştırmada kullanılan suşlar içerisinde en iyi biyodegradasyon sonucu veren suşun *Halobacillus trueperi* NB8 olduğu görülmüştür. Aşırı tuzcul *H. salinarium* NB20, NB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 arke türlerinin ise BTX bileşenlerini biyodegrede etme yeteneklerinin çok az olduğu tespit edilmiştir.

Bilim Kodu :203.1.023
Anahtar Kelimeler :Halofilik bakteri, Halofilik arke, Petrol
Hidrokarbonu, Biyodegradasyon
Sayfa Adedi :89
Tez Yöneticisi: :Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

**BIODEGRADATION of PETROLEUM HYDROCARBON POLLUTANTS by
SPECIES of HALOPHILIC BACTERIA and ARCHAEA**

(M. Sc. Thesis)

Nurnehir BALTACI

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

May 2013

ABSTRACT

In this study, halophilic microorganisms are isolated which are different halophilic parts of Turkey. The molecular identifications of 12 strains isolated are obtained by the analysis of 16S rDNA sequences. As a result of this identification, it is determined that 1 of the strains is *Halomonas aquamarina*, 6 of them are *Halobacillus trueperi*, 1 of them is *Thalassobacillus devorans*, 3 of them are *Halobacterium salinarium* and 1 of them is *Halobacterium halobium*.

The toxic effects of benzen, toluene and xylene (BTX) petroleum hydrocarbon pollutants, provoking environmental pollution, on isolated species of halophilic bacteria and archaea and BTX hydrocarbons biodegradation capability are investigated. In this context; by testing benzene, toluene and xylene at different concentrations on the strains, their minimum inhibitory concentrations (MIC) are detected. NB8 and NB 11 strains which are hophilic bacteria are showed resistant to %5 concentration above hydrocarbons. The biodegradation studies are practised on the basis of the MIC values obtained. It is seen that the best biodegradation result is obtained from *Halobacillus trueperi* NB8 among the strains used in the study. However, it is found out that the extreme halophilic species of arcaea, *H.salinarium* NB20, 21, 28 and *H.halobium* NB22, do not have ability to biodegrade BTX components.

Science Code :203.1.023
Key words :Halophilic bacteria, Halophilic, *Archaea*,
Petroleum hydrocarbons, biodegradation.
Page number :89
Adviser: :Assoc. Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her türlü bilgi ve desteğini benden esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a çok teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında bana yardım eden Sayın Arş. Gör. Dr. Özcan YALÇINKAYA'ya teşekkür ederim. Tez çalışmamın her aşamasında beni yalnız bırakmayan meslektaşım Meryem Nur ZEYDANLI'ya, tüm Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına ve Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvar'ın da yüksek lisans, doktora yapan arkadaşlarıma yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

Araştırmalarım sırasında öneri ve fikirleriyle çalışmalarımın gelişmesine büyük katkısı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Yavuz BEYATLI' ya, Prof. Dr. Belma ASLIM' a ve Yrd. Doç. Dr.Mehmet Burçin MUTLU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmada kullandığım örnekleri toplamamda bana yardımcı olan Sayın Dilber SELÇUK'a, Serdar AYNUR'a ve Ali TOKALAK'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde benden desteklerini esirgemeyen ailem, sizi çok seviyorum. Her şey için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xivii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Biyodegradasyon (Organik Kirleticilerin Biyolojik Olarak Parçalanması).....	4
2.2. BTX (Benzen, Toluen, Ksilen) Bileşenlerinin Biyodegradasyonu.....	6
2.2.1. BTX bileşenlerinin aerobik biyodegradasyonu.....	8
2.2.2. BTX bileşenlerinin anaerobik biyodegradasyon.....	12
2.3. Halofilik Çevreler.....	14
2.4. Halofilik Mikroorganizmalar.....	18
2.4.1. Halofilik bakteriler.....	20
2.4.2. Halofilik arkeler.....	21
2.4.3. Halofilik ökaryotlar.....	23
2.5. Halofilik Mikroorganizmaların Osmotik Adaptasyonları.....	24
2.6. Halofilik ve Halotolerant Mikroorganizmaların Organik Kirleticileri Biyodegradasyonu.....	25
2.6.1. Halofilik mikroorganizmaların BTX biyodegradasyonu.....	27
3. MATERYAL VE METOT.....	29

Sayfa

3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Numunelerin tuz konsantrasyonu ve pH'larının belirlenmesi.....	29
3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri.....	29
3.2. Metot.....	32
3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu ve muhafazası.....	32
3.2.2. 16S rDNA dizi analizi.....	33
3.2.3. Mikroorganizmaların aktifleştirilmesi ve geliştirilmesi.....	35
3.2.4. Morfolojik ve biyokimyasal testler.....	36
3.2.5. Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi.....	41
3.2.6. BTX bileşenlerinin suşlar üzerine minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MIK) belirlenmesi.....	42
3.2.7. İzole edilen halofilik mikroorganizmaların BTX bileşenlerinin biyodegradasyonu.....	43
3.2.8. İstatiksel analizler.....	44
4. DENEYSEL BULGULAR.....	45
4.1. Örneklerin Toplanması.....	45
4.2. Örneklerin Toplam NaCl Değerlerinin Belirlenmesi.....	46
4.3. Halofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu.....	47
4.4. 16S rDNA Dizi Analizi.....	48
4.5. Biyokimyasal Testler.....	50
4.6. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	58
4.7. BTX Bileşenlerinin İzolatlar Üzerinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MIK) Belirlenmesi.....	59

	Sayfa
4.8. İzole Edilen Halofilik Mikroorganizmaların BTX Bileşenlerini Biyodegradasyonu.....	60
4.9. İstatiksel Analizler.....	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	92

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Petrol hidrokarbonlarının biyodegradasyonunda kullanılan enzimler ve bazı biyodegradasyon yapabilen mikroorganizmalar [Das ve., Chandran 2011].....	5
Çizelge 3.1. Primer sekansları, optimal bağlanma sıcaklıkları ve hedeflenen bölge.....	34
Çizelge 3.2. PZR reaksiyonunda kullanılan malzemelerin konsantrasyon ve miktarları.....	34
Çizelge 3.3. PZR reaksiyonunun gerçekleştirildiği program.....	35
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılmak üzere seçilen izolatların kodları, kaynakları ve izole edildikleri tarihler.....	46
Çizelge 4.2. Numunenin alındığı bölge ve içerdiği tuz konsantrasyonu.....	47
Çizelge 4.3. İzolatların kodu, geliştirildikleri besiyerleri, optimum gelişme sıcaklığı ve optimum gelişme pH'sı.....	48
Çizelge 4.4. İzolatların dizi analizi sonrası belirlenen en yakın gen bankası temsilcileri.....	59
Çizelge 4.5. İzole edilen halofilik mikroorganizmaların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	52
Çizelge 4.6. Halofilik bakteri ve arke suşlarının antibiyogram sonuçları.....	54
Çizelge 4.7. Minimum inhibisyon değerleri.....	60
Çizelge 4.8. İzolatların MSM besiyerinde farklı oranda BTX bileşen konsantrasyonlarında gelişimleri ve regrasyon analiz sonuçları.....	62
Çizelge 4.9. Suşların yüzde canlılık sonuçları.....	63

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Benzen, toluen, orto, meta, para ksilen hidrokarbonlarının yapısal diyagramı [http://en.wikipedia.org].....	7
Şekil 2.2. Benzenin katekol oksidasyonu [Onbaşılı , 2006]	9
Şekil 2.3. Katekolün katabolizmasında orto- kırılması metabolik yolu [Onbaşılı,2006].....	10
Şekil 2.4. Katekolün katabolizmasında meta- kırılması metabolik yolu [Onbaşılı, 2006].....	11
Şekil 2.5. %10 ve üzerindeki NaCl konsantrasyonlarında gelişebilen farklı domainlerdeki mikroorganizmaların filogenetik dağılımı.	20
Şekil 2.6. Archaea Kingdumu [Çoban, 2004].....	21
Şekil 4.1. Halofilik bakteri ve arkelerin antibiyotiklere karşı gösterdiği % duyarlılık oranı.....	59

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Büyük Tuz Gölü (Greath Salt Lake) , Amerika [http://en.wikipedia.org].....	15
Resim 2.2. Ölü Deniz (Death Sea), İsrail.....	16
Resim 2.3. Tuz Gölü (Şereflikoçhisar) [http://www.gokceadaliyiz.com].....	15
Resim 4.1. İzole edilen suşların kodu ve alındığı bölgeler.....	45
Resim 4.2. Halofilik arke suşlarının elektroforez görüntüsü.....	50
Resim 4.3. Halobacillus trueperi NB5 kodlu izolatin ışık mikroskobu görüntüsü....	50
Resim 4.4. Halobacillus trueperiNB10 izolatinin pozitif ve nişasta hidrolizi jelatin testi.....	54
Resim 4.5. Katalaz pozitif olan <i>Halomonas aquamarina</i> NB2 suşu.....	54
Resim 4.6. Üreaz testi pozitif ve negatif olan izolatların görüntüsü.....	55
Resim 4.7. Modifiye edilmiş TSI besiyerinde farklı şeker kaynaklarının kullanımı.....	56
Resim 4.7. <i>Halobacillus trueperi</i> NB8 ve <i>Halobacterium salinarium</i> NB20 bazı antibiyotiklere duyarlılık sonuçları.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
g	Gram
L	Litre
mL	Mililitre
M	Molar
pH	Asitlik Bazlık Birimi
%	Yüzde
>	Büyük
Kısaltmalar	Açıklama
BTX	Benzen Toluen Ksilen
BTEX	Benzen Toluen Etilbenzen Ksilen
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EPA	Environmental Pollution Agency (Çevre Kirliliği Ajansı)
MIK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MOBAM	Moleküler Biyoloji Araştırma Merkezi
MSM	Mineral Salt Medium
MTBE	Metil-Tersiyerbütileter
OD	Optikal Dansı
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
pHBA	Para Hidroksi Benzoik Asit
TSI	Triple Sugar Iron Besiyeri

1.GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artması ile birlikte çoğalan insan faaliyetleri ve teknolojik gelişmeler, çevre sorunlarına neden olmaktadır. Günümüzde yaşanan en önemli çevresel sorunlardan biri de organik kirleticilerden kaynaklanan su, toprak ve hava kirliliğidir. Sanayi teknolojilerinin gelişmesi ve gelişen teknolojilerin günlük hayatımızın bir parçası olması ile petrol ve petrol türevlerinin kullanımını hızlandırmıştır. Petrol ve petrol türevi organik maddelerin üretimi, taşınması, depolanması ve kullanımı sırasında kazara sızıntıları ya da bilinçsizce deşarjları, canlı ve çevre sağlığını tehdit eden kirliliklere neden olmaktadır.

Çevre kirleticilerinin ortaya çıkmasıyla, kirleticilerin bertarafında yeni nesil teknolojik uygulamalara ihtiyaç doğmuştur. Bu nedenle multidisipliner bir bilim olan Çevre Biyoteknolojisi gelişmiştir. Sanayi, tarım, madencilik, eczacılık vs. kaynaklı kirleticilerin neden oldukları kirliliklerin giderilmesinde, biyokimyasal potansiyeli olan mikroorganizmaları ve bitkileri kullanan Çevre Biyoteknolojisi uygulamaları geliştirilmiştir. Çevresel Biyoteknoloji ilk olarak 19.-20. yüzyıllarda kentsel atıksuların arıtılmasıyla başlamıştır [Hartmann, 1999]. Toprak iyileştirmesi, gaz saflaştırması, yüzey ve yeraltı sularının temizlenmesi, endüstriyel atıksuların temizlenmesi ve biyoorganik tortuların sıkıştırılarak gübre yapımı 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren gelişmeye başlamıştır [Jördening ve Winter, 2005]. Günümüzde karşımıza çıkan çeşitli kirletici etmenlerin, çevrede oluşturdukları kirliliğin giderilmesinde ve atıkların yeniden ham madde olarak kullanılmasında, biyoteknolojik uygulamalara gittikçe artan bir ilgi vardır.

Mikroorganizmalar, hem doğal olarak meydana gelen hem de çevresel kirleticilerin yapısında bulunan hidrokarbonları parçalama yetisine sahiptir. İzolasyon kolaylığı, düşük maliyet ve doğal metabolizma çeşitliliklerine sahip olmaları gibi birçok yararlı özelliklerinden dolayı Çevre Biyoteknolojisi uygulamalarında önemli yere sahiptirler. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda mikroorganizmaların fenol, benzoat, eikosan, 2,4-diklorafenoksiasetik asit (2,4-D), poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) ve

ham petrolün yapısında bulunan çeşitli kirleticileri, uygun ortam şartlarında parçalayabildikleri keşfedilmiştir [Das ve Chandran, 2010].

Petrolün yapısında benzen, toluen, etilbenzen ve ksilen (BTEX) gibi hidrokarbonlar bulunmaktadır. BTEX bileşenleri ham petrolün %1-2'sini oluştururlar [Nicholson, 2005]. Petrol kompozisyonunda ki BTEX gibi karsinojenik ve toksik özellikleri bilinen bileşikler canlı ve çevre sağlığı için tehlikelidirler. Ayrıca BTEX bileşenleri yüksek su çözünürlüğüne sahip oldukları için yüzey ve yeraltı sularının hızlı kontaminasyonuna sebep olmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle, bilim insanlarının BTEX bileşenleri üzerinde artan bir ilgisi bulunmaktadır.

Petrol ve petrol türevlerinin endüstri, petrol üretimi, eczacılık, taşımacılık, hizmet sektörü, vb. alanlarda kullanımı sıklıkla mevcuttur. Petrol çeşitli sektörlerde değerlendirilmek üzere işlenirken, canlı ve çevre sağlığına zararlı önemli atıklar oluşmaktadır. Bu atıkların iyi bertaraf edilememesi önemli çevre sorunlarına yol açmaktadır. Pek çok ülkede endüstriyel atıklar ve evsel atık sular yeterince arıtılmadan ya da uygun olmayan yöntemlerle nehirlere, göllere ve denizlere deşarj edilmektedir. Özellikle de denizlerde meydana gelen gemi kazaları, gemilerin sintine deşarjları ve motorlu deniz araçlarından kaynaklanan petrol kirliliği denizel ekosistemi olumsuz etkilemektedir [Das ve Chandran, 2010].

Okyanus ve denizler organik ve inorganik atıklarla sıklıkla kontamine olmaktadır. Petrol hidrokarbonları bu kirlilik etmenlerinin başında gelmektedir. Çevreyi kirletici etmenlerin, mikroorganizmalar tarafından parçalanarak giderilmesi işlemi (biyodegradasyon) tuzcul alanlarda yüksek tuz konsantrasyonları sebebiyle her mikroorganizma ile yapılamamaktadır. Bu yüzden denizel ekosistemler gibi tuzcul çevrelerde oluşan, organik kirletici kontaminasyonlarının giderilmesi daha karmaşık ve zordur. Tuzcul alanların biyodegradasyonla iyileştirilmesinde gelişmiş degradasyon mekanizmasına sahip halofilik veya halotolerant mikroorganizmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmada, Türkiye denizlerinin çeşitli bölgelerinden ve Tuz Gölü'nden halofilik mikroorganizmalar izole edilmiştir. İzole edilen mikroorganizmaların 16S rDNA dizi analizi ile karakterizasyonları yapılmıştır. Tanımlanan mikroorganizmaların petrol hidrokarbonu olan benzen, toluen ve ksileni tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıp kullanmadıkları araştırılmıştır. Türkiye denizlerinden ve Tuz Gölü'nden elde edilen mikroorganizmaların BTX (benzen, toluen, ksilen) bileşenlerinin degradasyonu ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, tuzcul alanlarda ki petrol hidrokarbonu kontaminasyonlarının giderilmesi için biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilir organizmaların açığa çıkartılması hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Organik Kirleticilerin Biyolojik Olarak Parçalanması (Biyodegradasyon)

Mikroorganizmaların metabolik aktiviteleriyle organik kirleticileri tehlikesiz forma dönüştürmelerine biyodegradasyon denilmektedir. Biyodegradasyonda kirleticiler doğal yollarla, kontamine olmuş bölgeden uzaklaştırılmaktadır. Bu nedenle biyodegradasyon pek çok çevre bilimci ve mühendisin ilgi odağı olmuştur [Margesin ve Schinner, 2001].

Mikroorganizmalar, besin ve enerji ihtiyaçlarını karşılamak için sahip oldukları çeşitli metabolik aktiviteleri kullanmaktadırlar. Metabolik aktiviteler ve bu aktiviteler için gerekli olan enzimler organizmanın bulunduğu ortam şartlarına ve enerji kaynağı olarak kullanılacak molekülün çeşidine göre farklılıklar göstermektedir. Mikroorganizmalar, karbon ve enerji kaynağı olarak çeşitli organik maddeleri kullandıkları için Çevre Biyoteknolojisinde organik kirleticilerden kaynaklanan kirliliklerin giderilmesinde biyodegradasyon yöntemlerinde parçalayıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Çizelge 2.1'de Petrol hidrokarbonlarının biyodegradasyonunda kullanılan enzimler ve biyodegradasyon yapabilen bazı mikroorganizmalar gösterilmiştir.

Biyodegradasyonda biyolojik olarak parçalanabilen bileşikler, mikroorganizmanın hücre dışı enzimlerine bağlanıp hücre membranından geçerek, hücre içerisine taşınmaktadır. Hücre içerisinde bir seri dönüşüm reaksiyonları ile daha küçük ara ürünlere parçalanma gerçekleşir. Bu reaksiyonlar esnasında enerji açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan enerji hücrelerin çoğalmasında, onarılmasında, bileşiklerin hücreye taşınmasında ve hareket etmesinde kullanılmaktadır. Biyolojik parçalanmada organik bileşikler çoğunlukla CO₂ ve H₂O'ya dönüşse de, parçalanma her zaman karbondioksit ve su oluşumu ile sonuçlanmamaktadır. Biyoremediasyon sürecinde, kirlilik yaratan organik bileşiklerin moleküler yapısında oluşan değişiklikler sonucu farklı ürünler oluşabilmektedir [Onbaşılı, 2006].

Çizelge 2.1. Petrol hidrokarbonlarının biyodegradasyonunda kullanılan enzimler ve biyodegradasyon yapabilen bazı mikroorganizmalar [Das ve Chandran, 2011].

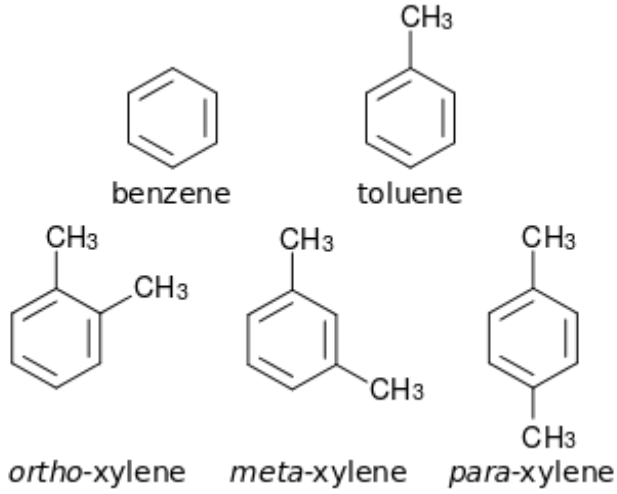
Enzimler	Substratlar	Mikroorganizmalar
Çözünebilir Metan Monooksijenazlar	C ₁ -C ₈ alkanlar alkenler ve sikloalkanlar	<i>Methylococcus</i>
		<i>Methylosinus</i>
		<i>Methylocystis</i>
		<i>Methylomonas</i>
		<i>Methylocella</i>
		[McDonald ve ark., 2006]
Granül Metan Monooksijenazlar	C ₁ -C ₅ alkanlar ve sikloalkanlar	<i>Methylobacter</i>
		<i>Methylococcus</i>
		<i>Methylocystis</i>
		[McDonald ve ark., 2006]
Alkan Hidroksilazlar	C ₅ -C ₁₆ alkanlar, yağ asitleri, alkil benzenleri, sikloalkanlar	<i>Pseudomonas</i>
		<i>Burkholderia</i>
		<i>Rhodococcus</i>
		<i>Mycobacterium</i>
		[Jan ve ark., 2003]
Ökaryotik P450	C ₁₀ -C ₁₆ alkanlar, yağ asitleri	<i>Candida maltosa</i>
		<i>Candida tropicalis</i>
		<i>Yarrowia lipolytica</i>
		[Iida ve ark.,2000]
Bakteriyel P450 oksijenaz sistemi	C ₅ -C ₁₆ alkanlar, sikloalkanlar	<i>Acitenobacter</i>
		<i>Caulobacter</i>
		<i>Mycobacterium</i>
		[Van Beilen ve ark.,2006]
Dioksijenler	C ₁₀ -C ₃₀ alkanlar	<i>Acinetobacter</i> sp.
		[Maeng ve ark.,1996]

2.2. BTX (Benzen, Toluen, Ksilen) Bileşenlerinin Biyodegradasyonu

Dünya üzerindeki geniş körfezler, okyanuslar ve suyolları çoktan petrol ürünleri ve zehirli kimyasal atıklarla kontamine olmuş durumdadır. Tahmini olarak 2 milyon tondan fazla ham petrol her yıl denizlere karışmaktadır. Denizlerde kirliliklere sebep olan atıkların yaklaşık yarısı endüstriyel atıklardır. Ayrıca denizlerde, lağımaların nehirlerle deşarjı yoluyla, tankersiz nakliyelerden kaynaklanan taşmalarla ve deniz tabanının altında olan petrol sızıntıları ile de kontaminasyonlar oluşmaktadır. [Leung ve ark., 2006].

Petrol çeşitli organik bileşiklerden oluşmaktadır. Petrolde bulunan hidrokarbonlar dört grupta incelenmektedir. Bunlar doymunlar, aromatikler, asfaltenler (fenoller, yağ asitleri, ketonlar, esterler ve porfirinler) ve reçinelerdir (pridinler, quinolinler, karbozoller, sulfoksitler ve amitler) [Das ve Chandran, 2011]. Rafine yakıtlar, ham petrolün rafinasyon işlemlerinden geçmesi sonucu elde edilmektedir. Ham petrol, bir dizi işlemde geçirilerek (örneğin yüksek sıcaklıkta yapılan katalitik işlemler), ham petrolden elde edilen benzin arttırılır. Rafine benzinler %16-25 alifatik, %35-55 sikloalkan, %10-20 aromatik hidrokarbonlar ve %15'den fazla yakıt oksijenatları (fuel oxygenates) içermektedir. Aromatik hidrokarbonlar %1-2 benzen, toluen, etil benzen ve ksilen (BTEX) içerir [Azetsu, 2009]. Şekil 2.1'de Benzen, toluen, orto, meta, para ksilen hidrokarbonlarının yapısal diyagramları gösterilmiştir.

Mikroorganizmalarla BTEX bileşenlerinin parçalandığı, ilk olarak 1900'lü yılların başında Gibson ve Subramanian tarafından fark edilmiştir [Gibson ve Subramanian, 1984]. Daha sonrasında, hangi mikroorganizmaların hangi şartlar altında BTEX degradasyonunu gerçekleştirebildiği hakkında çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Benzen, BTEX bileşenlerinin en önemli parçasıdır. Bu kirleticisi, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Birimi (United States Environmental Protection Agency) tarafından, yüksek kararlılıkta, suda çözünebilir ve insan karsinojeni olarak listelenmiştir [Nicholson, 2005].



Şekil 2.1. Benzen, toluen, orto, meta, para ksilen hidrokarbonlarının yapısal diyagramı [<http://en.wikipedia.org>]

BTEX bileşenleri yeraltı ve yer üstü su sistemlerinde çözünebilmektedir. Benzer olarak birçok yakıt oksijenatı, örneğin metil-terseyerbütileter (MTBE) yüksek oranlarda suda çözünmektedir ve yeraltı suyunun kalitesine de büyük olumsuz etkileri bulunmaktadır [Leung ve ark., 2006].

Hidrokarbonların mikrobiyal parçalanmadaki duyarlılıkları genellikle şöyle derecelendirilmektedir; düz alkanlar > dallanmış alkanlar > küçük aromatikler > halkasal alkenler [Ulciri, 2000; Perry, 1984]. Düşük moleküler ağırlıktaki hidrokarbonlar, degradasyon metabolizmasına sahip mikroorganizmalar tarafından kolaylıkla parçalanırlar da, yüksek moleküler ağırlıktaki polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi bazı bileşenler tamamen parçalanamamaktadır [Atlas ve Bragg, 2009].

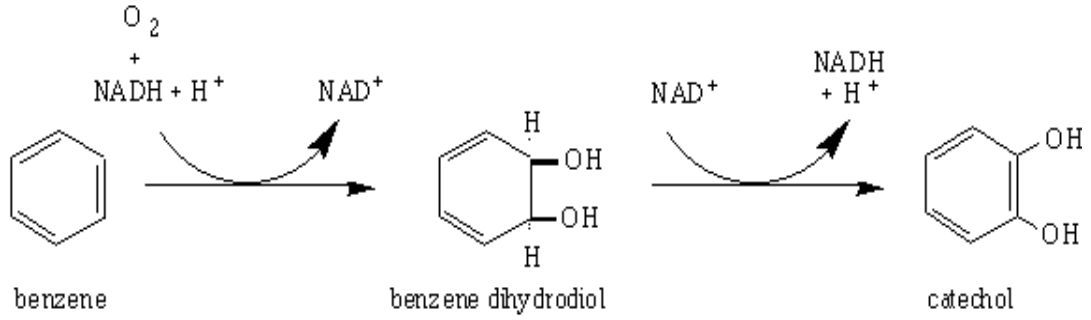
Çeşitli çevrelerde yaşayan organizmaların, aerobik [Gibson ve Subramanian, 1984; Ridgeway ve ark., 1990; Deeb ve Alvarez-Cohen, 1999] ve anaerobik [Lovely ve ark., 1996; Chen ve Taylor, 1997a; Gieg ve ark., 1999] şartlar altında BTEX parçalayabildikleri gösterilmiştir. Bu özellikleri psikrofilik [Bradley ve Chapelle, 1995; Braddock ve McCarthy, 1996; Margesin ve Schinner, 2001] ve termofilik şartlarda da [Chen ve Taylor, 1995; Chen ve Taylor, 1997a,b] gözlenmiştir. BTEX

degradasyonunun tuzcul [Brusa ve ark., 2001], asidofilik, alkalifilik ve barofilik şartlarda gerçekleştiğini kanıtlayan çok az veri bulunmaktadır [Nicholson, 2005].

2.2.1. BTEX bileşenlerinin aerobik biyodegradasyonu

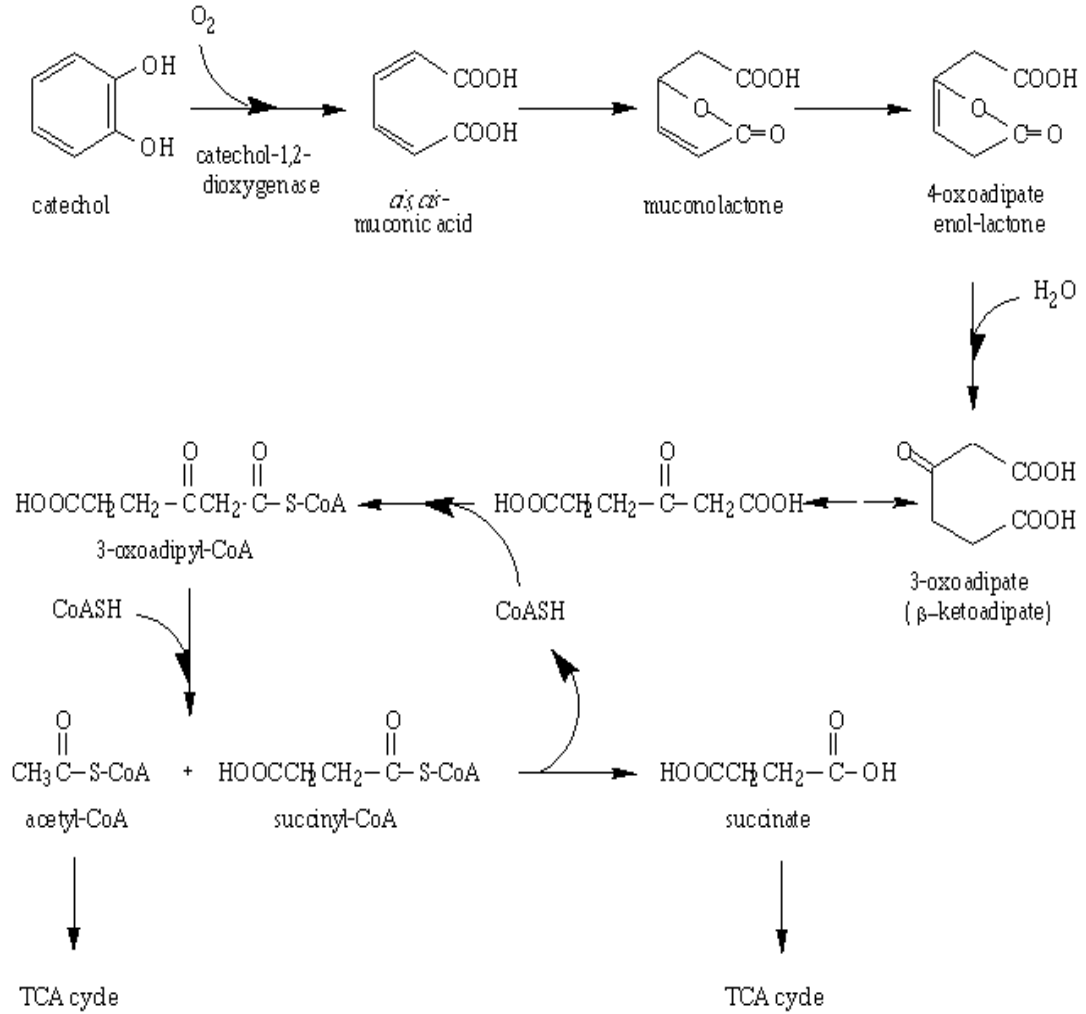
Doğada, pek çok bileşik tamamen parçalanmadan önce, ara bileşiklere dönüştürülmektedir. Yakıt atıklarının substrat olarak kullanılarak parçalanması, organizmalarda farklı yollarla gerçekleşmektedir. Dioksijenaz ve oksijenaz, organik bileşiklerin dönüşümü ve mineralizasyonu süresince aerobik mikroorganizmalar tarafından kullanılan iki temel enzimdir. İki enzim arasındaki fonksiyonel farklılık substrata katılan moleküler oksijenin atom sayısından kaynaklanmaktadır. Aromatik ve alifatik bileşiklerin ikisinde monooksijenaz tarafından substrat olarak kullanılabilir. Dioksijenaz tarafından kullanılan bileşikler ise sadece aromatik bileşiklerdir [Stoner, 1993; Onbaşılı, 2006].

Aromatik halkasal bileşenlerin ana ara ürünleri katekol ya da protokatekütir (protocatechuate) [Harwood ve Parales, 1996]. Katekol aerobik BTEX degradasyonunda en genel ara üründür. Katekol bakterilerde benzen, toluen ve ksilen monosiklik halkalarının başlangıç oksidasyonu ile oluşmaktadır. Şekil 2.2'de benzenin katekol oksidasyonu gösterilmiştir. Benzen halkasına dioksijenaz enzimi ile iki oksijen atomu katılır. Böylece cis-benzen dihidrodiol bileşiği oluşur. Cis-benzen dihidrodiol bileşiğide tekrar oksidasyona uğrayarak katekol ara ürününü oluşturur [Stoner ve ark., 1993]. BTEX bileşenleri katekole dönüşürken, önce siklik halka açılmaktadır ve açılan halka degradasyonun tamamlanması için küçük parçalara ayrılmaktadır [Dagley, 1975]. Bu oksidasyon orto-fizyon (hidroksil grupları arasında) ya da meta-fizyon (komşu hidroksil gruplarında) şeklinde olabilmektedir [Cerniglia, 1984].



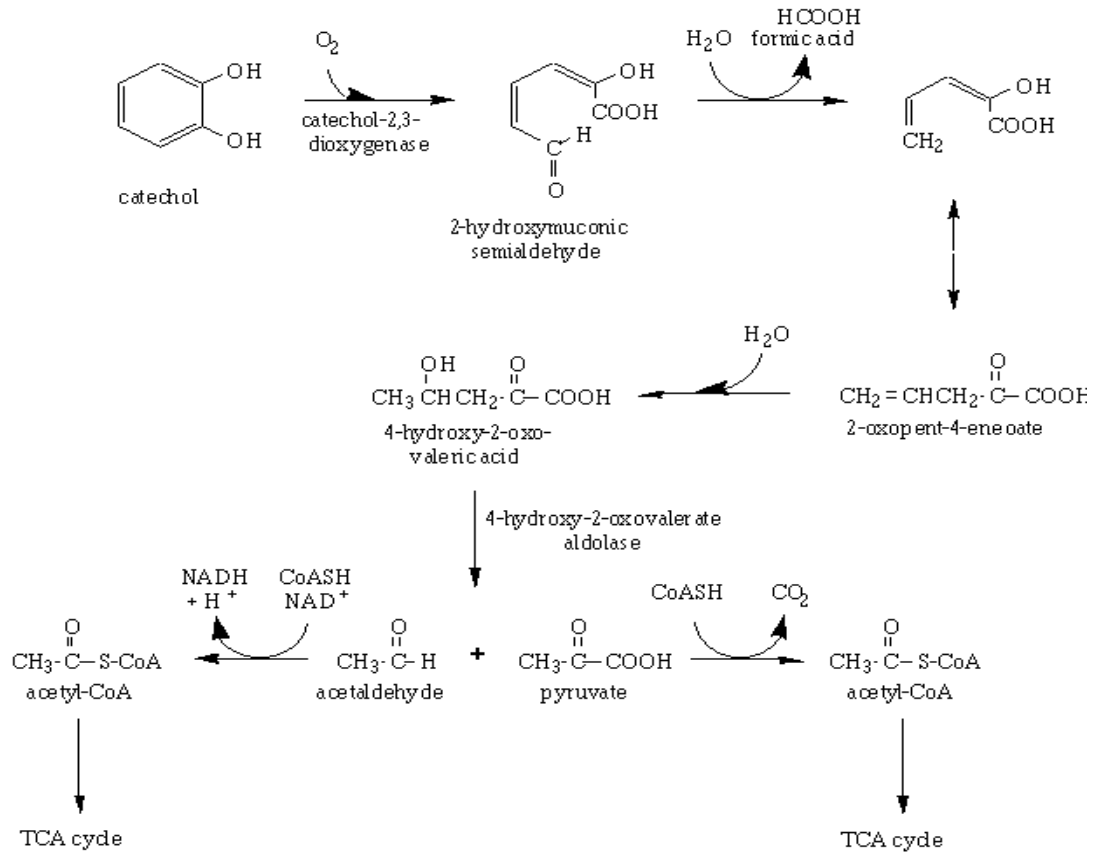
Şekil 2.2. Benzenin katekol oksidasyonu [Onbaşılı, 2006].

Katekolün orto-ayrılması Şekil 2.3’de gösterildiği gibidir. Katekolün orto-ayrılması katekol 1,2-dioksijenaz tarafından katalanmaktadır. Katekol 1,2-dioksijenaz enzimiyle oksijen atomu iki hidroksil grubu bağına katılmaktadır. β -oksidasyona katılan cis,cis-mukonik asit ile sitrik asit döngüsüne ürün olarak katılan Asetil CoA ve Süksinat CoA üretilmektedir. Katekol 2,3 dioksijenaz tarafından katalizlenmesiyle katekolün meta-ayrılması gerçekleşmektedir.



Şekil 2.3. Katekolün katabolizmasında orto- kırılması metabolik yolu [Onbaşılı, 2006].

Katekolün meta ayrılmasında ise oksijen bir hidroksil grubu ile ona komşu olan karbon arasındaki bağa katılmaktadır (Şekil 2.4). Sonunda asetaldehit ve pürivata ayrılan 2-hidroksimukonik semialdehit üretilmektedir [Bartilson ve Shinger, 1989]. Bu enzimler plazmit tarafından kodlanmış ya da kromozomal yapıda olabilmektedir. Bugüne kadar 2,3-dioksijenazı kodlayan üç plazmit bulunmuştur. Bunlar IncP-9 Tol plazmit pWWO'da ki *xyle* geni, INcP-9 NAH7 plazmiti *nahH* geni ve *Pseudomonas* sp. CF600'deki pVII150 plazmitinde bulunan *dmpB* genidir. Bu üç plazmit, nükleotit ve amino asit sekansı arasında yüksek derecede homoloji göstermektedir. 2,3-dioksijenaz genleri doğada oldukça yaygın bulunmaktadır [Brusa ve ark., 2001; Nicholson, 2005].



Şekil 2.4. Katekolün katabolizmasında meta-kırılması metabolik yolu [Onbaşılı, 2006].

Aerobik BTEX degradasyonu farklı organizma türleri tarafından gerçekleştirilebilir. *Moraxella* sp. [Högn ve Jaenicke, 1972], *Nocarida* sp., *Alcaligenes denitrificans*, *Micrococcus* sp. [Ridgeway ve ark., 1990], *Arthrobacter* sp. [Weber ve Corseuil, 1994], *Rhodococcus rhodochrous* [Deeb ve Alvarez-Cohen, 1999], *Thermus* sp. [Chen ve Taylor, 1997b] gibi türlerin aerobik BTEX degradasyonu yaptığı bilinmesine rağmen, en yüksek BTEX degradasyon etkinliği *Pseudomonas* türleri tarafından yapmaktadır. [Gibson ve ark., 1970; Zamanian ve Mason, 1987; Reardon ve ark., 2000; Brusa ve ark., 2001; Yu ve ark., 2001]. Ridgeway ve arkadaşları benzin ile kontamine olmuş sucul bir bölgedeki bakteriyel türlerin %86,9'unun *Pseudomonas* sp. olduğunu bularak *Pseudomonas*'ların parçalayıcı türler arasında baskın tür olduğunu desteklemişlerdir [Ridgeway ve ark., 1990]. Kumar ve arkadaşları *Pseudomonas putida* (MTCC1194) ile yapıları çalışmada suşların

özellikle üreme dönemlerinde aktif olarak 500 mg/L konsantrasyonunda ki BTX ara ürünü olan katekolü degrede edebildiğini tespit etmişlerdir [Kumar ve ark., 2005]. Benzer olarak Onbaşılı ve arkadaşlarının *Pseudomonas* sp. ile yaptığı çalışmada BTX bileşenlerinin biodegradasyonun da kullanılabileceğini desteklemiştir [Onbaşılı ve ark., 2011].

Petrol hidrokarbonlarıyla kontamine olmuş deniz ekosistemlerinde *Halomonas* ve *Halobacillus* genusuna ait mikroorganizmaların BTX bileşenlerini biyodegre edebildiklerini Mnif ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gösterilmişlerdir [Mnif ve ark., 2009].

2.2.2. BTX bileşenlerinin anaerobik biyodegradasyon

BTX bileşenlerinin anaerobik olarak parçalanmasında anaerobik mikroorganizmalar görev almaktadır. Aerobik parçalanmaya göre anaerobik parçalanma süreci daha yavaş hızdadır. Anaerobik şartlar altında gerçekleşen parçalanma BTEX ile kontamine olmuş yeraltı sedimentlerin temizlenmesinde önemli bir etmendir. Kontaminasyon alanı, kontaminasyon öncesinde aerobik olabilir; ancak degradasyon sırasında mikrobiyal solunum nedeniyle ortamdaki oksijen seviyesi düşer. Ortam anaerobik olduktan sonra anaerobik solunumla gerçekleşirken, bu süreç içerisinde BTEX biyodegradasyonu meydana gelmektedir [Nicholson, 2005].

Toluen, etilbenzen ve ksilenin anaerobik degradasyonu hakkında başarılı çalışmalar yapılmıştır [Morgan ve ark., 1993; Ball ve Reinhard, 1996; Chen ve Taylor, 1997a]. Anaerobik BTEX parçalanması halka indirgenmesi şeklinde ya da sudan gelen oksijen atomlarıyla oksidasyon ile gerçekleşmektedir [Vogel ve Grbi’c-Gali’c, 1986]. Benzoik asit, fenol ve kresoller gibi BTEX bileşeni olarak belirlenen pek çok oksitlenmiş ara ürün biyolojik olarak parçalanmaktadır [Vogel ve Grbi’c-Gali’c, 1986; Vogel ve Grbi’c-Gali’c, 1987; Caldwell ve Suflita, 2000; Nicholson 2005].

Anaerobik sürecin enerji bakımından en uygun olanı manganez indirgenmesidir. Manganez oksidasyonu, BTEX parçalanmasına bağlı olarak mikrobiyal azalma olan

yeraltı sularında gerçekleştiği bilinmektedir [Langenhoff ve ark., 1997]. Mn(IV) indirgeyici ortam şartlarında diğer alternatif elektron tutuculara göre daha hızlı BTEX parçalayabildiği tespit edilmiştir [Villatoro- Monzo ve ark., 2003].

Genellikle yeraltı sularında nitrat kontaminasyonu olmadığı sürece nitrat bulunmamaktadır. Nitrat suda çözünebilmekte ve yeraltı sularına kolaylıkla eklenerek hidrokarbon kontaminasyonunun biyoremidasyonunu güçlendirebilmektedir [Ball ve Reinhard, 1996; Anderson ve Lovely, 1997]. Daha önceki çalışmalarda BTEX'in diğer bileşenleri nitrat indirgenmesiyle ilişkilendirilmesine rağmen, benzenin giderilmesi nitrat indirgenmesiyle ilişkilendirilmemiştir [Dolfing ve ark., 1990; Evans ve ark. 1991; Rabus ve Widdel 1995]. Yapılan çalışmalarda, mikrobiyal benzen oksidasyonunun diğer elektron alıcılarının yokluğunda nitratın N₂'ye indirgenmesiyle eşleştiği öne sürülmüştür [Burland ve Edward, 1999].

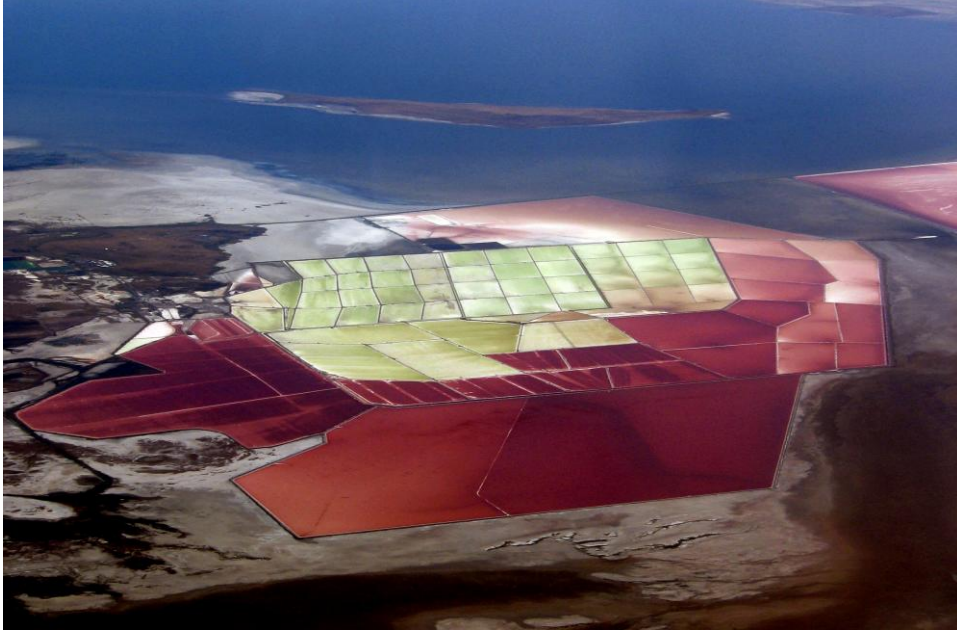
Fe (III) indirgeyici aktiviteli petrolle kontamine olmuş alanlarda, özellikle NTA (nitritotriasetik asit) ve EDTA (etilendiamintetraasetik asit) gibi Fe(III) çözebilen, elektron alıcısı ajanların eklenmesiyle BTEX parçalanmasının en etkili şekilde gerçekleştiği kanıtlanmıştır [Lovley ve ark., 1996; Lovley ve Woodward, 1996; Kazumi ve ark., 1997]. Petrol ile kontamine sucul alanlarda yapılan çalışmalar, Fe(III) indirgenen ortamlarda toluenin bir elektron kaynağı gibi çalıştığı ortaya çıkmıştır [Lovley ve Lonergan, 1990]. *Geobacter* sp.'nin., Fe(III) indirgenen ortam şartlarında benzoat ve tolueni okside edebilen tek kültür olduğu bilinmektedir [Coates ve ark., 1996; Nicholson, 2005].

Çeşitli alanlardan edinilen organizmalarda BTEX oksidasyonu ile sülfat redüksiyonu bağlantılı olduğu tespit edilmiştir [Lovley ve ark., 1995; Coates ve ark., 1996; Kazumi ve ark., 1997; Chen ve Taylor, 1997a; Anderson ve Lovely 2000]. Sülfat indirgeyici ortam şartlarında BTEX parçalanması, petrol kontaminasyonu olan sedimentte sülfat tamamen tükendiğinde, ortama sülfat eklenerek BTEX parçalanması sürdürülebilir [Anderson ve Lovley, 2000; Ball ve Reinhard, 1996; Nicholson, 2005].

2.3. Halofilik Çevreler

Halofilik çevreler, değişen konsantrasyonlarda tuz mineralleri içeren tuzcul alanlardır. Dünya üzerinde denizler, tuzlalar, tuz gölleri, solar tuzlalar, alkali soda gölleri, tuz mağaraları gibi pek çok halofilik alan bulunmaktadır. Halofilik çevreler, sodyum klorürün (NaCl) doyma noktasına yakın ya da doyma noktasına ulaştığı çevreler olan hipersalin bölgeleri kapsadığı gibi, NaCl doyma noktasından daha düşük seviyelerdeki ılımlı tuz konsantrasyonlarının olduğu alanları da kapsar. Halofilik ekosistemler organizmaların çeşitliliği ve habitattaki organizmaların metabolizma çeşitliliği açısından bilim insanlarının ilgisini çekmektedir [Mutlu, 2006] .

Hipersalin çevreler “Thalassohalin” ve “Athalassohalin” olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır. Thalassohalin çevreler deniz suyunun buharlaşmasıyla oluşmaktadırlar ve iyonik kompozisyonları deniz suyunun özelliklerine benzemektedir; Na^+ baskın katyon, Cl^- ana anyondur. Ayrıca deniz suları hafif alkali veya nötral pH'ya sahiptir. Hipersalin deniz lagünleri ve solar tuzla evaporasyon havuzları bu tip çevrelere örnek olarak gösterilebilir. Bununla beraber, deniz suyu sıcaklıkla buharlaşıp konsantre hale gelmeye başladığında, NaCl doyma noktasına ulaşmadan önce başka mineraller de presipitasyona başlamaktadırlar (örneğin, CaCO_3 (kalsit veya aragonit) ve $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (gypsum)). Bu nedenle deniz suyunun buharlaşması sırasında, iyonik kompozisyonunda değişimler meydana gelmektedir [Mutlu, 2006]. Utah'daki Büyük Tuz Gölü'nün su kompozisyonu deniz suyuna benzediği için Thalassohalin çevreye örnek olarak verilebilir (Resim 2.1) [Oren, 2002].



Resim 2.1. Büyük Tuz Gölü (Greath Salt Lake) , Amerika [<http://en.wikipedia.org/>]

Diğer birçok tuzlu su deniz suyundan oldukça farklı olan iyonik kompozisyona sahiptir ve bunlar Athalossohalin çevreler olarak adlandırılmaktadırlar. Alkalin soda gölleri yüksek konsantrasyonda karbonat/bikarbonat içermektedir ve pH değerleri 10-11 ya da daha fazla olabilmektedir. Örneğin, İsrail'deki Ölü Deniz hafif asidik bir göldür (Resim 2.2) ve divalent katyonlar (Mg^{+2} , Ca^{+2}), monovalent katyonlardan (Na^{+} , K^{+}) daha fazla bulunmaktadır. Bu habitatta klorid ve bromid baskın anyonlardır ve sülfat miktarı çok düşüktür. Dünyada başka birçok salin ve hipersalin Athalassohalin göller mevcuttur ve bunların iyonik kompozisyonları değişiklik göstermektedir [Oren, 2002; Mutlu, 2006].



Resim 2.2. Ölü Deniz (Death Sea), İsrail [<http://d30mmglg94tqnw.cloudfront.net>]

Solar tuzlalar olarak bilinen alanlar genellikle tropik ve subtropik bölgelerde bulunmaktadır. Solar tuzlalar, deniz suyundan halit (kaya tuzu) üretimi için yapılmış olan yapay ve sığ havuzlardır. Deniz suları, genellikle çoklu havuz sistemleri olarak kurulan havuzlara pompalanmaktadır. Havuzlarda buharlaşma ile belli bir tuz konsantrasyonuna ulaşan deniz suyu sırayla diğer havuzlara aktarılmaktadır. Her aşamada havuzdaki suyun tuzluluk konsantrasyonu yükselmektedir. En son havuzda, halitin çöktürüldüğü, kristalize NaCl ile doymuş tuzlu su elde edilmektedir. NaCl kristalleri (halit), total tuz konsantrasyonu 300 g/L üzerine çıktığında oluşmaktadır. Havuzlarda kalan tuzlu sular genellikle denize geri döndürülmektedirler ya da KCl veya diğer tuzların eldesi için işleme sokulmaktadır. Deniz suyundan halit saturasyonuna kadar tüm tuzluluk aralıklarını yansıtabildikleri için, çoklu havuzlu solar tuzlalar halofilik mikroorganizma çalışmaları açısından ilgi toplamaktadır. Halofilik mikroorganizma araştırmalarında bu havuzlar en kolay ulaşılabilir örnekleme alanları olarak değerlendirilmektedir [Oren, 1999; Oren 2002].

Alkalin hipersalin soda göllerine genellikle tropik ve subtropik kuşaklarda rastlanabilmektedir. Bu göllerde ki en dikkat çekici özellik yüksek tuzluluktan çok, su kompozisyonunun alkali olmasıdır. Çin ve Hindistan'daki soda gölleri, Mono Gölü

(Kaliforniya), Magadi Gölü (Kenya), Büyük Soda Gölü (Amerika) alkali hipersalin göllerin en önemli temsilcileri arasında bulunmaktadır [Oren, 2002].

Dünya üzerinde gerek kimyası bakımından gerekse biyolojisi bakımından çok dikkat çeken iki göl bulunmaktadır. Bunlar İsrail’de ki Ölü Deniz (Death Sea) ve Amerika’da ki Büyük Tuz Gölü’dür (Great Salt Lake). Büyük Tuz Gölü yaklaşık olarak 3900 km² yüz ölçümünde, 10 m derinliğinde, hafif bazik ve içerdiği tuzlar bakımından deniz suyu kompozisyonuna yakındır. Ölü Deniz 800 km² büyüklüğünde, 340 m derinliğinde, hafif asidik ve magnezyum tuzlarınca zengindir [Watzman, 1997]. Türkiye’nin en büyük ikinci gölü olan Tuz Gölü’de Türkiye’nin ve Dünya’nın önemli tuzcul alanlarındandır (Resim 2.3).



Resim 2.3. Tuz Gölü (Şereflikoçhisar) [<http://www.gokceadaliyiz.com>]

Ülkemizde denizler başta olmak üzere, Tuz Gölü (Aksaray-Konya), Çamaltı Tuzlası (İzmir), Acı Göl (Denizli), Seyfe Gölü (Kırşehir), Salda Gölü (Burdur), Tuzla Gölü (Kayseri), Bolluk Gölü (Konya) gibi önemli tuzcul alan temsilcileri bulunmaktadır. Bu halofilik bölgelerdeki biyolojik çeşitliliğin ortaya çıkartılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır [Özcan, 2004]. Yalçın çalışmasında Tuz Gölü’nden izole ettiği türlerin halofilik *Bacillus licheniformis* olduğunu bildirmiştir.[Yalçın, 2000]. Tuz Gölü, Kaldırım ve Kayacık tuzcul alanlarında yapılan araştırmalarda

Halobacteriaceae familyasına ait *Haloarcula*, *Halorubrum* ve *Halobacterium* arke türleri izole edilmiştir [Birbir ve Sesal, 2003; Birbir ve ark.2007; Mutlu, 2006]. İzmir Çamaltı Tuzlası'ndaki halofilik türlerin karakterizasyonu [Yavuztürk, 2005] ve azo tekstil boyalarının biyolojik olarak giderimiyle ilgili yapılmış çalışmalar bulunmaktadır [Demirci, 2009].

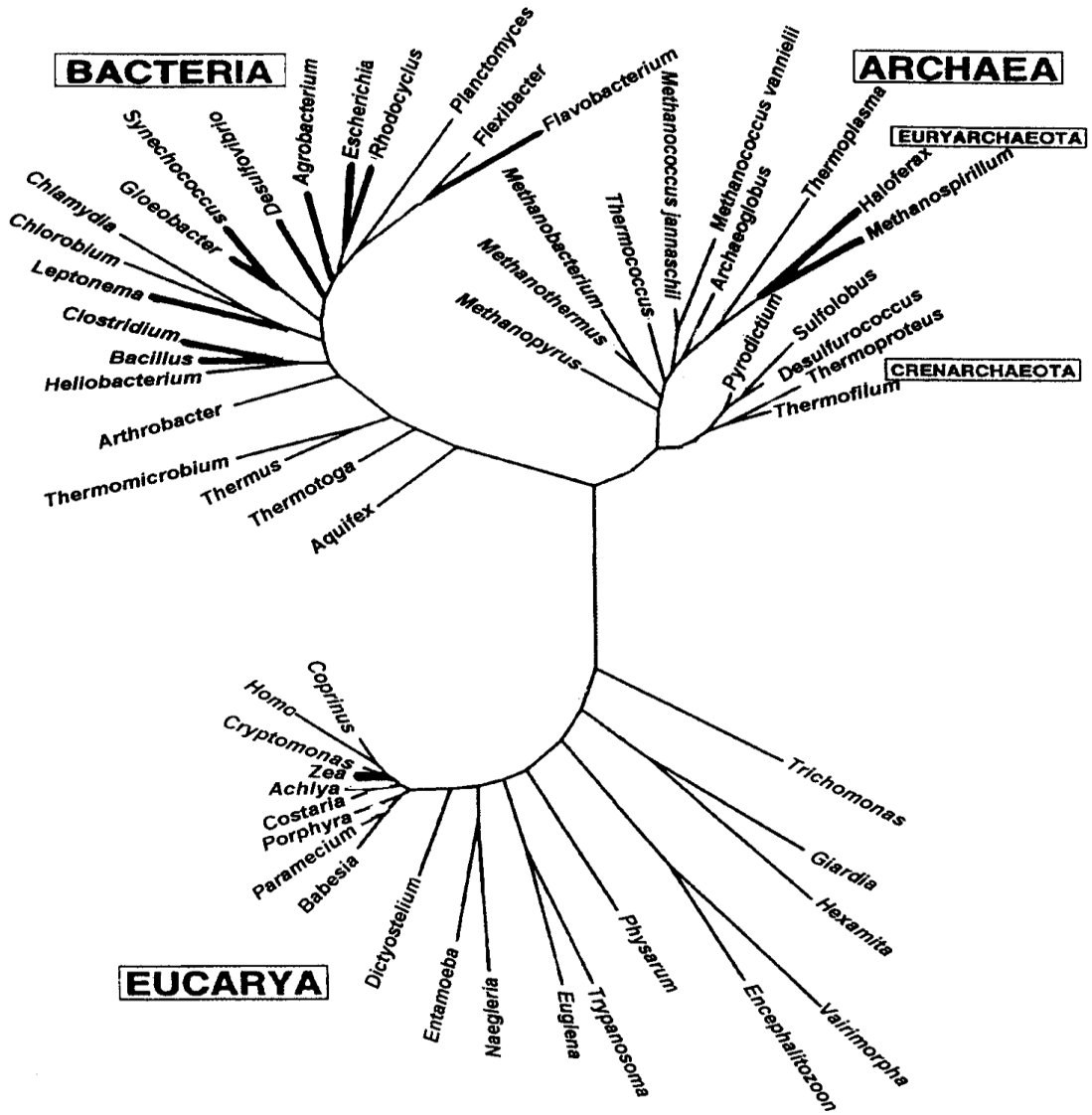
2.4. Halofilik Mikroorganizmalar

Halofilik organizmalar tuzcul habitatlarda yaşayan, yüksek tuz konsantrasyonunun oluşturduğu osmotik basıncı dengeleyebilen ve tuzun organizma üzerinde yaptığı olumsuz etkileri engelleyebilen prokaryotik ve ökaryotik organizmalardır. Halofilik çevre şartlarında yaşayabilen ve gelişmeleri için yüksek konsantrasyonlarda tuza (2-5 M NaCl) ihtiyaç duyan mikroorganizmalara "Halofilik Mikroorganizma" denilmektedir. Halofiller Dünya genelinde aşırı tuzlu ortamlarda, sıklıkla çok yoğun tuzlu suların bulunduğu kurak bölgelerde, denizlerin derin bölgelerinde, denizden tuz elde etmek için oluşturulmuş yapay tuzlalarda ve salamura besinlerde bulunmaktadır. Sahip oldukları özellikler ve geniş yaşam alanları, halofilleri biyoteknolojik olarak değerli kılmaktadır [Das Sarma ve Arora, 2001; Yavuztürk, 2005].

Her organizma düşük konsantrasyonlarda da olsa tuza ihtiyaç duymaktadır. Buna göre canlıları tuz ihtiyaçlarına göre beş gruba ayrılmaktadır [Kushner, 1985; Demirci, 2009]:

1. Gelişmek için %1'in altında NaCl ihtiyacı olan "Halofilik Olmayan" organizmalar.
2. Gelişmeleri için %1-3 arasında NaCl ihtiyacı olan "Hafif Halofilikler".
3. Gelişmeleri için %3-15 arasında NaCl ihtiyacı olan "İlımlı (Orta) Halofilikler".
4. Gelişmeleri için %15'den daha fazla NaCl ihtiyacı olan "Aşırı Halofilikler".
5. Tuzun varlığında ya da yokluğunda gelişebilen organizmalar "Halotolerant".

Pek çok organizma için ozmotik stres ölümcül olmasına rağmen, üç ana domainin de yüksek tuzluluğa adapte olmuş üyeleri mevcuttur [Madern ve ark., 2000]. Genel olarak tuzluluk arttıkça mikrobiyal çeşitlilik azalmaktadır [Benlloch ve ark., 2002]. arke türleri yüksek tuz konsantrasyonlarında yaygınlık gösterirken, halotolerant bakteriler ise orta derecede NaCl konsantrasyonlarında daha baskın oldukları belirlenmiştir. Halofilik organizmalar *Eucarya* domaininde *Archaea* ve *Bacteria* domainlerindeki kadar yaygın olarak bulunmamaktadır. Kültüre edilmiş aşırı tuzcul şartlarda yaşayan üç ana domaine ait mikroorganizmaların soy ağacı Şekil 2.5'de gösterilmiştir [Nicholson, 2005].



Şekil 2.5. %10 ve üzerindeki NaCl konsantrasyonlarında gelişebilen farklı domainlerdeki mikroorganizmaların filogenetik dağılımı [Oren, 2002].

2.4.1. Halofilik bakteriler

Halofilik bakteriler hem filogenetik hem de metabolik olarak geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Bu nedenle Dünya'nın farklı bölgelerinden ilginç halofilik bakteriler izole edilmektedir. Bu organizmalar yaşam alanlarındaki yüksek tuz konsantrasyonundan dolayı hücre duvarı yapısı, kapsül, flagella gibi yapılarında değişik adaptasyonlar geliştirmiştir.

Halofilik bakterilerin tuza bağlı olarak hücre zarındaki değişiklikler, fosfolipid tipleri düzeyinde ve lipitlerdeki yağ asitleri düzeyinde olduğu bildirilmiştir. Halofilik bakterilerin pek çok türünde majör polar lipitler fosfotidiletanolamin (PE) ve fosfotidilkolin (PC)'dir. Genellikle tuzluluk arttıkça negatif yüklü fosfolipitler (PC, Cl) nötral fosfolipitlerin konsantrasyon seviyelerine kadar artmaktadır [Oren, 2002]. Yüzey hidrofobitesinin hücre duvarı yapısı ve sitoplazmik membranın ortak bir fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Yüksek NaCl konsantrasyonların da yüklü fosfolipidlerin sayıca artışı, güçlendirilmiş hidrofilik eğilimden kaynaklanmaktadır. Hidrofilik hücre yüzeyi yüksek tuzluluktaki suyun az olduğu ortamlarda hücreyi su molekülü açısından daha çekici hale getirir ve bu sayede hücrenin su kaybetmesini önler [Mutlu, 2006].

Hücre içerisindeki gaz veziküllerine halofilik bakterilerde nadiren rastlanılmaktadır. 10-60 g/L NaCl'de gelişebilen hafif derecede halofilik olan *Ectothiorhodospira vacuolata* gaz vezikülü üretmesiyle karakterize edilmiştir. *Sporohalobacter lortetii* ve *Orenia sivashensis* gaz vezikülleri içermemektedir, fakat endospor oluşumu sırasında gaz vezikülleri sentezlenmektedir [Oren, 2002; Mutlu, 2006].

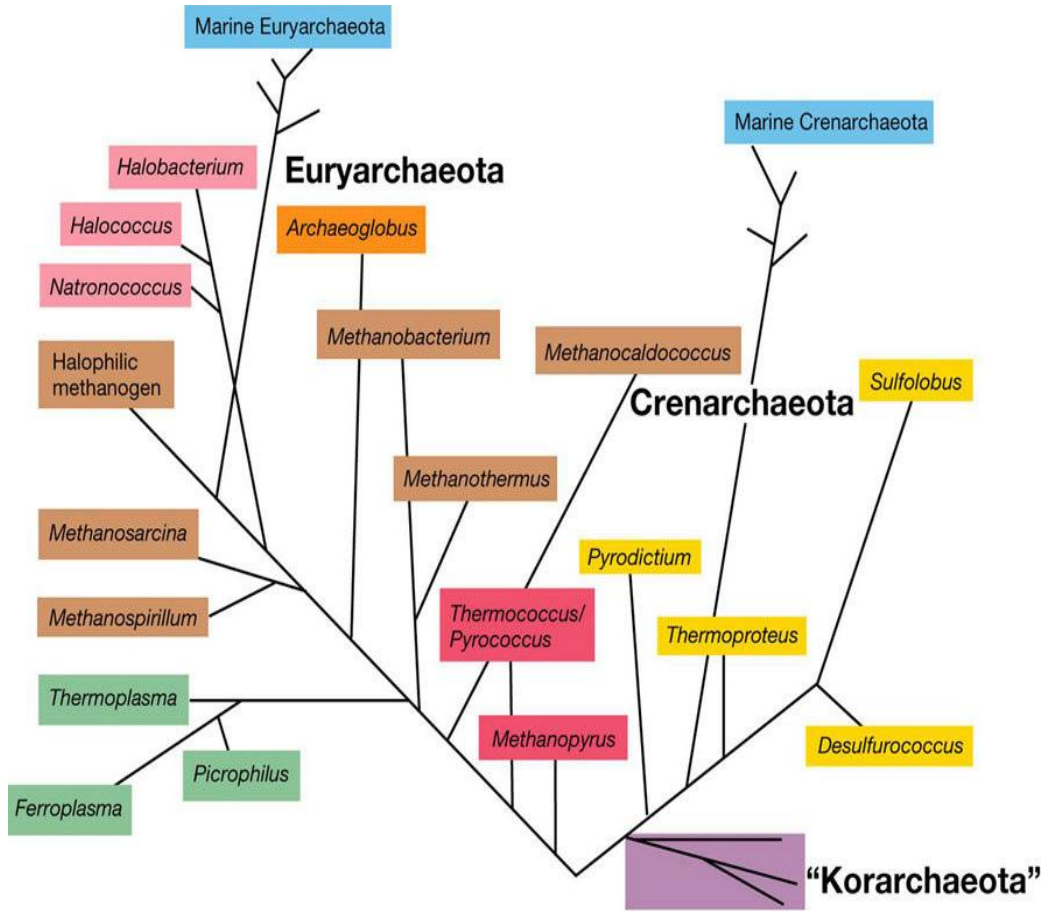
Bacteria domaini pek çok halofilik ve halotolerant mikroorganizmayı filogenetik alt gruplarda dağılmış olarak içermektedir. Proteobacteria'nın farklı kolları halofilik temsilciler içermektedir, çoğunlukla halofilik olmayan çok yakın akrabaları bulunmaktadır. Halofiller, siyanobakteriler (*Cyanobacteria*) arasında oldukça yaygındırlar; *Flavobacterium*'un *Cytophaga* dalı, spirocheteler ve actinomyceteslerde halofilik cinsler mevcuttur [Oren, 2000]. Gram pozitif

bakterilerin soyundan olan (Firmicutes) halofillerde, hem aerobikler (*Bacillus* ve benzer organizmalar) hem de anaerobikler bulunur. İki aile (familya) içeren Halanaerobiales ordosu tek anaerobik halofilik mikroorganizma içeren takımdır [Oren, 2001, Rainey ve ark., 1995]. *Bacteria* domaini *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus* ve *Vibrio*'ya ait bazı cinsler tamamen tuzcul çevrelerde yaşamaktadır. [Trüper ve ark., 1991; Nicholson, 2005]. Bakteriler daha çok halotolerant çevrelerde ya da orta seviyede tuzcul alanlarda baskın tür olsalar da, hipersalin alanlarda yaşayan *Salinabacter ruber* [Antôn ve ark., 2000], *Actinopolyspora halophila* ve yeni keşfedilen *Candidatus salinabacter* gibi aşırı tuzcul bakteri türleri de bulunmaktadır [Antôn ve ark., 2000; Antôn ve ark., 2001].

2.4.2. Halofilik arkeler

Archaea domaini, 1977 yılında Carl Woese ve Illinois Üniversitesi'nde ki meslektaşlarının bakterilerin ilişkileri hakkında yapılan çalışma esnasında ortaya çıkmıştır. Arke kingdomu Şekil 2.6'da gösterildiği gibi Euyarchaeota, Crenarchaeota ve Korarchaeota olmak üzere üç temel phylumdan oluşmaktadır. Arkeler genellikle bir mikrondan daha küçük canlılardır. Hücre formları bakterilere göre daha çok çeşitlilik göstermektedir. Kok, basil gibi tipik formların yanında ince saç teli gibi uzun, üçgen, kare formlarda da bulunabilirler. Hücre zarındaki temel lipitler gliserol dieterleri ve gliserol tetraeterleridir. Lipitler yağ asitleri içermezler. Arkeler lipitlerinde gliserol ile hidrofobik yan zincirler arasında eter bağları mevcuttur. Arkelerde ki sitoplazmik zarın her iki yüzeyi de hidrofilik, iç kısımları ise hidrofobik karakterdedir. Bu bakımdan bakteri ve ökaryot zarları ile aynı özellik göstermektedirler [Cavicchioli, 2007].

Bakterilerde hücre duvarı yapısında peptidoglikan tabaka varken, Arkelerde pseudopeptidoglikan, polisakkarit, protein ve S- tabaka vardır. Pseudopeptidoglikan tabakası N-asetilglukozamin ve N-asetiltalosaminuronikasit birimlerinden oluşur. Bakterilerdeki peptidoglikan bağlar arasında β -1,4 glikozidik bağlar varken pseudopeptidoglikan tabakada β -1,3 glikozidik bağlar bulunur [Cavicchioli, 2007].



Şekil 2.6. *Archaea* Kingdomu [Çoban, 2004]

Arkeler yüksek pH, aşırı tuzluluk, yüksek ya da düşük soğukluk, yüksek basınç gibi ekstrem şartlarda hayatta kalabilmeyi başaran organizmalardır. Bu nedenle hipersalin bölgelerde *Archaea* domainine ait türler kaşımıza daha çok çıkmaktadır. *Archaea* domaininin içerisinde yer alan, Euryarchaeota'ya ait olan Halobacteriaceae familyası *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Halobaculum*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natrialba*, *Natromonas* cinslerine ait olan halofilik karakterdeki *Archaea* türlerini barındırır. *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halobrum* ve *Halobacterium*' un türleri İspanya'daki tuzcul göllerden sıklıkla elde edilmektedir [Benlloch ve ark., 2001]. *Natrialba magadii*, *Halorubrum vaculoattum* ve *Natronococcus occultus* gibi alkalifilik halofilik arkeler Kenya Magadi Gölü'nde bulunmuştur [Grant ve ark., 1999; Nicholson, 2005]. Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise Tuz Gölü'nde *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum* ve

Halomicrobium cinslerine ait halofilik arke türleri izole edilmiştir [Mutlu, 2006]. Yapılan çalışmalarda *Haloarcula* cinsine ait türlerin Türkiye’de ki tuzcul alanlarda en yaygın olarak karşılaşılan tür olduğu bildirilmiştir [Birbir ve ark., 2007; Birbir ve Sesal, 2003].

2.4.3. Halofilik ökaryotlar

Eucarya domaininin halofillik temsilcileri diğer domainlere göre azdır. Buna rağmen hemen hemen her hipersaline çevrede bulunan ve bir yeşil alg olan *Dunalliella*, *Eucarya* domainine aittir. Bu alg Ölü Deniz’de ki ve diğer tuzcul göllerde ki ana ve tek primer üreticidir. *Dunaliella*’nın farklı türleri vardır ve bazıları uygun şartlarda yüksek miktarda β -karoten sentezlemektedir. *Dunaliella* gerçek bir halofilikten daha çok halotoleranttır; çoğu suşu farklı tuz konsantrasyonlarında gelişebilir. Tuzcul alanlarda makroorganizmalar da bulunmaktadır; tuzlu su karidesi *Artemia* bu tarz makroorganizmalara örnek olarak verilebilir [Oren, 2002].

İncelenen bütün omurgalıları arasında birkaç organizmanın aşırı tuzlu şartları ve çok yüksek tuzluluğu tolere edebilir. Yüksek tuzluluğu tolere edebilen omurgalıları örnek olarak *Tilapia* sp. (Talipya balığı) (1 mol/L NaCl) gösterilebilir. *Atriplex halimus* ve *Mesembryanthemum crystallinum* (buz çiçeği) gibi çeşitli zorunlu ve fakültatif halofilik bitkiler orta derecede tuzlu topraklarda yaşamaktadır. Ayrıca çok sayıda omurgasızın da aşırı tuzcul alanlarda yaşadıkları bilinmektedir. Örnek olarak *Keratella quadrata*, *Brachionus angularis*, *Macrostomum* sp., *Diacypis compacta*, *Robertsonia salsa*, *Cypridis torosa*, *Paracyprideinae* ssp., *Nitocra lacustris* *Reticypis herbsti* gösterilebilir. Böceklere örnek olarak da *Ephydra hians*, *E. gracillus* verilebilir. Maya ve diğer mantarlar kemoheterotrofik hücre duvarlı ökaryotlardır ve bazıları aşırı tuzlu ortamlara iyi adapte olmuşlardır. *Basipetospora halophila*, *Polypaecilum pisce* ve *Cladosporium glycolicum* halofilik fungilerdir. Denizlerden izole edilen *Debaromyces hansenii* ise aerobik, halotolerant mayalara örnek olarak verilebilir [DasSarma ve Arora, 2001].

2.5. Halofilik Mikroorganizmaların Osmotik Adaptasyonları

Her organizma yaşayabilmek için tuza ihtiyaç duyar, ancak halofilik organizmalar yüksek tuz konsantrasyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonları ise yüksek turgor basıncına neden olmaktadır. Mikroorganizma hangi ortamda yaşarsa yaşasın hücre sitoplazmasını dış çevre ile izotonik tutmak zorundadır. Halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar ortamdaki yüksek osmotik basınca karşı farklı adaptasyonlar geliştirmişlerdir. Bu adaptasyonlardan ilki hücre içi tuz konsantrasyonunun en az çevresiyle eşdeğer seviyede olmasını sağlamaktır. Hücre içerisinde K^+ , Na^+ veya Cl^- gibi inorganik iyonlar biriktirilerek osmotik denge sağlanmaya çalışılır [Oren, 2002]. Enerji bakımından bu yöntem daha verimlidir. Ancak halotolerant bakterilerde K^+ birikiminin üst limiti 400 mM'dır. Halofilik bakterilerde NaCl birikiminin üst sınırı, 5 M'dir. Bunun üstünde bir tuz konsantrasyonu bakterilerde ikincil cevabın gelişmesine neden olmaktadır [Nicholson, 2005]. İstisnai olarak halofilik arkelerin ve aşırı halofilik bakterilerin bazı türleri dış ortamdaki NaCl miktarıyla aynı oranda KCl biriktirdikleri bilinmektedir [DasSarma ve Arora, 2001].

Osmotik strese karşı gelişen adaptasyonlardan ikincisi ise hücre içerisinde osmotik çözünenlerin (compatible solute) biriktirilmesidir. Bu osmotik çözünenler hücre içinde kullanılabilir özellikte olan organik maddelerdir. Halofiller tarafından osmotik çözünen olarak biriktirilen maddelerden bazıları aminoasitler, glisin, betain, ektoin, sukroz, trehaloz ve gliseroldür [DasSarma ve Arora 2001]. Bu adaptasyonda kullanılmak üzere pek çok mikroorganizma sadece tek bir osmotik çözücü bulundurmaktansa bir farklı organik çözücülükleri bir arada bulundurmaya tercih etmektedir [Galinski, 1995]. Bu adaptasyon mikroorganizmaların birebir yüksek tuz konsantrasyonundaki çevreden korunmak için değil, hücrenin aniden değişen koşullara karşı geliştirdiği bir mekanizma olarak düşünülebilir. Osmotik çözücüyle osmotik basıncı ayarlama mekanizmasının her üç domainde de bulunduğu düşünülmektedir [Mutlu, 2006]. Hücre içerisinde hücrenin ihtiyacı olan organik molekülleri karşılamak için devam eden glisin betain katabolizması, osmotik basıncın artmasıyla bloke edilir, böylece organik çözünenlerin yıkımı engellenir ve

osmotik basınç dengelenir [Oren, 1999]. *Bacteria* domaininde en çok kullanılan organik çözücü glisin betain (özellikle fotosentetik prokaryotlar tarafından sentezlenir) ve ektoindir. *Archaea* domaininde osmotik çözücü olarak biriktirilen 2-sulfotrehalos gibi çözünenlerin kullanımı *Natronococcus occulutus*, *Natronobacterium gregoryi*, *Natrialba nagadii* ve *Natronomonas pharaonis* türlerinde ve tüm Halobacteriales üyelerinde belirlenmiştir [Oren, 2002].

2.6. Halofilik ve Halotolerant Mikroorganizmaların Organik Kirleticileri Biyodegradasyonu

Halofilik organizmaların metabolik çeşitliliği fenotipik çeşitlilikleri kadar gelişmiştir. Çoğu mikrobiyal işlem düşük tuz konsantrasyonlarından yüksek tuz konsantrasyonlarına değişik aralıklarda meydana gelebilir. Mikroorganizmanın primer ya da sekonder mekanizması, ortam şartlarına ve organizmanın gereksinimlerine göre şekillenmektedir. Biyodegradasyon ve biyoremidasyon uygulamalarında kullanılacak olan organizmalar bu özelliklere dikkat edilerek seçilmektedir. Yani tuzcul bir ortamdaki organik kirletici kontaminasyonlarının biyolojik olarak giderilmesinde, halofilik ya da halotolerant olmayan bir organizma yüksek tuzluluğun getirdiği osmotik strese, su ve besin azlığına cevap oluşturamayacağı için biyodegradasyon ve biyoremidasyon uygulamalarında kullanılamamaktadır. Bu gibi habitatlarda organik kirleticileri parçalama metabolizmasına sahip halofilik ve halotolerant organizmalar kullanılmaktadır [Margesin ve Schinner, 2001] .

Endüstriyel işlemlerin sonucu oluşan atık sular, petrol çalışmalarında oluşan atıklar, çeşitli nedenlerden kaynaklanan aromatik bileşenlerin doğaya sızıntıları denizel ekosistemler gibi tuzcul alanları olumsuz etkilemektedir. Denizel ekosistemlerde besin ve fosfor azlığı, tuzluluk oranları gibi sebepler degradasyon metabolizması olan mikroorganizmaların gelişimini kısıtlayıcı faktörlerdir. Buna rağmen sürekli olarak kontaminasyona maruz kalan bölgelerde degradasyon metabolizmasına sahip organizmaların kirletici unsurları karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yetisi arttığı gözlenmiştir [Bragg ve ark., 1994; Nicholson, 2005]. Düzenli olarak

kontaminasyona uğrayan tuzcul bölgelerden alınan örnekler, başka bir tuzcul alanın iyileştirilmesinde kullanılabilirler.

Bakterilerin çok yüksek tuzlulukta bile petrol hidrokarbonlarını parçalayabildikleri gösterilmiştir. Tunus'da ki açık deniz petrol sahasında yapılan çalışmada *Halomonas* sp. C2SS100 suşunun ham petrolü parçalayabildiği tespit edilmiştir [Mnif ve ark., 2009]. Arkeal, *Halobacterium* ve *Halococcus* cinslerine ait bazı türlerde petrol hidrokarbonlarını parçalayabildiği bildirilmiştir. [Al-Mailem ve ark., 2010].

Tuzcul çevrelerdeki organizmalardan *Pseudomonas* sp. ADP suşunun atrazini [Shapir ve ark., 1998], *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*'un eikozan [Fernandez-Linares ve ark., 1996], *Halomonas elongat*'ın 2,4-diklorofenoksatik asit [Maltseva ve ark., 1996], ve *Alteromonas*'a ait bazı suşların organofosfor bileşenlerini [DeFrank ve Cheng, 1991] içeren pek çok bileşiği parçalayabildiği bilinmektedir. Halofilik *Methylomicrobium* sp. %2-6 tuzlulukta trikloroetileni (TCE) okside edebilmektedir ve deniz kirliliklerinin giderilmesinde kullanılabileceği ifade edilmektedir [Fuse, 1998; Nicholson, 2005]. Aromatik bileşiklerle kontamine olmuş tuzcul çevrelerde halofilik bakterilerin katabolik rolünü Garcia ve arkadaşları tarafından araştırılmış ve *Halomonas* sp.'nin tuzlu fenolik atık suların temizlenmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir [Garcia ve ark., 2005a]. Lefebvre ve meslektaşları deri işleme atık suyunun biyolojik olarak temizlenmesi için halofilik mikroorganizmaları önermişlerdir [Lefebvre ve ark., 2005].

Yüksek tuzluluktaki çeşitli bölgelerden izole edilen *Haloferax volcanii*, *Halococcus morrhuae*, *Halobacterium salinarum* ve *Haloarcula marismortui* arke türleri p-hidroksibenzoik asiti (pHBA) biyodegrede edebilmektedir [Cuadros-Orellana ve ark., 2006]. *Halomonas* cinsine ait olan *Halomonas salina* ve *Halomonas halophila* benzoik asit, pHBA, fenol, ferulik asit ve p-aminosalisilik asit, salisilikasit fenilasetik asit gibi birçok organik kirleticiyi parçalayabilmektedir [Garcia ve ark., 2004c]. Ekstrem halofilik arke olan *Haloterrigena* sp.H13 suşu sahip olduğu metabolik ve genomik özelliklerinden dolayı 1,2-dikloroetan, naftalin, γ -heksakloroheksan, 1-/2-metilnaftalin ve benzoat degradasyonunda kullanılabileceği bildirilmektedir [Ding ve

Lai, 2010]. Uyuni (Bolivya), Şili ve Kabo Rojo (Porto Riko), Sabkhas (Suudi Arabistan) ve Ölü Deniz (İsrail)'den izole edilen 10 Haloarchaea suşu ile yapılan çalışmada, izole edilen suşların %20 NaCl konsantrasyonunda benzoik asit, pHBA ve salisilik asit (her birinden 1,5 mM) ile polisiklik aromatik hidrokarbonlar, naftalin, anthracen, fenantheren, piren ve benzo[a]anthrasen (her biri 0,3mM) maddelerinden oluşan karışımı degrede edebildiği gösterilmiştir [Bonfa ve ark., 2011]. Ayrıca *Halobacterium salinarium*'un izopropil alkol'ü (IPA) parçalayan enzimlere sahip olduğu bildirilmektedir [Ha ve ark., 2007].

Tekstil azo boyaalarının *Halomonas* cinsine ait bazı türlerin biyodegradasyonu sonucu giderilebildiği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir [Asad ve ark., 2007]. Başka bir çalışmada ise benzer olarak, kimyasal atık içeren kıyı sedimentlerinden izole edilen *Halomonas* sp. suşunun optimal 30 °C' de pH 6,5-8,5 arasında ve %10-20 (v/v) tuz konsantrasyonunda, farklı azo boyaalarını 24 saat içinde %90'ın üzerinde biyolojik olarak uzaklaştırdığını göstermişlerdir [Guo ve ark., 2008].

2.6.1. Halofilik mikroorganizmaların BTX biyodegradasyonu

BTX bileşiklerini degrede edebilecek metabolizma ve enzimlere sahip olan mikroorganizmalar, bu bileşenleri daha kolay kullanabilecekleri çeşitli bileşiklere dönüştürürler. Tuzcul alanlarda oluşan BTX kontaminasyonlarının giderilmesi için halofilik ya da halotolerant mikroorganizma faaliyetlerine ihtiyaç bulunmaktadır. Özellikle açık deniz petrol arama sahaları, gemi kazaları, tanker sızıntıları, kentsel ve endüstriyel atıkların denize kontrolsüz deşarjı gibi sebeplerle petrol ve petrol hidrokarbonları (BTX) ile kontaminasyona en çok maruz kalan deniz sistemlerinde bu kirleticileri elemine edecek, ortam şartlarından etkilenmeyecek mikroorganizmaların belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Monosiklik aromatik hidrokarbon olan BTX bileşenlerinin degradasyonu ile ilgili yapılan çalışmada yüksek tuz konsantrasyonlarında *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ve *Marinobacter* sp.'nin benzen, toluen ve ksilen üzerinde gelişebilirken, *Marinobacter vinifirmus* tolueni tek karbon ve enerji kaynağı olarak

kullanabildiğini bildirilmiştir [Berlendis ve ark., 2010]. Ekstrem halofilik bakteri olan *Arhodomonas* sp. seminole suşu ve *Arhodomonas* sp. rozal suşunun benzen ve tolueni yüksek tuzlulukta (0,5-4 M NaCl) karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığı bilinmektedir [Dalvi ve ark., 2012]. Yine Doğu Çin Deniz’inde yapılan bir çalışmada *Marinobacter*, *Prolixibacter*, *Balneola*, *Zunongwangia*, *Halobacillus* cinsleri kullanılarak BTX bileşenlerinden, 120 mg/L tolueni 5 günde degrades edildikleri bildirilmiştir [Li ve ark., 2012]. Chennai gemi limanından (Hindistan) alınan deniz suyundan izole edilen halotolerant *Ochrobacterum* sp., *Enterobacter cloacea* ve *Stenotrophomonas maltophilia* bakteriler ile yapılan çalışmada, 60 g/L NaCl konsantrasyonunda 4 gün içerisinde %74 oranında polisiklik aromatik bileşenleri parçalayabildiği gösterilmiştir [Arulazhagan ve ark., 2010].

Halofilik arkelerin BTX bileşenlerini parçalaması hakkında çok kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Bir çalışmada, Kandla (Hindistan) hipersalin bölgesinden izole edilen ve %25 NaCl konsantrasyonunda gelişen *Halobacterium* sp. SP1, *Haloarcula* sp. SP2 ve *Haloferax* sp. SP1 arkeleri ile organik çözücülere (toluen, ksilen, n-dekan, n-dodekan, n-undekan) toleransı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda ise *Halobacterium* sp. SP1’in *Haloarcula* sp. SP2 ve *Haloferax* sp. SP1’e göre organik çözücülere daha toleranslı olduğu bulunmuştur [Akolkar ve ark., 2008].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada, Türkiye’de bulunan çeşitli halofilik alanlardan alınan örnekler kullanılmıştır. Numune alımında sıvı-katı yakıt atıkları ile kontamine olmuş denizler ve sulak bölgeler seçilmiştir. Kaleiçi Yat Limanı (Antalya-Akdeniz), Patara Sahili (Antalya-Akdeniz), İzmir Limanı (İzmir-Ege Denizi), Ayvalık Yat Limanı (Balıkesir- Ege Denizi), Avcılar vapur iskelesi civarı (İstanbul- Marmara Denizi), Silivri Limanı (İstanbul-Marmara Denizi), Eminönü-Galata Köprüsü civarı (İstanbul-Marmara Denizi), Gebze Limanı (Kocaeli- Marmara Denizi), Amasra Limanı (Bartın- Karadeniz), Trabzon Limanı (Trabzon-Karadeniz) ve Tuz Gölü’nden (Şereflikoçhisar-Sulak Alan) örnekleme yapılmıştır. Her numune en az 500 mL olmak üzere koyu renk şişelere alınmıştır.

3.1.1. Numunelerin tuz konsantrasyonu ve pH’larının belirlenmesi

Çalışmada kullanılmak üzere Türkiye’nin farklı bölgelerinde ki denizlerden ve Tuz Gölü’nden alınan su örneklerinin içerdikleri NaCl oranına benzer oranda besiyortamı hazırlanabilmesi için, NaCl oranı Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nde alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresi (VARIAN marka, AA240FS model) kullanılarak belirlenmiştir. Farklı bölgelerden alınan su numunelerinin pH değerleri, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji laboratuvarında Metler Toledo marka pH metre kullanılarak ölçülmüştür.

3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri

Çalışmada, izole edilen mikroorganizmaların buldukları numunelerdeki tuz konsantrasyonlarının eşdeğeri tuzlulukta besiyerleri kullanılmıştır. Besiyerlerinin katı formunun hazırlanmasında besiyerine %1,5 Agar (Merck) eklenilmiştir. Numunelerin alındığı ortamdaki pH ölçülmüş ve bu ölçüm sonucunda belirlenen pH

aralığına uygun pH, 3 M HCl ve/veya 3 M NaOH ile ayarlanarak, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilizasyonu yapılmıştır.

Çalışmada Medyum A, Medyum C, P1, %20 Sea Water (SW) ve %25 Sea water (SW) besiyerleri izolasyon sırasında, Medyum A, Medyum C, %20 Sea Water (SW) ve %25 Sea water (SW) besiyerleri biyokimyasal deneylerde kullanılırken, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIK) değerlerinin belirlenmesinde Medyum A ve Medyum C besiyerleri kullanılmıştır. Mineral Salt Medium (MSM) ise biyodegradasyon yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Medyum A

NaCl	250 g
KCl	5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5 g
NH ₄ Cl	5 g
Yeast Ekstrakt	10 g
Distile Su	1 L
[Oren, 1999]	

Medyum C

NaCl	175 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	20 g
K ₂ SO ₄	5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Distile Su	1 L
[Oren, 1999]	

P1 Besiyeri

NaCl	40 g
NH ₄ Cl	3 g
Fenol	0,800 g
K ₂ HPO ₄	0,640 g
Yeast Ekstrakt	0,500 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,200 g
KH ₂ PO ₄	0,160 g
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,050 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,010 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,003 g
Distile su	1 L

[Munoz ve ark., 2001]

%20 Sea Water (SW)

NaBr	0,520 g
HnaCO ₃	0,134 g
KCl	4,000g
CaCl ₂	0,5780 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	39,594 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	27,654 g
NaCl	156 g
Distile su	1 L

[Rodríguez-Valera, 1985]

%25 Sea Water (SW)

NaBr	0,650 g
HnaCO ₃	0,167 g
KCl	5,000 g
CaCl ₂	0,723 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	49,492 g
NaCl	195 g
Distile su	1 L

[Rodríguez-Valera, 1985]

Mineral Salt Medium (MSM)

NaCl	200 g
MgCl ₂	0,50 g
KH ₂ PO ₄	0,45 g
K ₂ HPO ₄	0,90 g
NH ₄ Cl	0,30 g
KCl	0,30 g
Distile Su	1 L

[Nicholson, 2005]

3.2. Metot**3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu ve muhafazası**

Farklı yerlerden alınan su örnekleri ışık ve ısıdan uzak tutularak en kısa sürede Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarına getirilmiştir. Steril kabin içerisinde, steril 250 mL'lik erlenlere, içerisinde steril 110 mm por çaplı Whatmann No 1 (Schleicher&Schuell) kağıdı konulan cam huniler yerleştirilmiştir. Su örneği içerisinde bulunan makromolekülleri uzaklaştırmak amacıyla 1 mL su örneği, Whatmann kağıdından süzdürülerek erlende toplanmıştır [Elçin ve ark., 2004]. Numunenin alındığı ortamdaki suyun tuz konsantrasyonuna uygun tuz içeren ve numunenin alındığı suyun pH'sına uygun pH'sı olan 50 mL izolasyon besiyerleri

hazırlanmıştır. 1 mL su örneği ile 50 mL besiyeri karıştırılarak 30 °C ve 37 °C’ lerde inkübasyona bırakılmıştır. 5-14 gün inkübasyon sonunda oluşan tek koloniler alınarak ardışık çizgi ekimlerle saf kültürler haline getirilmiştir. Saf kültürler %15’lik gliserol stokları (cryo tüp) içerisinde -80°C’ de ve liyofilize formda muhafaza edilmiştir [Mutlu, 2006].

3.2.2. 16S rDNA dizi analizi

Moleküler çalışmalar ve DNA dizi analizleri Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde (MOBAM) yapılmıştır.

DNA izolasyonu

Uygun sıvı besiyerine aktarılan tek kolonilerin iki kez aktifleştirilmiş kültürleri kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürler %0,875 NaCl içeren 5 mL Serum Fizyolojik (SF) içerisinde iki kez yıkanmıştır. İzolatların DNA’sı Genomic DNA purification kit (Fermentas) ile izole edilmiştir. DNA’ların saflık ve miktar tayini Epoch Take3 Plate (Biotek) cihazında (A_{260}/A_{280}) ölçümleri yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

DNA izolasyonu yapılmış olan izolatların 16S rRNA bölgesine özgü primerler kullanılarak, 16S rDNA bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bölge; halofilik bakteriler için 1492 bp uzunluğunda iken halofilik arkeler için 1500 bp uzunluğundadır (Çizelge 3.1). Saflığı (OD 260/280) 1,54–2,17 arasında değişen DNA’lardan, DNA miktarı 100 ng/μL olacak şekilde PZR (Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems) yapılmıştır. PZR ürünleri elektroforez ile görüntülemeye alınmış hemen çalışılmayacak örnekler -20°C’ye kaldırılmıştır.

İzole edilen DNA’lardan kalıp DNA olarak 2 μL alınarak PZR karışımına eklenmiştir. Ayrıca bu karışıma 10X PZR tamponu (300 mM Tris-HCl pH 9,0), 300

mM K⁺ ve NH₄ tuzları), 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 0,5 µM ileri ve geri primeri, Taq DNA polimeraz ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Bu reaksiyonda kullanılan malzemelerin konsantrasyon ve miktarları Çizelge 3.2’ de verilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94°C’ de 4 dakika bekletildikten sonra, her bir döngü sırasıyla 95°C’ de 30 saniye, 55°C’ de 30 saniye ve 72°C’de 30 saniye olacak şekilde, 35 döngü çalışılmıştır. Son olarak örnekler 72°C de 10 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır. PZR reaksiyonunun gerçekleştirildiği program Çizelge 3.3’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Primer sekansları, optimal bağlanma sıcaklıkları ve hedeflenen bölgeler

Primerler	Dizi	Tm Sıcaklığı	Çoğaltılan Bölge
A 109- F	5’ – ACKGCTCAGTAACACGT - 3’	55 °C	1500 bp ^a
Univ-1492R	5’ – GGTTACCTTGTTACGACT - 3’		
Univ-27F	5’ – AGAGTTTGATCMTGGCTCA - 3’	56 °C	1492 bp ^b
Univ-1492R	5’ – GGTTACCTTGTTACGACTT - 3’		

a: Arke örneklerinin tanımlanmasında kullanılan primerler

b: Bakteri örneklerinin tanımlanmasında kullanılan primerler

Çizelge 3.2. PZR reaksiyonunda kullanılan malzemelerin konsantrasyon ve miktarları

PZR Reaksiyonu	Reaksiyonda Kullanılan Miktar
Kalıp DNA	100 ng
10X PZR tamponu	5 µL
25 mM MgCl ₂	5 µL
10 mM dNTP (her biri 2,5 mM)	5 µL
0,5 µM ileri primeri (F)	2,5 µL
0,5 µM geri primeri (R)	2,5 µL
Taq DNA Polimeraz (5 u/ µL)	0,25 µL
Toplam hacim	50 µL

Çizelge 3.3. PZR reaksiyonunun gerçekleştirildiği program

PZR Programı	Süre
94 °C (ön denatürasyon)	4 dakika
95 °C (denatürasyon)	30 saniye
55 °C (bağlanma)	30 saniye
72 °C (uzama)	30 saniye
72 °C (final uzama)	10 dakika

Çalışmada negatif kontrol olarak PZR karışımına genomik DNA yerine su konularak çalışılmıştır.

PZR ürünlerinin elektroforezi

PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde, 1xTAE (Tris Asetat) tamponu kullanılarak yürütülmüştür. Jeller Bio Spectrum Imaging System, Model 310 (UVP) cihazı ile görüntülenmiş ve bantlar fotoğraflanmıştır.

DNA dizi analizi

Sekans analizi Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (MOBAM), genetik analizatör (Genetic Analyzer 3130 - Applied Biosystems) cihazı ile yapılmıştır. Analiz sonuçları Blast fonksiyonu ile NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası'nda taranarak moleküler tanımlama yapılmıştır.

3.2.3. Mikroorganizmaların aktifleştirilmesi ve geliştirilmesi

Çalışmada, izolasyon yapılabilen Medyum A ve Medyum C besiyerleri kullanılmıştır. İzolatlar, izole edildiği uygun besiyeri ve sıcaklıkta inkübe edilmişlerdir. Deniz kaynaklı izolatlar Medyum C besiyerinde geliştirilirken, Tuz Gölü kaynaklı izolatlar Medyum A besiyerinde geliştirilmiştir.

3.2.4. Morfolojik ve biyokimyasal testler

Gram boyama

Halofilik mikroorganizmalar Gram boyama için, lam üzerine alınmış ve %2'lik asetik asit ile 5 dakika muamele edilerek lama tespit edilmiştir. %0,25'lik kristal viyole ile 3 dakika, lugol ile 1 dakika, alkol ile 10 saniye ve safranin ile 1 dakika boyanmıştır. Ara yıkama aşamaları %20'lik NaCl çözeltisi kullanılarak yapılmıştır [Mutlu, 2006]. Boyama sonrası ışık mikroskopunda koyu mor (menekşe) renkli görünen mikroorganizmalar Gram (+), açık pembe renkli görünen mikroorganizmalar ise Gram (-) olarak belirlenmişlerdir.

NaCl' de gelişme

Suşların gelişmelerinde ihtiyaçları olan NaCl konsantrasyonunun belirlenmesi için %0, %5, %8, %10, %15, %20, %25 ve %30'luk NaCl içeren besiyerine ekilmiştir ve uygun sıcaklıkta 5-14 gün inkübasyon sonrasında gelişme durumları incelenmiştir [Anton ve ark., 2002].

Farklı sıcaklık derecelerinde gelişme

Suşlar, %20 SW agar ve %25 SW agar besiyerine ekildikten sonra 25°C, 30°C, 37°C, 45°C ve 55°C'lik etüvlerde inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası her suşun farklı sıcaklıklardaki gelişme durumu belirlenmiştir [Anton ve ark., 2002].

pH direncinin belirlenmesi

Suşlar pH'sı 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 10'a ayarlanan %20 SW ve %25 SW besiyerlerine inoküle edildikten sonra 5-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında her suşun farklı pH'larda ki gelişme durumu değerlendirilmiştir [Mutlu, 2006].

Kazein hidrolizi

Bu test, sütün proteinini oluşturan ve koloidal karakterde bulunan kazeinin, bakterilerce sentezlenen, proteolitik ve ekstrasellüler bir enzim olan proteaz tarafından hidrolize edilebilme yeteneklerini belirlemek için yapılmıştır. Bu çalışmada, Tomlinson ve Hochstein'in kazein hidrolizi deneyi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. %0,15 oranındaki Skim Milk Powder (Merck) 121°C'de 5 dakika ayrı steril edilmiş ve agar besiyerleri 121°C'de 15 dakika sterilizasyon sonrasında 50°C'ye kadar soğuduğunda aseptik koşullarda her iki besiyeri birleştirilmiştir. Skim Milk Powder içeren Medyum A agar ve Medyum C agar besiyerlerine suşlar inoküle edilerek inkübasyona bırakılmıştır. 5-14 gün inkübasyon sonrasında %1 HCl kullanılarak kazein hidrolizi belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve negatif kontrol olarak *Escherichia coli* ATTC 11229 bakterilerinin taze kültürleri kullanılmıştır [Tomlinson ve Hochstein, 1976; Özcan 2004].

Jelatin hidrolizi

Jelatin bir proteindir. Diğer proteinler gibi, proteolitik enzimlerle daha küçük molekül ağırlıklı peptitlere hidrolize edilebilmektedir. Jelatinin bu özelliğinden yararlanılarak, mikroorganizmaların proteolitik enzimlerin varlığını araştırmada kullanılmaktadır Bu test mikroorganizmaların jelatini hidrolize eden jelatinaz enziminin sentezleme yeteneklerini ölçmek için yapılmıştır [Elçin ve ark., 2004]. Jelatin hidrolizi, %10 jelatin içeren Medyum A ve Medyum C agar kullanılarak test edilmiştir. Jelatin hidrolizini değerlendirmek için jelatinli besiyerleri 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve petrilere dağıtılmıştır. Agar üzerine nokta halinde inoküle edilen izolatlar, optimum sıcaklıkta 5-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kolonilerin etrafında görülen şeffaf zonlar jelatin pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve negatif kontrol olarak *Aeromonas* sp. I06 bakterilerinin taze kültürleri kullanılmıştır [Gonzales ve ark.1978; Yavuztürk 2005].

Tween 80 hidrolizi

Mikroorganizmaların lipolitik aktivitesini belirlemek amacıyla Tween 80 hidrolizi testi yapılmıştır. Bu amaçla % 0,1 Tween 80 içeren Medyum A ve Medyum C katı besiyeri 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir ve petrilere dağıtılmıştır. Agar üzerine nokta halinde inoküle edilen izolatlar, optimum sıcaklıkta 5-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kolonilerin etrafında görülen şeffaf zonlar Tween 80 hidrolizi pozitif olarak değerlendirilmiştir [Yavuztürk, 2005].

Nişasta hidrolizi

Homopolisakkarit olan nişastanın, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ekstrasellüler bir enzim olan amilaz tarafından hidrolizini ortaya koymak amacıyla bu test yapılmıştır. Nişasta hidrolizi, %1 oranında çözünür nişasta içeren Medyum A agar ve Medyum C agar besiyerleri 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Suşlar agar üzerine küme halinde inoküle edilmiştir. 5-14 gün inkübasyon sonrasında Lugol ayırıcı kullanarak nişasta hidrolizi yapanlar ayırt edilmiştir. Etraflarında şeffaf beyaz zon oluşturanlar nişasta hidrolizi pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *B. subtilis* ATCC 6633 ve negatif kontrol olarak *E.coli* ATCC 11229 bakterilerinin taze kültürleri kullanılmıştır [Özcan, 2004].

Nitratin nitrite indirgenmesi ve gaz oluşumunun saptanması

Bazı mikroorganizmalar nitrati nitrite redükte ederek nitrite ve daha ileri reaksiyonlara amonyak ve nitrojen gazına ayrıştırırlar (denitrifikasyon). Mikroorganizmaların türlerini ayırt etmede sıklıkla kullanılan bir testtir. Nitratin ayrışması sonucu oluşan ürünler mikroorganizmaların karakterine göre değişebilmektedir. Bu reaksiyonlar sonucu, nitrojen gazı, nitrik oksit (NO), nitroz oksit (N₂O), hidrokilamin gibi hücre içinde metabolize edilerek nükleik asit ve proteinlerin yapımında kullanılan maddeler teşekkül etmektedir. Nitratin nitrite indirgenmesi ve gaz oluşumunun gözlenmesi için içerisinde %1 oranında KNO₃ içeren Medyum A ve Medyum C sıvı besiyerleri 5'er mL kapaklı cam deney

tüplerine dağıtılmıştır. Cam tüplerin içerisine gaz oluşumunun var olup olmadığını gözlemek için içinde hava kalmayacak şekilde Durham tüpleri konulmuştur. 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra izolatlar besiyerlerine inoküle edilmiştir. 5 ve 14 günlük kültürler %1 sülfanilik asitten 3 damla ve %0,6 α -naftol'den 2 damla eklenerek ortamdaki nitritin varlığı test edilmiştir. Kırmızı-pembe renk pozitif nitrat redüksiyonu olarak kabul edilmiştir. Durham tüplerinde hava birikiminin olup olmadığı takip edilmiştir [Tomlinson ve Hochstein, 1976; Özcan, 2004].

İndol testi

Kültürlerin triptofanı enzimatik olarak hidrolize uğratarak indol, pirüvik asit ve amonyak oluşturup oluşturmadığını anlamak için yapılmıştır. İçerisinde %1 triptofan bulunan Medyum A ve Medyum C sıvı besiyerleri kapaklı cam tüplere 5'er mL dökülmüştür. Besiyerleri 121°C'de 15 dakika steril edilerek inkübasyona bırakılmıştır. 10 günlük inkübasyon sonrasında besiyerine 3-5 damla Kovaks ayırıcı damlatılmıştır. Kovaks ayırıcı ile muamele sonrasında kırmızı- pembe renk indol pozitif kabul edilirken, altın sarısı renk indol negatif kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 11229 bakteri kültürü kullanılmıştır [Rodriguez-valera ve ark., 1983; Özcan, 2004].

Oksidaz testi

Oksidaz testi, sitokrom C oksidaz enzimine sahip olan mikroorganizmaların ayırt edilmesinde kullanılan bir testtir [Temiz, 1994]. Bu amaçla Medyum A ve Medyum C besiyerinde geliştirilmiş olan kültürlerden, tek kullanımlık plastik öze ile alınan örnek %1 tetrametil-p-fenilendiamin ayırıcı ile ıslatılmış kurutma kâğıdına sürtülmüştür. Oksidaz pozitif olanlar koyu mavi-mor renge dönüşmüştür. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 11229 bakterilerinin taze kültürleri kullanılmıştır [Gonzalez ve ark., 1978; Özcan, 2004].

Katalaz testi

Katalaz aerobik mikroorganizmaların karbonhidrat metabolizmasının bir ürünü olan ve biriktiğinde bakteri hücresi için toksik etkiye sahip olan hidrojen peroksidi (H_2O_2) oksijen ve suya parçalayan hemoprotein yapısında bir enzimdir. Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen katalaz (hidrojen peroksit oksiredüktaz) enzimini belirlemek amacıyla yapılan bir testtir. Katalaz testinde Medyum A ve Medyum C agar üzerinde gelişen kolonilerin üzerine %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisinden birkaç damla damlatıldığında gaz kabarcığı oluşturanlar katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 bakteri kültürü kullanılmıştır [Yavuztürk, 2005] .

DNaz aktivitesi testi

DNA'yı hidrolize eden bir ekzoenzim olan deoksiribonükleazı üretebilen mikroorganizmaların belirlenmesi için DNaz aktivite testi yapılmaktadır. Bu amaçla DNaz agar besiyerine izolatların geliştiği uygun tuz konsantrasyonlarında NaCl ilave edilmiştir. Hazırlanan modifiye besiyeri 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve petrilere aktarılmıştır. Kültürler besiyerine ekilmiştir. 48 saat sonunda 1 M HCl ile muamele edilmiştir. Koloni çevresinde berrak alan gözlenmesi DNaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 bakterisi kullanılmıştır [Tamer ve ark., 1989; <http://www.austincc.edu>].

Üreaz testi

Üreaz besiyerindeki tek karbon kaynağı üredir. Üreyi kullanabilen mikroorganizmalar gelişimleri sırasında amonyak oluşturarak ortamın alkali olmasına böylece renk reaksiyonunun gerçekleşmesine neden olmaktadır [Cook, 1948]. Üreaz testi için izolatların geliştiği uygun tuz konsantrasyonlarında NaCl ile 2,4 g üre agar base 90 mL distile suda çözülmüş, kaynatılmış ve 115°C'de 20 dakika steril edilmiştir. %2'lik üre çözeltisinden 10 mL hazırlanıp membran filtreden geçirilerek steril edilmiş ve modifiye edilmiş besiyerine eklenmiştir. Besiyerleri steril

cam tüplere aktarılmıştır. Kültürler öze ile tüpün içerisine ekilmiştir. 5-14 gün optimum sıcaklıkta inkübasyon sonrasında kırmızı- pembe renk olan tüpler üre pozitif, renk değişikliği olmayanlar üre negatif kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Sporosarcina pasteurii* DSM 33 ve negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 11229 bakterilerinin taze kültürleri kullanılmıştır [Tamer ve ark.1989; Yavuztürk 2005].

Triple Sugar Iron Agar Testi

Mikroorganizmalar farklı karbonhidratları metabolize ederek organik asitleri (asetik asit, laktik asit vb.) ve karbondioksit, hidrojen gibi bazı gazları oluşturmaktadır. Karbonhidratların parçalanmaları sonucu asit oluşumu, besiyerine ilave edilen pH indikatörlü boyaların renk değişimiyle saptanmaktadır. Suşların farklı şekerleri karbon kaynağı olarak kullanma, karbondioksit ve hidrojen gazı oluşturma durumlarını belirlemek için 65 g Triple Sugar Iron (TSI) 300 mL distile su içerisinde eklenmiş ve ısıtılarak eritilmiştir. TSI agar besiyerine uygun oranlarda NaCl eklenmiş ve distile su ile 1 L' ye tamamlanmıştır. Modifiye edilmiş besiyeri 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra steril cam tüplere 7'şer mL dağıtılmıştır ve yatık şekilde donmaları sağlanmıştır. Hazırlanmış besiyeri ekim yapılmadan önce berrak kırmızı renktedir. Tüplere kültürlerden ekim yapılmış ve uygun sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. 10 gün inkübasyon sonrasında tüpün dibinde siyah partiküllerin oluşması H₂S üretimi pozitif, tüpün dibinde gaz kabarcıklarının olması gaz üretimi pozitif olarak kabul edilmiştir. Şeker kullanımları için renk değişikliklerine bakılmış ve aşağıda verildiği şekilde yorumlanmıştır.

- Yatık agarın üst ve alt kısımları alkali (kırmızı renk) ise laktoz, sükroz ve glikoz negatif kabul edilmiştir.
- Yatık yüzeyin üst kısmı asidik (sarı renk), üst kısmı alkali (kırmızı renk) ise laktoz ve sükroz negatif, glikoz pozitif kabul edilmiştir.
- Yatık yüzeyin üst ve alt kısımları asidik (sarı renk) ise laktoz ve/veya sükroz, glikoz pozitif kabul edilmiştir [<http://web.inonu.edu.tr>].

3.2.5. Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Suşların farklı antibiyotiklere karşı hassasiyetlerinin ortaya konması amacıyla uygun besiyerlerine kültürlerin yayma ekimleri yapıldıktan sonra agar yüzeyine paraleli olarak mikroorganizmaların hücre duvar yapısını inhibe eden vankomisin (30 µg), penisilin-G (10 U), basitrasin (10 U), ampisilin (10 µg), seftriakson (30 µg), protein sentezini inhibe eden tetrasiklin (30 µg), neomisin (10 µg), eritromisin (15 µg), kloramfenikol (30 µg) ve genetik materyal üzerine etki eden novabiosin (30 µg) diskleri konularak uygun sıcaklıklarda 5-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında antibiyotik disklerin etrafındaki inhibisyon zonlarının çapları kompas aleti ile ölçülerek mm cinsinden belirlenmiştir [Oren, 1999; Anton, 2002]. İnkübasyon zonlarının çap uzunluklarına göre antibiyotiğe duyarlı ya da dirençli olarak belirtilmiştir [Stan-Lotter, 2002; Birbir ve ark., 2003].

3.2.6. BTX bileşenlerinin suşlar üzerine minimum inhibisyon konsantrasyonunu (MIK) belirlenmesi

BTX bileşenlerinin mikroorganizma üzerinde gelişimini engelleyen en düşük konsantrasyonuna Minimum İnkübasyon Konsantrasyonu (MIK) olarak değerlendirilmiştir. Araştırmada kullanılan halofilik izolatların üzerinde BTX bileşenlerinin benzen (C₆H₆, Merck), toluen (C₆H₅-CH₃, Merck), ksilen (C₆H₄(CH₃), Merck) (%1-5 (v/v)) minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri, 250 mL'lik erlenler içerisinde ki 50 mL'lik uygun besiyerinde, optimum sıcaklıkta, 5-14 günlük inkübasyon sonrasında belirlenmiştir. Buna göre farklı konsantrasyonlardaki (%1-5 v/v) organik bileşenler uygun (Medyum A ve Medyum C) besiyerine ilave edilmiştir. Aktifleştirilmiş izolatlardan 0,1 mL alınarak, içerisinde farklı konsantrasyonlarda organik bileşikler olan 50 mL uygun besiyerlerine inoküle edilmiştir. Kontrol olarak da organik bileşenleri içermeyen 0,1 mL bakteri kültürü ekilmiş Medyum A ve Medyum C besiyerleri kullanılmıştır. Mikroorganizma kültürü inoküle edilmiş kontrol ve organik bileşikli besiyerleri uygun sıcaklıklarda 5-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerde bakteriyel gelişiminin inhibe edildiği en düşük konsantrasyonlar (MIK) belirlenmiştir [Onbaşılı, 2006].

3.2.7. İzole edilen halofilik mikroorganizmaların BTX (benzen, toluene, ksilen) bileşenlerini biyodegradasyonu

BTX bileşenlerinin biyodegradasyonu deneyinde Mineral Salt Medium (MSM) kullanılmıştır. 250 mL'lik erlenlere 50'şer mL dağıtılan steril MSM besiyerine, uygun konsantrasyondaki BTX bileşenleri (%1-3 v/v) 0,45 µm por çaplı selüloz nitrat membran filtreden (Milipore) geçirilerek ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan biyodegradasyon ortamında, uygun besiyerinde aktiveleştirilen kültürlerden %2 (v/v) olacak şekilde ekilmiştir. İki farklı kontrol hazırlanmıştır. Bu kontrollerden biri Medyum A veya Medyum C+mikroorganizma, diğeri MSM besiyerine+mikroorganizma şeklindedir. Kontrol grupları ve deney grupları optimum sıcaklıkta 5-14 gün inkübe edilmiştir. Körv olarak, MSM besiyerine organik kirleticiler eklenerek hazırlanan ortam kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan suşların petrol hidrokarbonlarını tek enerji ve karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadığı, mikroplate okuyucuda (BIOTEK marka Epoch model Eliza Reader) OD_{600nm}'de belirlenmiştir. Kontrol grubundaki gelişim göz önünde tutularak kültürlerin gelişimleri değerlendirilmiştir. Suşların karbon kaynağı olarak BTX bileşenlerini içeren MSM besiyerinde gelişmeleri, bu bileşenleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıp kullanılmadığı yönünde yorumlanmıştır [Nicholson, 2005; Onbaşılı, 2006]. Elde edilen OD değerleri kontrol grubu (Medyum A veya Medyum C) ile karşılaştırılarak farklı BTX konsantrasyonlarının suşlar üzerindeki yüzde canlılık değerleri hesaplanmıştır.

$$\%Canlılık = \text{Final OD} / \text{Kontrol OD} \times 100$$

3.2.8. İstatiksel analizler

Tüm çalışmalarda üç farklı paralelin ortalama sonuçları verilmiştir. Farklı BTX konsantrasyonlarının suşların optikal yoğunlukları üzerinde nasıl bir etkisi olduğunu ortaya koymak amacıyla SPSS 16.0 (Statistical Packagez for the Social Sciences, Chicago, IL) bilgisayar programı ile regrasyon analizi uygulanmıştır.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada örnekleme yapılan Antalya, İzmir, İstanbul, Trabzon ve Ankara yörelerinden izolasyon yapılırken, Kocaeli ve Balıkesir yörelerinden izolasyon yapılamamıştır (Resim 4.1). Suşların kodu, izole edildiği yerler ve izolasyon tarihleri Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.



Resim 4.1. İzole edilen suşların kodu ve alındığı bölgeler.

Çizelge 4.1. İzolatların kodları, kaynakları ve izole edildikleri tarihler.

Çalışılan İzolatın Kodu	İzole Edildiği Yer	Tarih
NB2	Kaleiçi Yat Limanı (Antalya)	08/02/2012
NB5	Avcılar vapur iskelesi civarı (İstanbul)	16/11/2011
NB7	Silivri Limanı (İstanbul)	28/03/2012
NB8	Silivri Limanı (İstanbul)	28/03/2012
NB9	Silivri Limanı (İstanbul)	28/03/2012
NB10	Eminönü-Galata Köprüsü Civarı (İstanbul)	02/03/2012
NB11	Trabzon Limanı (Trabzon)	11/04/2012
NB13	İzmir Limanı (İzmir)	22/05/2012
NB20	Tuz Gölü (Şereflikoçhisar)	28/05/2012
NB21	Tuz Gölü (Şereflikoçhisar)	28/05/2012
NB22	Tuz Gölü (Şereflikoçhisar)	28/05/2012
NB28	Tuz Gölü (Şereflikoçhisar)	24/06/2012

4.2. Örneklerin Toplam NaCl Değerlerinin Belirlenmesi

Çeşitli bölgelerden alınan numunelerin içerdiği tuz konsantrasyonları Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Yapılan tuzluluk tahlili sonucunda Trabzon Liman deniz suyunun %1,6, İstanbul İl’inin çevresindeki deniz suyunun %2,3, İzmir Limanı deniz suyunun %3,1, Antalya Liman deniz suyunun %3,3 ve Tuz Gölü göl suyunun %31 oranında NaCl içerdiği belirlenmiştir. Elde edilen değerler içerisinde en az tuzluluk Trabzon’dan alınan deniz suyu numunesinde tespit edilirken, Dünya’da Ölü Deniz’den (Death Sea, İsrail) sonra en tuzlu göl olarak bilinen Tuz Gölü’nün ise örnekleme yapılan alanlar içerisinde en yüksek tuzluluk değerine sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2. Numunenin alındığı bölge ve içerdiği tuz konsantrasyonu.

Numunenin Alındığı Bölge	NaCl (g/L)
Trabzon Limanı (Trabzon)	16,15
Eminönü- Galata Köprüsü civarı (İstanbul)	22,26
Avcılar vapur iskelesi civarı (İstanbul)	23,12
Silivri Limanı (İstanbul)	24,29
İzmir Limanı (İzmir)	31,41
Kaleiçi Yat Limanı (Antalya)	33,18
Tuz Gölü (Şereflikoçhisar)	308, 04

4.3. Halofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı halofilik bölgelerinden temin edilen su örneklerinden Medyum A, Medyum C, P1, %20 SW ve %25 SW besiyerlerine ekim yapılmıştır. Medyum A ve Medyum C besiyerlerinden izolasyon yapılırken, diğer besiyerlerinden izolasyon yapılamamıştır. Denizlerden alınan örneklerden Medyum C besiyerinden, Tuz Gölü'nden alınan örneklerden ise Medyum A besiyerinden izolasyon yapılabilmektedir. Denizlerden izole edilen izolatlar (NB2, NB5, NB7, NB8, NB9, NB10, NB11 ve NB13), Tuz Gölü'nden (NB20, NB21, NB22 ve NB28) elde edilenlere göre daha kısa inkübasyon süresine sahip oldukları görülmüştür. İzolatların koloni morfolojileri, pigment oluşturmaları göz önüne alınarak ilk seçimleri yapılmıştır. Yuvarlak, konveks, düzgün ve pigment üreten koloniler seçilerek çalışmalarda kullanılmak üzere muhafazaya alınmıştır. İzolatların hangi besiyerinden izole edildikleri, uygun gelişme sıcaklıkları, pH ve inkübasyon süreleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. İzolatların kodu, izole edildikleri besiyerleri, optimum gelişme sıcaklığı ve optimum gelişme pH'sı.

İzolatın Kodu	İzole Edildiği Besiyeri	Optimum Gelişme Sıcaklığı (°C)	Optimum Gelişme pH'sı	İzolatın İnkübasyon Süresi (gün)
NB2	Medyum C	30	7,36	5
NB5	Medyum C	30	8,41	7
NB7	Medyum C	37	8,41	7
NB8	Medyum C	37	8,41	7
NB9	Medyum C	30	8,41	7
NB10	Medyum C	37	8,41	7
NB11	Medyum C	37	8,28	7
NB13	Medyum C	37	7,36	5
NB20	Medyum A	37	7,20	14
NB21	Medyum A	37	7,20	14
NB22	Medyum A	37	7,20	14
NB28	Medyum A	37	7,15	14

4.4. 16S rDNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (MOBAM), genetik analizatör (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystems) cihazı ile yapılmıştır. Saflığı (OD 260/280) 1,54–2,17 arasında değişen DNA'lardan yapılan (Çizelge 4.4) dizi analizi sonuçları Blast (Basic Local Alignment Search Tool) programı ile değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları blast fonksiyonu ile NCBI (National Center for Biotechnology Information) DNA Gen Bankası'nda taranarak moleküler tanımlama yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

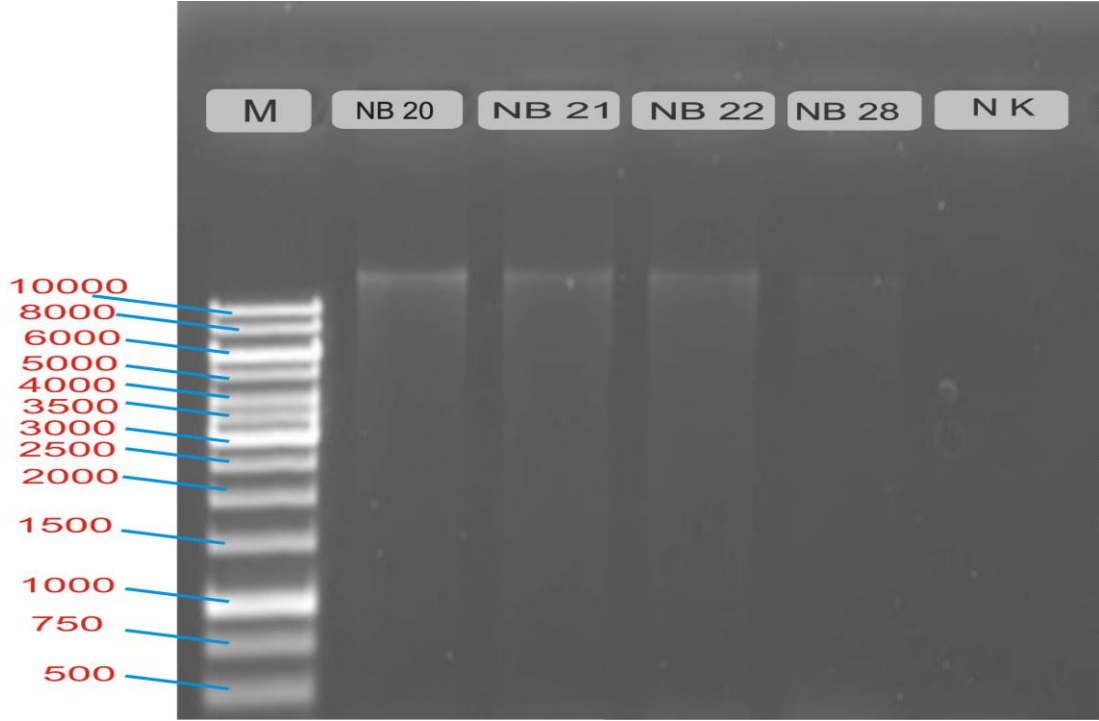
İzole edilen 12 adet suştan bazıları halofilik bakteri, bazıları ise halofilik arke olarak tanımlanmıştır. Blast sonuçlarına göre halofilik bakteri olanlardan NB2 kodlu suş *Halomonas aquamarina*, NB5, NB7, NB8, NB9, NB10, NB11 kodlu suşlar *Halobacillus trueperi*, NB13 kodlu suş *Thalassobacillus devorans* olarak

tanımlanmıştır. Halofilik arke olan NB20, NB21 ve NB28 kodlu suşlar *Halobacterium salinarium*, NB22 kodlu suş ise *Halobacterium halobium* olarak tanımlanmıştır. Resim 4.2’de halofilik arke olarak tanımlanan NB20, NB21, NB22 ve NB28 suşlarının jel elektroforez görüntüsü gösterilmiştir. *Halobacillus trueperi* NB5 suşunun ışık mikroskobu görüntüsü ise Resim 4.3’de verilmiştir.

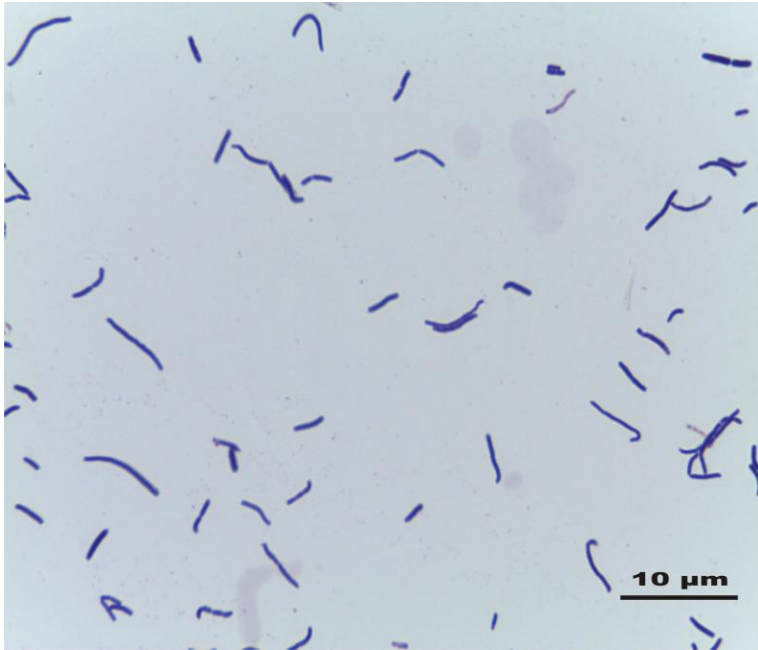
Çizelge 4.4. İzolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın gen bankası temsilcileri.

Suş	Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı	Homoloji	Gen Bankası No	260/280 OD
NB2	<i>Halomonas aquamarina</i>	%99	AB681587.1	1,97
NB5	<i>Halobacillus trueperi</i>	%99	AB617542.1	1,90
NB7	<i>Halobacillus trueperi</i>	%99	AY505522.1	1,67
NB8	<i>Halobacillus trueperi</i>	%99	AB617542.1	1,54
NB9	<i>Halobacillus trueperi</i>	%99	AY505522.1	1,90
NB10	<i>Halobacillus trueperi</i>	%99	AB617542.1	1,79
NB11	<i>Halobacillus trueperi</i>	%99	FJ444973.1	2,17
NB13	<i>Thalassobacillus devorans</i>	%99	JQ799100.1	1,59
NB20	<i>Halobacterium salinarium</i>	%99	NR-074204.1	1,73
NB21	<i>Halobacterium salinarium</i>	%99	JX982771.1	1,76
NB22	<i>Halobacterium halobium</i>	%99	M11583.1	1,57
NB28	<i>Halobacterium salinarum</i>	%99	AM774415.1	2,01

Resim 4.2. Halofilik arke suşlarının elektroforez görüntüsü



M: Marker (moleküler büyüklük belirteci)
NK: Negatif kontrol

Resim 4.3. *Halobacillus trueperi* NB5 suşunun ışık mikroskobu görüntüsü

4.5. Biyokimyasal Testler

Saf kültürleri elde edilen suşların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimleri değerlendirildiğinde suşların hiç biri NaCl içermeyen ortamda üremezken, suşların hepsi %20 NaCl içeren besiyerinde üremiştir (Çizelge 4.5). *Thalassobacillus devorans* NB13 suşunda, diğer halofilik bakterilerden farklı olarak %25 NaCl konsantrasyonunda da gelişme göstermiştir. %25 ve %30 NaCl konsantrasyonunda sadece Tuz Gölü'nden izole edilen ve arkeye ait olan *Halobacterium salinarium* NB20, NB21, NB28 ve *H.halobium* NB22 suşları gelişim göstermiştir.

Sıcaklık toleranslarının belirlenmesi amacıyla suşlar farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 55°C) inkübe edildiğinde, halofilik arke türleri (NB20, NB21, NB22, NB28) yalnızca 37°C'de gelişme gösterirken, halofilik bakteriler (NB2, NB5, NB7, NB8, NB9, NB10, NB11, NB13) ise hem 30°C'de hemde 37°C'de gelişme göstermişlerdir. Sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Suşların hepsinin pH 7,5'de çok iyi gelişim gösterdiği, pH 4, 4,5, 5, 9 ve 10'da ise gelişimlerinin inhibe olduğu belirlenmiştir. *Halomonas aquamarina* NB2 suşu diğer suşlardan farklı olarak pH 6 ve 9'da da gelişmiştir (Çizelge 4.5).

Yapılan biyokimyasal testlerde suşların hepsi kazein hidrolizi, DNaz aktivitesi, nitrat redüksiyonu ve gaz üretimi negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5).

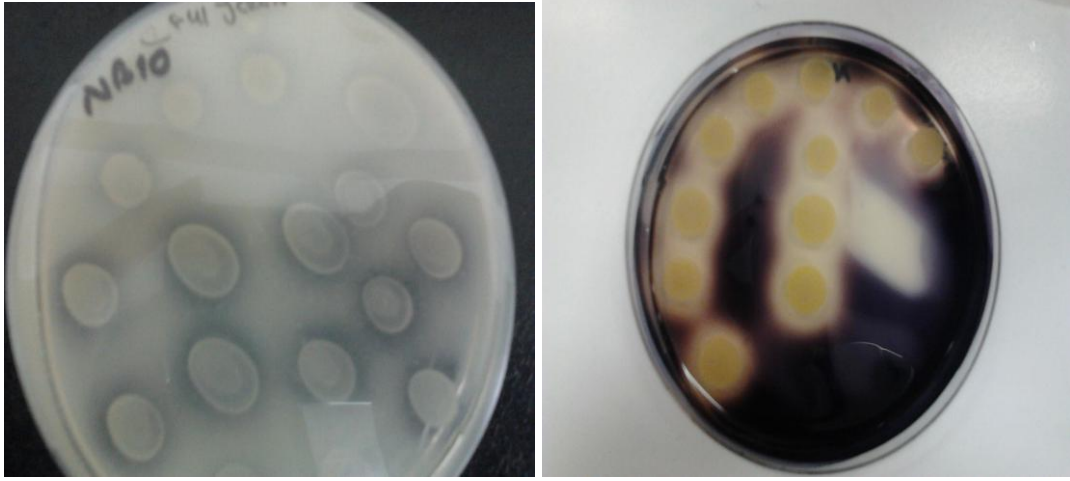
Jelatinli besiyerinde inkübasyon sonucunda *Halobacillus trueperi* NB5, NB7, NB8, NB9, NB10, NB11 ve *Thalassobacillus devorans* NB13 suşları jelatin hidrolize ederken, diğer suşlar jelatin hidrolizi negatif olarak değerlendirilmiştir (Resim 4.4, Çizelge 4.5). Tween 80 hidrolizi ise sadece *Halobacillus trueperi* NB5 ve NB11 suşlarında meydana gelmiştir (Çizelge 4.5). Nişasta hidrolizi halofilik arke olan *Halobacterium salinarium* NB20, NB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 suşlarında tespit edilmezken, halofilik bakterilerin nişastayı hidrolize edebildikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Resim 4.4'de *H. trueperi* NB5 suşunun jelatin hidrolizi ve nişasta hidrolizi pozitif test sonuçları gösterilmiştir. *Halobacillus trueperi* NB11,

Halobacterium salinarium NB20, NB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 suşları indol pozitif iken, diğer suşlar indol negatif olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. (Devam) İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Özellikler	<i>Halobacterium salinarium</i> NB28	<i>Halobacterium halobium</i> NB22	<i>Halobacterium salinarium</i> NB21	<i>Halobacterium salinarium</i> NB20	<i>Thalassobacillus devorans</i> NB13	<i>Halobacillus trueperi</i> NB11	<i>Halobacillus trueperi</i> NB10	<i>Halobacillus trueperi</i> NB9	<i>Halobacillus trueperi</i> NB8	<i>Halobacillus trueperi</i> NB7	<i>Halobacillus trueperi</i> NB5	<i>Halomonas aquamarina</i> NB2
Nişasta hidrolizi	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80 hidrolizi	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
DNaz aktivitesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üreaz testi	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
İndol testi	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Nitrat redüksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S Gaz oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktöz kullanımı	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
Sükroz kullanımı	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
Glikoz kullanımı	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

+ üreme var - üreme yok



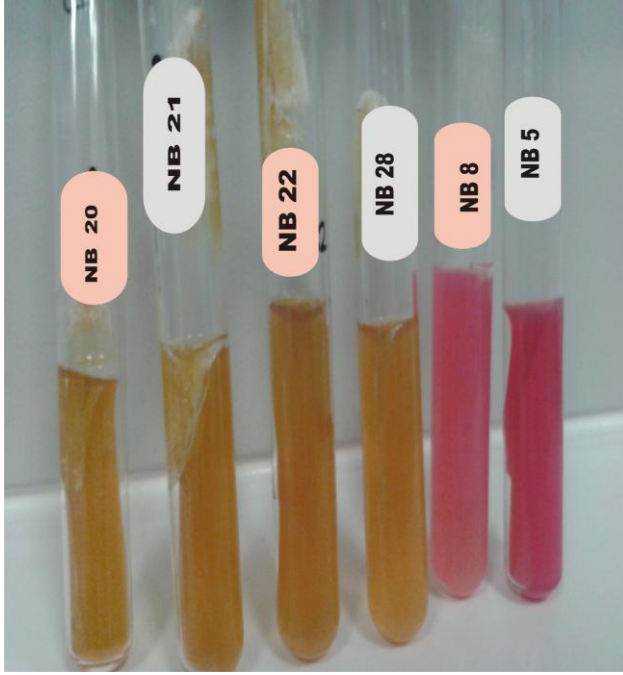
Resim 4.4. *Halobacillus trueperi* NB10 suşunun jelatin (solda) ve nişasta hidrolizi (sağda)

İzolatlardan, *Halobacillus trueperi* NB8, NB9, NB10, NB11 ve *T. devorans* NB13 oksidaz negatif olarak değerlendirilirken, diğer suşlar oksidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5). Katalaz aktivitesi *H. trueperi* NB10 ve NB11 suşları hariç, diğer suşlarda pozitif olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Resim 4.5'de *Halomonas aquamarina* NB2 suşunun %3 H₂O₂ eriği damlatıldığında verdiği pozitif reaksiyon gösterilmiştir.



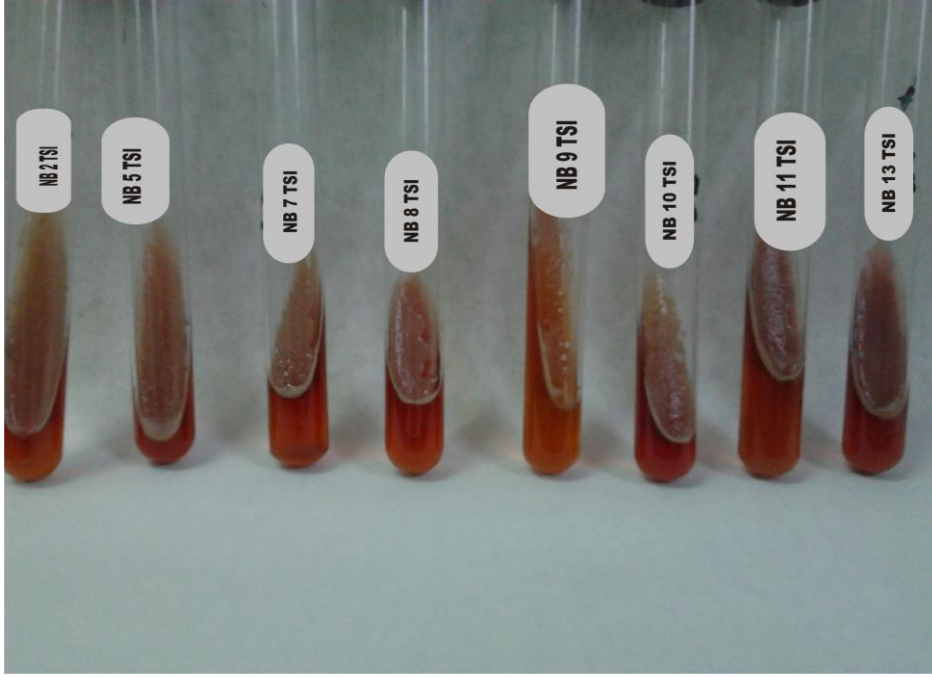
Resim 4.5. *Halomonas aquamarina* NB2 suşunun katalaz pozitif görünümü

Halofilik arke olduğu belirlenen *H. salinarium* NB20, NB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 suşları üreaz negatifken, diğer halofilik bakteri suşları üreaz pozitif olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Resim 4.6’da sarı renkte olan üre negatif arke suşları ile pembe renkte olan üre pozitif halofilik bakteriler gösterilmektedir.



Resim 4.6. Üreaz testi pozitif (pembe renkli) ve negatif (sarı renkli) olan izolatların görüntüsü

Suşların farklı şeker kaynaklarını kullanma durumu incelendiğinde *H. aquamarina* NB2, *Halobacillus tureperi* NB5, NB8, *Halobacterium salinarium* NB20, NB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 suşlarının laktoz, sükroz ve glikozun her üçünüde kullanabildiği belirlenmiştir (Resim 4.7). *Halobacillus trueperi* NB11, *T. devorans* NB13 suşları laktoz, sükroz, glikozdan hiçbirini karbon kaynağı olarak kullanmazken, *H. trueperi* NB10 ve NB11 suşları sadece glikozu kullanabilmiştir (Çizelge 4.5).

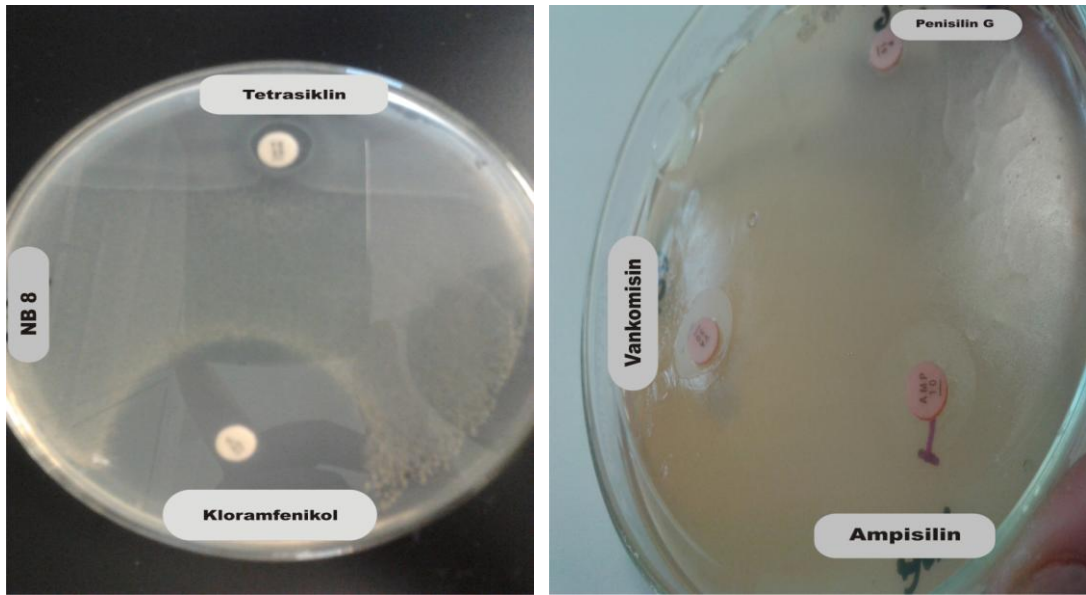


Resim 4.7. Modifiye edilmiş TSI besiyerinde farklı şeker kaynaklarının kullanımı

Farklı bölgelerden izole edilen halofilik arke ve bakteriler biyokimyasal test sonuçlarında çeşitli farklılıklar sergilemişlerdir. Tuz Gölü'nden izole edilen halofilik arkeler, arkelerin karakteristik özelliklerinden olan pembe pigmentasyona sahipken, denizlerden izole edilen halofilik bakteriler sarı ile krem rengi arasında koloni rengine sahip oldukları gözlenmiştir (Çizelge 4.5). Halofilik arkeler daha yüksek tuzlulukta alanlardan izole edildiği için, yüksek tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerinde gelişim göstermişlerdir. Orta derecede halofilik alanlardan izole edilen halofilik bakteriler ise çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%20) inhibe olmuştur. Oksidaz aktivitesi tüm arke suşlarında gözlenmiştir, fakat halofilik bakterilerin sadece %37,5'i oksidaz pozitif olarak bulunmuştur. Jelatin hidrolizi çalışmada kullanılan halofilik bakterilerde gözlenirken, halofilik arkelerde gözlenmemiştir. Halofilik arkelerin hiç birinde üreaz aktivitesine rastlanmazken, halofilik bakterilerin hepsi pozitif olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

4.6. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Halofilik arke olan *Halobacterium salinarium* NB20, NB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 suşları halofilik arkelerin tipik özelliği olan kloramfenikol ve penisilin G'ye dirençli iken basitrasin ve novobiyosine duyarlılık göstermişlerdir. Seftriakson, basitrasin ve novobiyosine karşı tüm suşlar duyarlı olarak belirlenmiştir. *Halomonas aquamarina* NB2 ve *Thalassobacillus devorans* NB13 suşları hariç diğer suşların penisilin G'ye dirençli oldukları tespit edilirken, basitrasin ve novobiyosine karşı sadece *H. aquamarina* NB2 suşunun dirençli olduğu belirlenmiştir. Vankomisine sadece *Halobacillus trueperi* NB5, NB7, NB11 suşları duyarlı iken, kloramfenikol, eritromisin ve neomisine çalışmada ki tüm halofilik bakteri suşları duyarlılık göstermiştir. Sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. *H. trueperi* NB8 ve *H. salinarium* NB20 suşlarının bazı antibiyotiklere olan duyarlılıkları Resim 4.8'de gösterilmiştir.



Resim 4.8. *Halobacillus trueperi* NB8 (solda) ve *Halobacterium salinarium* NB20 (sağda) bazı antibiyotiklere duyarlılık sonuçları

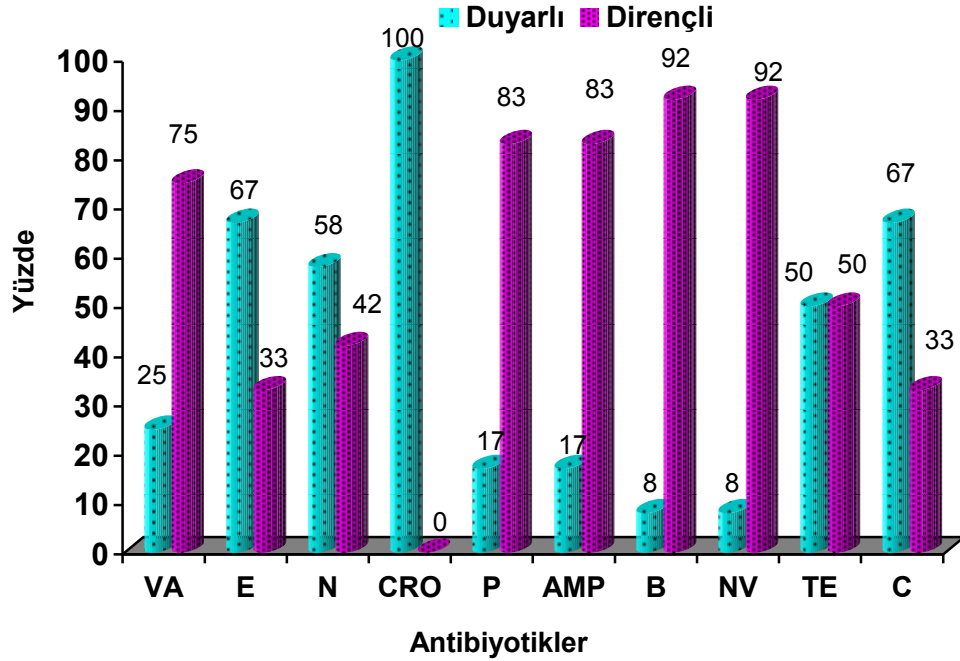
Genel olarak sonuçlar sonuçlar değerlendirildiğinde, suşların hücre duvar sentezini inhibe eden seftriakson %100, protein sentezini inhibe eden tetrasikline %50, neomisine %58, eritromisine %67 ve kloramfenikole %67 oranında duyarlı oldukları bulunmuştur. Ayrıca, hücre duvar sentezini inhibe basitrasine %92, ampisiline %83, penisilin-G'ye %83, vankomisine %75 ve genetik materyalin üzerine etki eden novobiosine %92 oranında suşların yüksek dirençlilik gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.1).

Çizelge 4.6. Halofilik bakteri ve arke suşlarının antibiyogram sonuçları

Suşlar	VA	E	N	CRO	P	AMP	B	NV	TE	C
<i>H. aquamarina</i> NB2	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S
<i>H. trueperi</i> NB5	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>H. trueperi</i> NB7	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>H. trueperi</i> NB8	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S
<i>H. trueperi</i> NB9	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>H. trueperi</i> NB10	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>H. trueperi</i> NB11	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>T. devorans</i> NB13	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S
<i>H. salinarium</i> NB20	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>H. salinarium</i> NB21	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>H. halobium</i> NB22	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>H. salinarium</i> NB28	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R

R: dirençli, S: duyarlı

Va: Vankomisin, E: Eritromisin, N: Neomisin, CRO: Seftriakson, P: Penisilin-G, Amp: Ampisilin, B: Basitrasin, NV: Novobiyosin, TE: Tetrasiklin, C: Kloramfenikol.



Şekil 4.1. Halofilik bakteri ve arkelerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri % duyarlılık oranları

4.7. BTX Bileşenlerinin Suşlar Üzerinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIK) Belirlenmesi

Düzenli olarak petrol kontaminasyonuna maruz kalan çeşitli alanlardan izole edilen suşların benzen, toluen ve ksilen (BTX) organik kirleticilerinin hangi değerlerinde inhibisyona uğradığını belirlemek için %1 ile %5 arasında değişen oranlarda organik kirleticilerden besiyerine eklenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde mikroorganizmaların gelişme durumuna göre minimum inhibisyon değeri belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Halomonas aquamarina NB2, *Halobacterium salinarium* NB20, NB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 suşları için %2 benzen, toluen ve ksilen minimum inhibisyon değeri olarak tespit edilmiştir, *Halobacillus trueperi* NB8 ve NB11 suşlarının ise denenen en yüksek konsantrasyon olan %5’de, her üç bileşende de inhibe olmadığı gözlenmiştir. *Halobacillus trueperi* NB5 ve NB7 suşları için benzen de %3 MIK iken, *H. trueperi* NB5’in MIK değeri toluen için %2 ve ksilen için %3 olarak tespit

edilmiştir. *Thalassobacillus devorans* NB13 suşunun ksilen ve benzen için MIK değeri %4 iken, toluen için %3 olduğu görülmüştür (Çizelge 4.7).

Bu sonuçlara göre BTX hidrokarbonlarının 12 suş üzerindeki MIK değerleri birbirine yakın bulunmuştur. Bu konsantrasyonlar arasında suşların geliştiği en uygun konsantrasyonlar %2 ve %3 olarak tespit edilmiştir ve en yüksek MIK değeri (> %5) *Halobacillus trueperi* NB8 ve NB11 suşlarında belirlenmiştir. Degredasyon çalışmalarında bu konsantrasyonlar esas alınmıştır.

Çizelge 4.7. Suşların minimum inhibisyon değerleri (%)

Kullanılan Suşlar	Benzen (%)	Toluen (%)	Ksilen (%)
<i>Halomonas aquamarina</i> NB2	2	2	2
<i>Halobacillus trueperi</i> NB5	3	2	3
<i>Halobacillus trueperi</i> NB7	3	3	3
<i>Halobacillus trueperi</i> NB8	5*	5*	5*
<i>Halobacillus trueperi</i> NB9	3	2	3
<i>Halobacillus trueperi</i> NB10	4	3	4
<i>Halobacillus trueperi</i> NB11	5*	5*	5*
<i>Thalassobacillus devorans</i> NB13	4	3	4
<i>Halobacterium salinarium</i> NB20	2	2	2
<i>Halobacterium salinarium</i> NB21	2	2	2
<i>Halobacterium halobium</i> NB22	2	2	2
<i>Halobacterium salinarium</i> NB28	2	2	2

* %5 (v/v) üzeri dirençli

4.8. Halofilik Mikroorganizmaların BTX Bileşenlerini Biyodegradasyonu

İçerisinde karbon kaynağı bulunmayan Mineral Salt Medium'a (MSM) karbon kaynağı olarak petrol hidrokarbonları ilave edilerek, bu ortamlara eklenen suşların petrol hidrokarbonlarını tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanım düzeylerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. İçerisinde organik kirletici bulunmayan ve karbon

kaynağı bulunan kontrol grubundaki gelişim baz alınarak izolatların gelişimleri mikropate okuyucuda (OD_{600nm}) ölçülmüştür ve sonuçlar Çizelge 4.8’de verilmiştir. Ayrıca, suşların artan BTX konsantrasyonlarında yüzde canlılıkları da belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

Besiyeri ortamında karbon kaynağı bulunmayan ve organik kirletici eklenmemiş kontrol grubunda (MSM besiyeri+mikroorganizma) suşların gelişimine rastlanılmamıştır. %1 oranında benzenin bulunduğu besiyerinde en iyi gelişenler *Halomonas aquamarina* NB2 (0,50 OD) ve *Halobacillus trueperi* NB5 (0,38 OD) kodlu suşlardır. Ksilen ve toluenin %1 oranında bulunduğu besiyerinde en iyi gelişmeyi ise *H. trueperi* NB8 suşu (sırasıyla, 0,32 OD-0,30 OD) göstermiştir. Çalışmada yalnızca minimum inhibisyon konsantrasyonlarına göre %5 (v/v) üzerinde petrol kirleticilerine dirençli olduğu tespit edilen *H. trueperi* NB8 ve NB11 kodlu suşların, %3 (v/v) oranına kadar BTX bileşenlerinin bulunduğu besiyerinde iyi gelişim gösterebildikleri tespit edilmiştir. *Thalassobacillus devorans* NB13 suşunda %1 ve %2 (v/v) oranında her üç organik kirleticinin bulunduğu besiyerlerinde yüksek oranda bir gelişme göstermiştir. Tuz Gölü’nden izole edilen *Halobacterium salinarium* NB20, NB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 suşları yalnızca %1 (v/v)’lik organik kirleticilerin bulunduğu besiyerinde gelişirken, MİK değerlerine paralel olarak %2 ve %3 (v/v) oranlarında gelişim gözlenmemiştir.

Artan BTX bileşenleri konsantrasyonuna bağlı olarak suşların gelişimlerinde bir azalma gözlemlenmiştir. Suşların BTX konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak optikal yoğunluklarındaki azalma arasındaki korelasyon, regresyon analizi ile belirlenmiş ve bu ilişkinin, multiple R değeri 0,750’den büyük olduğundan dolayı, yüksek derecede ve negatif yönde bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Suşların MSM besiyerinde farklı oranda BTX bileşen konsantrasyonlarında gelişimleri ve regresyon analiz sonuçları

Kullanılan Suşlar	Benzen				Toluen				Ksilen				KONTROL (1)	KONTROL (2)
	%1	%2	%3	R Multiple	%1	%2	%3	R Multiple	%1	%2	%3	R Multiple		
<i>Halomonas aquamarina</i> NB2	0,50±0,04	0,03±0,01	-	-0,787	0,17±0,01	0,05±0,01	-	-0,818	0,13±0,01	0,01±0,00	-	-0,807	1,98±0,01	-
<i>Halobacillus trueperi</i> NB5	0,38±0,03	0,05±0,00	-	-0,859	0,15±0,00	0,04±0,02	-	-0,809	0,23±0,02	0,03±0,01	-	-0,827	2,17±0,03	-
<i>Halobacillus trueperi</i> NB7	0,11±0,01	0,01±0,00	-	-0,805	0,17±0,00	0,08±0,00	-	-0,823	0,18±0,00	0,03±0,02	-	-0,824	1,80±0,01	-
<i>Halobacillus trueperi</i> NB8	0,22±0,02	0,09±0,00	0,01±0,00	-0,827	0,30±0,02	0,14±0,01	0,01±0,00	-0,846	0,32±0,03	0,11±0,01	0,02±0,00	-0,848	2,05±0,02	-
<i>Halobacillus trueperi</i> NB9	0,13±0,00	0,02±0,00	-	-0,808	0,18±0,01	0,07±0,00	-	-0,821	0,13±0,02	0,05±0,00	-	-0,808	1,97±0,01	-
<i>Halobacillus trueperi</i> NB10	0,09±0,00	0,02±0,00	-	-0,804	0,16±0,01	0,04±0,00	-	-0,826	0,11±0,00	0,02±0,00	-	-0,810	1,56±0,04	-
<i>Halobacillus trueperi</i> NB11	0,20±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	-0,825	0,14±0,00	0,03±0,00	0,01±0,00	-0,810	0,22±0,01	0,06±0,00	0,02±0,00	-0,829	1,87±0,03	-
<i>Thalassoobacillus devorans</i> NB13	0,20±0,00	0,05±0,00	-	-0,826	0,21±0,02	0,06±0,00	-	-0,828	0,19±0,00	0,01±0,00	-	-0,822	1,96±0,01	-
<i>Halobacterium salinarium</i> NB20	0,03±0,00	-	-	-0,784	0,08±0,00	-	-	-0,801	0,06±0,00	-	-	-0,794	1,50±0,01	-
<i>Halobacterium salinarium</i> NB21	0,02±0,00	-	-	-0,780	0,05±0,00	-	-	-0,788	0,03±0,00	-	-	-0,783	1,81±0,01	-
<i>Halobacterium halobium</i> NB22	0,01±0,00	-	-	-0,777	0,02±0,00	-	-	-0,779	0,02±0,00	-	-	-0,779	1,93±0,02	-
<i>Halobacterium salinarium</i> NB28	0,02±0,00	-	-	-0,780	0,03±0,00	-	-	-0,783	0,03±0,00	-	-	-0,783	1,74±0,01	-

Multiple R: Regresyon analiz sonuçları

Kontrol (1): MedyumA/C besiyerinde gelişim.

Kontrol (2): MSM besiyerinde gelişim.

(-): üreme yok.

Çizelge 4.9. Suşların yüzde canlılık sonuçları

Kullanılan Suşlar	Benzen % Canlılık			Toluen % Canlılık			Ksilen % Canlılık		
	%1	%2	%3	%1	%2	%3	%1	%2	%3
<i>Halomonas aquamarina</i> NB2	25,25	1,50	-	8,60	2,50	-	6,60	0,50	-
<i>Halobacillus trueperi</i> NB5	17,50	2,30	-	7,00	1,80	-	10,60	1,40	-
<i>Halobacillus trueperi</i> NB7	6,10	0,60	-	9,40	4,40	-	10,00	1,60	-
<i>Halobacillus trueperi</i> NB8	11,00	4,30	0,50	14,60	6,80	0,50	15,60	5,40	1,00
<i>Halobacillus trueperi</i> NB9	6,60	1,00	-	9,10	3,50	-	6,60	2,50	-
<i>Halobacillus trueperi</i> NB10	5,80	1,30	-	10,30	2,60	-	7,00	1,30	-
<i>Halobacillus trueperi</i> NB11	10,70	1,10	0,50	7,40	1,60	0,50	12,00	3,20	1,10
<i>Thalassoobacillus trueperi</i> NB13	10,20	2,60	-	10,70	3,10	-	9,70	0,50	-
<i>Halobacterium salinarium</i> NB20	2,00	-	-	5,30	-	-	4,00	-	-
<i>Halobacterium salinarium</i> NB21	1,00	-	-	2,70	-	-	2,00	-	-
<i>Halobacterium halobium</i> NB22	0,50	-	-	1,10	-	-	1,00	-	-
<i>Halobacterium salinarium</i> NB28	1,00	-	-	1,70	-	-	2,00	-	-

-: Canlılık yok

 $\% \text{Canlılık} = (\text{Final OD} / \text{Kontrol OD}) \times 100$

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Petrol, endüstrinin ve günlük hayatımızın en önemli enerji kaynağıdır. Aynı zamanda petrol ve türevleri; plastikler, boyalar ve kozmetik malzemeleri gibi birçok kimyasal ürünün de ham maddesidir. Bu nedenle ham petrol çıkarıldıktan sonra çeşitli rafinasyon işlemlerine tabii tutulmaktadır. Petrol, yapısında çoğunlukla karbon ve hidrojen moleküllerinden oluşmuş binlerce bileşen bulunduran viskoz bir sıvıdır. Ham petrol doymuş aromatikler, reçineler ve asfaltenler altında toplanan hidrokarbonlardan oluşmaktadır [Diaz ve ark., 2002].

Büyük çaptaki petrol rezervleri Mezopotamya ülkeleri, Rusya, Kanada ve Güney Amerika ülkelerinin bazılarında bulunmaktadır. Bu nedenle çıkartılan ham petrol diğer ülkelere çeşitli yollarla taşınmaktadır. Uluslararası petrol taşımacılığında en fazla deniz yoluyla taşıma tercih edilmektedir. Bu amaçla kullanılan tankerler deniz ekosistemlerine balast suyu kontaminasyonları, depo sızıntıları, yakıt ve sintine atıkları ile düzenli olarak zarar vermektedirler. Petrol tankerlerinin oluşturduğu en büyük risk ise tanker kazalarıdır. Günümüze kadar pek çok tanker kazası meydana gelmiştir [Harayama ve ark., 1999].

Yatlar, yolcu gemileri, ağır yük gemileri ve tankerler tarafından kullanılan denizlerimiz petrol kontaminasyonlarına sıklıkla uğramaktadır. Denizlerimizde yaşanan petrol kirlilikleri başta canlı sağlığı olmak üzere, denizel ekosistemleri, balıkçılık faaliyetlerini ve doğal yapıyı olumsuz etkilemektedir [Harayama ve ark., 1999]. Çalışmada denizlerimizde meydana gelen petrol kirliliklerin biyolojik olarak ve doğal yollardan giderilmesinde kullanılabilecek mikrobiyal ajanlar araştırılmıştır. Bu nedenle örnekleme yapılan alanlar düzenli olarak petrol kontaminasyonuna maruz kalan alanlardan seçilmiştir. Ayrıca dört denizden de örnekleme yapılarak denizlerimizdeki halofilik olup aynı zamanda petrol hidrokarbonlarını parçalayabilen türlerin literatüre kazandırılması hedeflenmiştir.

Örnekleme yapılan alanlarda ki kirlilik durumlarının nedenleri ise kısaca şöyledir; 1979 yılındaki Independenta ve 1994 yılındaki Nassai tanker kazaları sırasında Marmara Denizi'nde tankerlerden sızan petrolün oluşturduğu kirliliklerin izleri azalmışta olsa halen devam etmektedir. Ayrıca yoğun vapur, feribot taşımacılığından ve kentsel atık sulardan kaynaklanan petrol kirlilikleri İstanbul Boğazı'nı da yer yer gözle görülebilecek düzeydedir. İzmir ve Trabzon Liman'ları Türkiye'nin en büyük gemi limanlarıdır. Uluslararası gemi ve taşımacılık faaliyetlerinin yanı sıra endüstriyel ve kentsel atık deşarjlarıyla sürekli olarak petrol kontaminasyonuna maruz kalmaktadır. Antalya Kaleiçi Yat Liman'ında ise turistik gemicilik ve yat aktivitelerinden dolayı yoğun petrol kirliliği yaşanmaktadır. Tuz Gölü sulak alanı ise kentsel ve tarımsal atıklar nedeniyle kirlilikler yaşamaktadır [Kılıç ve Uyanık, 2001]. Tuz Gölü sahip olduğu ekstrem şartlar nedeniyle, zor şartlara dayanıklı pek çok mikroorganizma barındırmaktadır. Bu organizmaların petrol kontaminasyonlarının giderilmesinde biyodegrade edici ajan olarak kullanılıp kullanılmayacağı bu çalışmada araştırılmıştır.

Halofilik ortamlar içerdikleri tuz bakımından her mikroorganizmanın yaşamasına olanak sağlamayan habitat alanlarıdır. Halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar geliştirdikleri yüksek osmotik basınç adaptasyonları ve enzim yapıları sayesinde tuzcul ortamlarda yaşayabilmektedirler. Halofilik bakteriler, yüksek tuz konsantrasyonlarında optimal aktivite gösteren ve endüstride geniş kullanım olanağı bulunan mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar hücre dışı enzimleri üretmeleri nedeniyle büyük bir biyoteknolojik potansiyele sahip olmalarına karşın, tanımlamaları ve hücre yapıları ile ilgili çalışma yapmak oldukça zordur [Demirci, 2009]. Halofilik gruplar içerisinde %3-15 gibi çok değişik NaCl konsantrasyonlarında optimum büyüme kaydedebilen bakteriler ılımlı halofilik bakteriler olarak isimlendirilmektedir [Ventosa ve ark., 1998]. Bu bakteriler değişik cinslere ait pek çok türden oluşmaktadır. En önemlileri arasında *Halomonas*, *Salinivibrio*, *Chromohalobacter* ve *Halobacillus* cinsleri bulunmaktadır [Ventosa ve ark., 1998].

Halofilik bakteriler ile halofilik arkeler aynı tuzcul alanı paylaşabilen organizmalardır. Fenotipik tanımlama yapılarak halofilik bakterileri halofilik arkelerden ayırt etmek mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, mutlaka moleküler düzeyde tanımlama yapılması gerekmektedir. Çalışmada denizlerden ve Tuz Gölü göl suyundan izole edilen izolatların 16S rDNA moleküler tanımlaması Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'n de (MOBAM) yapılmıştır. Moleküler analizler sonucunda 12 izolattan 4 tanesi halofilik arke 8 tanesi ise halofilik bakteri olarak tanımlanmıştır. Halofilik bakteriler içerisinde *Thalassobacillus devorans* nadir bulunan bir tür olmasına rağmen, İzmir Limanı'ndan izole edilebilmiştir. Buda çalışmayı orijinal hale getirmiştir.

Örnekleme alanlarından izole edilen suşların, saf kültürleri elde edildikten sonra morfolojik değerlendirmeleri yapılmıştır. Gram boyama reaksiyonuna göre moleküler tanımlamada halofilik bakteri olarak belirlenen *Halomonas aquamarina* NB2, *Halobacillus trueperi* NB5, NB7, NB8, NB9, NB10, NB11 ve *Thalassobacillus devorans* NB13 suşları Gram pozitif, halofilik arke olarak tanımlanan *Halobacterium salinarum* NB20, NB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 suşları ise Gram negatif olarak belirlenmiştir. Yavuztürk, İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan elde ettiği aerobik halofilik bakterilerle yaptığı çalışmada, izolatlarının %80'inin basil ve %20'sinin düzensiz basil olduklarını bildirmiştir. Koloni renkleri açısından da açık sarı ile koyu pembe arasında renklenme gösterdiklerini rapor etmiştir [Yavuztürk, 2005]. Bu çalışmada ise, halofilik bakterilerin petrideki kolonileri sarı-krem renklemeler gösterirken, halofilik arkelerin açık pembe renkli koloniler oluşturmuştur. Suşların hepsinin obligat aerofilik olduğu belirlenmiştir.

Birbir ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, halofilik bakterilerin %15 ve %25 NaCl içeren besiyerlerinde geliştiklerini gözlemlemişlerdir (Birbir ve ark., 2001). Türkiye'den halofilik arkelerin izolasyonuna yönelik başka bir çalışmada izolatlar %25 NaCl konsantrasyonu içeren besiyerlerinde iyi gelişme gösterdiği

bildirilmiştir [Özcan, 2004]. Bu çalışmada ise tüm halofilik suşların %20 NaCl içeren besiyerinde çok iyi geliştikleri tespit edilmiştir.

Demirci, halofilik bakteri suşlarının tümünün pH 7 ile 9 aralığında, 30°C ile 55°C sıcaklıkları arasında çok iyi geliştiğini rapor etmiştir [Demirci, 2009]. Bu çalışmada, halofilik arkeler pH 7-7,5 aralığında ve 37°C sıcaklıkta, halofilik bakteriler ise, suşlara göre değişmekle birlikte, pH 6-9 aralıklarında ve 30-37°C sıcaklıklarda gelişme göstererek, diğer araştırmacılarla benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Romanenko ve arkadaşları Japonya deniz sularından izole ettikleri *Halomonas* türü halofilik bakterilerinin Tween 80 hidrolizi pozitif, nişasta ve kazein hidrolizinin negatif olduğunu bildirmişlerdir [Romanenko ve ark., 2002]. Buna karşılık yapılan bir başka çalışmada *Halomonas aquamarina* IAM 12550 suşunun Tween 80 ve nişasta hidrolizi pozitif, kazein hidrolizi negatif rapor edilmiştir [James ve ark., 1990]. Halofilik bakteri *Halobacillus* cinsleri ile yapılan bir çalışmada *Halobacillus trueperi* ST5 suşu ve *Halobacillus litoralis* SL-4 suşunun kazein ve nişasta hidrolizi negatif, Tween 80 hidrolizi pozitif olarak belirlenmiştir [Spring ve ark., 1996]. Tuz Gölü gibi hipersaline alanlarda yaşayan *Halobacterium salinarium*'un tip suşunun nişasta ve Tween 80 hidrolizi yapamazken, kazein ve jelatin hidrolizi yaptığı gözlenmiştir [Özcan ,2004; Stan-Lotter ve ark., 2002]. Bu çalışmada, halofilik arke suşlarının Tween 80, kazein, nişasta ve jelatini hidrolize edemediği, halofilik bakteri suşlarının ise jelatin ve nişastayı hidrolize ettiği tespit edilmiştir. Halofilik bakterilerden yalnızca *H. trueperi* NB5 ve NB11 suşları Tween 80'i hidrolize ederken, suşların hiçbirinin kazeini hidrolize edemediği belirlenmiştir Bu sonuçlarda ki farklılığın suşlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Pek çok aerobik ılımlı halofilik bakteri nitratı alternatif elektron alıcısı olarak kullanabilmektedir. Örneğin *Halomonas elongata* anaerobik şekilde, nitratı nitrite indirgeyerek gelişebilmektedir [Burg, 2003]. *Halomonas halocynthiae* türü ise aerobiktir ve nitrat redüksiyonu yapamadığı bilinmektedir [Romanenko ve ark.,

2002]. Deniz ekosisteminin bir parçası olan *Halobacillus* cinsine ait *H. halophilus*, *H. litoralis* ve *H. trueperi*'nin nitratı nitrite indirgeyememektedir [Ventosa ve ark., 1998]. Ilımlı halofilik bakteri olan *Thalassobacillus devorans*'ın ise nitrat redüksiyonu yaptığı bildirilmektedir [Garcia ve ark., 2005]. Çalışma sırasında kullanılan halofilik arke ve bakteri suşlarının hiçbirinin nitrat redüksiyonu yapmadığı tespit edilmiştir.

Birbir ve arkadaşlarının Türkiye'de ki, içlerinde Tuz Gölü'de bulunan, bazı hipersaline bölgelerden aldıkları örnekler üzerinde yaptıkları çalışmada, Tuz Gölü'nden izole edilen halofilik arke suşlarının %36'sının indol pozitif olduğunu tespit etmişler [Birbir ve ark., 2007]. Ancak bu çalışmada, arke suşlarının hepsi indol pozitif olarak bulunmuştur. Buda bize çalışmada kullanılan suşların triptofan amino asitini triptofanaz enzim varlığı ile parçalayabildiğini göstermektedir.

Oksidaz ve katalaz aktiviteleriyle ilgili yapılan bir çalışmada Tuz Gölü'nden izole edilen halofilik bakterilerin %83'ünün pozitif oksidaz reaksiyonu, %78'inin pozitif katalaz reaksiyonu verdikleri saptanmıştır [Birbir ve ark., 2001]. İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole edilen halofilik bakteri suşlarının %33'ünün katalaz negatif, %67'sinin katalaz pozitif reaksiyon verdikleri bildirilmiştir [Demirci, 2009]. Bu çalışmada ise, izole edilen halofilik arke ve bakterilerin %21'i oksidaz, %83'ü katalaz pozitif olarak belirlenmiştir. Bu da bize bu suşların sitokrom C oksidaz ve katalaz enzimlerine sahip olduklarını göstermektedir.

Halofilik organizmaların DNaz aktiviteleri hakkında çok az veri bulunmaktadır. Pek çok türün DNaz aktivitesi tanımlanmamıştır. Çalışmada kullandığımız suşlarımızın hiç birinde DNaz aktivitesine rastlanmamıştır. Bu da, suşların patojen olmadığını göstermektedir. Üreaz aktivitesi ise halofilik arke suşlarında negatif, halofilik bakteriler de ise pozitif olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen biyokimyasal testlerin sonuçları ile farklı çalışmalardaki biyokimyasal test sonuçları çoğunlukla örtüşmektedir. Bulunan farklı sonuçların, suş farklılıklarından, izole edildikleri ortamdaki çevre şartlarından ve genetik modifikasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Halofilik arkeleri bakterilerden ayırmak için bazı antibiyotiklerin indikatör olarak uygun oldukları düşünülmektedir. Arkelerin hücre duvarı sentezini inhibe eden penisilin G ve protein sentezi inhibitörü kloramfenikol antibiyotiklerine direnç göstermeleri, hücre duvarı sentezini inhibe eden başka bir antibiyotik olan basitrasine ve genetik materyal inhibitörü olan novobiosin antibiyotiklerine duyarlı olmaları genel karakteristik özellikleri olduğu bildirilmektedir [Oren, 2002]. Bu bilgilere paralel olarak çalışmada kullanılan suşlardan halofilik arke olan *Halobacterium salinarium* NB20, NB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 suşları penisilin G ve kloramfenikol antibiyotiklerine direnç gösterirken, basitrasin ve novobiosin antibiyotiklerine duyarlılık göstermişlerdir. Suşların moleküler tanımlamaları da bu sonuçları desteklemiştir. Birbir çalışmasında, Tuz Gölü izolatlarının arke olanlarının hepsinin Penisilin G' ye dirençli olduğunu bildirmiştir [Birbir, 2003]. Mutlu, Tuz Gölü'nden izole ettiği 122 arke suşunun 9 tanesi hariç diğer tümünün penisin G'ye, vankomisin ve kloramfenikol'e karşı dirençli ve basitrasin ve novobiosin'e duyarlı olduklarını belirtmiştir [Mutlu,2006]. Bu sonuçlar ile çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar örtüşmektedir. Denizlerden izole edilen halofilik bakterilerin ise, hepsinin hücre duvarı sentezi inhibe eden seftriaksona, protein sentezini inhibe eden kloramfenikole ve eritromisine duyarlı oldukları tespit edilmiştir. *Halomonas aquamarina* NB2 suşu hariç hepsi basitrasin ve novobiyosin antibiyotiklerine duyarlı oldukları bulunmuştur.

Farklı bölgelerden izole edilen 12 suşdan, bir suşun *Halomonas* cinsine, bir suşun *Thalassobacillus* cinsine, dört suşun *Halobacterium* cinsine, altı suşunda *Halobacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. *Halomonadaceae* familyasına ait *Halomonas* cinsi ılımlı halofiller içindeki en büyük cinstir ve bugün itibariyle 30'dan

fazla türü içerir [Romano ve ark., 2005]. Tuzlu habitatlardan izole edilen türlerin çoğunu oluşturan *Halomonas* genusunun sınıflandırılması, yeni türler izole edildikçe ve tanımlandıkça daha da netleşecektir. Bu türler özellikle oluşturdukları eksopolisakkaritleri, aromatik bileşikleri degrade edebilmeleri ve ürettikleri enzimler nedeniyle önemlidir [Yavuztürk, 2005]. Benzer olarak halofilik olan *Bacillaceae* familyasına ait olan *Halobacillus* genusunda 18 tür bulunmaktadır. *Halobacillus* türlerinin endospor oluşturmaları en dikkat çekici özelliklerindedir. *Halobacillus*'ların organik kirleticileri biyodegrade edebilme yetenekleri araştırmacıların ilgisini çekmektedir [Nicholson ve Fathepure, 2005]. *Thalassobacillus devorans* türü *Thalassobacillus* cinsine ve *Bacillaceae* familyasına aittir. Yeni denilebilecek bir tarihte İspanya denizlerinde keşfedilen bu tür yüksek tuz konsantrasyonlarında bile fenolü parçalama özelliği göstermektedir [Garcia ve ark., 2005]. Yeni bulunması nedeniyle bu halofilik bakteri hakkında kısıtlı bilgi bulunmaktadır.

Çalışmada denizden izole edilen *Halomonas aquamarina*, *Halobacillus trueperi* ve *Thalassobacillus devorans* türleri kozmopolit türler olsa da Türkiye'de bilinen benzer bir çalışmada kullanılmamışlardır. Ayrıca Türkiye kaynaklı izolasyonları hakkında da kısıtlı bilgi bulunmaktadır.

Tuz Gölü tuzluluk oranı bakımından İsrail'de ki Ölü Deniz'den (Death Sea) sonra en tuzlu ikinci gölüdür. Tuz Gölü hiposaline habitatından *Halobacterium salinarium* ve *Halobacterium halobium* olarak belirlenen ekstrem halofilik arke türleri izole edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da Tuz Gölü, tuz ve göl suyu örneklemelerinde *Halobacterium salinarium* ve *Halobacterium halobium* türlerinin izole edildiği bildirilmiştir [Birbir, 2003; Mutlu, 2006 ve Özcan, 2006]. Tuz Gölü'nden izole edilen halofilik mikroorganizmaların tanımlanması ve enzim aktiviteleri hakkında çalışmalar mevcut olmasına rağmen [Yalçın, 2000; Bahçeci, 2004], biyodegradasyon özellikleri hakkında veri bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmanın özgün değeri oldukça yüksektir.

Halofilik ortamlarda oluşan petrol kirliliklerinin giderilmesi için yüksek tuzluluğa dayanıklı halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların kullanılması gerekmektedir. Tuzcul bir ortamda oluşan petrol kirliliğinin giderilmesinde tuza duyarlı mikroorganizmalar kullanılmak istenirse, tuzluluk bu mikroorganizmalar için çok sert bir ortam oluşturduğu için mikrobiyal biyodegradasyonu zorlaştıracaktır. Bu nedenle, petrolle kontamine olmuş tuzcul alanların biyoremediasyonunda başarıya sadece petrolü parçalayabilen halofilik ve halotolerant organizmalar ya da petrolü parçalayabilen yerel mikroorganizmalar kullanılarak başarılabilceği bildirilmektedir [Rhykerd ve ark. 1995, Nicholson, 2005]. Çalışmada çeşitli nedenlerden dolayı petrol kontaminasyonlarına maruz kalan deniz sularından izole edilen halofilik bakterilerin, petrol hidrokarbonu bileşenlerinden olan benzen, toluen ve ksilenin parçalama metabolizmasına sahip olup olmadıkları araştırılmıştır. Ayrıca ekstrem şartlara sahip habitatlarda yaşayabilen dayanıklı arke türlerinin BTX bileşenlerinin biyodegradasyonunda alternatif ajan olarak kullanılabilirliği çalışmada test edilmek istenmiştir.

Petrol her ne kadar doğal bir ürün olsa da bileşenlerinin canlılar üzerinde toksik etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmada BTX bileşenlerinin, izole edilen halofilik bakteri ve arkelerin üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIK) değerlendirilmiştir. Araştırmada BTX bileşenlerinin farklı konsantrasyonlarının, kullanılan suşlar üzerinde farklı inhibe edici etkileri olmuştur. Halofilik bakteriler içerisinde her üç BTX bileşeninin %5 (v/v) üzerinde ki konsantrasyonlarında inhibe olan *Halobacillus trueperi* NB8 ve NB11 suşları bu hidrokarbonların lethal etkilerine en dirençli olan suşlar olarak belirlenmiştir. *Halobacterium salinarium* NB20, NB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 halofilik arke suşlarının (MIK) değeri ise %2 (v/v) olarak tespit edilmiştir.

Halofilik bakteri türlerinin benzen, toluen, ksilen ve etilbenzen degradasyonu hakkında çok az bilgi bulunmaktadır [Sei ve Fathepure, 2009]. Özellikle *Halobacillus* cinsine ait türlerin BTX bileşenleri biyodegradasyonu hakkında bilgi

çok sınırlıdır. Li ve arkadaşlarının Doğu Çin Deniz sedimentlerinden izole ettikleri *Marinobacter*, *Prolixibacter*, *Balneola*, *Zunongwangia*, *Halobacillus* cinsleriyle benzen homologlarının biyodegradasyonu üzerine yaptıkları araştırmada 2 M NaCl konsantrasyonunda 120 mg/L tolueni 5 günde biyodegrade edebildiklerini tespit etmişlerdir [Li ve ark., 2012]. Garcia ve arkadaşları İspanya'dan izole ettikleri 110 *Halomonas* cinsine ait suşun monosiklik ve polisiklik aromatik hidrokarbonlarının tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımıyla ilgili yaptıkları araştırmada %33 ile %48 arasında değişen oranlarda kullanımını göstermişlerdir [Garcia ve ark., 2005a]. Çeşitli deniz sedimentlerinden izole edilen halofilik bakteri olan *Halomonas* cinsine ait izolatların monosiklik ve polisiklik aromatik bileşikler üzerinde gelişebildiği bilinmektedir [Hinteregger ve Streichsbier, 1997; Melcher ve ark., 2002]. *Halomonas* sp. C2SS100 suşu Tunus'ta ki açık deniz petrol arama sahasındaki petrol üretim suyundan izole edilmiş ve bu suşun etkili bir şekilde petrol hidrokarbonlarını degrade edebildiği bulunmuştur [Mnif ve ark., 2009].

Çalışmada halofilik bakteri olarak tanımlanan türlerin tek karbon ve enerji kaynağı olarak petrol hidrokarbon bileşenlerini kullanarak, parçalama yetenekleri test edilmiştir. *Halomonas aquamarina* NB2 halofilik bakteri suşunun benzeni en iyi metabolik olarak parçalayan suş olduğu tespit edilmiştir. *H. aquamarina* NB2 suşunun %1 (v/v) benzende %25,25 oranında canlılık göstermiştir, ancak aynı oranda canlılığı ksilen ve toluen de gösterememiştir. Diğer halofilik bakteri suşları ise farklı konsantrasyonlardaki BTX bileşenlerinde %0,5 ile %15,6 aralıklarında canlı kalabilmişlerdir. Diğer bilim insanlarının buldukları sonuçlardan daha düşük degradasyon kapasitesine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Bu çalışmada izole edilen ve yeni denilebilecek bir tür olan *T. devorans* NB13 suşunun da %1 ve %2 (v/v) oranında benzen, toluen ve ksileni degrade ettiği tespit edilmiştir *T. devorans* türünün biyodegradasyon kapasitesi hakkında çok fazla bilgi bulunmasa da, çeşitli aromatik bileşenleri parçalayabildiği bildirilmektedir [Garcia ve ark., 2005b].

Geçtiğimiz otuz yıl boyunca değişik organik bileşikleri metabolize ederek ortamdan uzaklaştıran halofilik olmayan *Pseudomonas* bakterileri biyodegradasyon çalışmalarında model cins olarak araştırmalarda kullanılmıştır. Garcia ve arkadaşları yüksek tuz konsantrasyonlarında aromatik bileşikleri parçalanmasında halofilik bakteri türlerinin de model bakteri olarak çalışmalarda kullanılabileceğini önermektedirler [Garcia ve ark., 2005a].

Araştırmada petrol hidrokarbonlarının mikrobiyolojik olarak degrade edebilme yeteneği, her üç konsantrasyonda da gelişme gösterdiğinden dolayı, denizlerden izole edilen *Halobacillus trueperi* NB8 halofilik bakteri suşunda tespit edilmiştir. Çeşitli sebeplerden petrol hidrokarbonlarıyla kontamine olan İstanbul Silivri Limanı'ndan izole edilen *H. trueperi* NB8 suşu, bu bölgedeki yüksek hidrokarbon kontaminasyonu sebebiyle her üç konsantrasyondaki BTX bileşenlerini (benzen, toluen, ksilen) iyi bir şekilde degrade edebildiği düşünülmektedir. Bakteriler arasında her üç BTX bileşenini iyi parçaladığı ve MİK değerleri %5 (v/v) üzerinde olması nedeniyle *H. trueperi* NB8 suşu petrol hidrokarbonu ile kontamine olmuş alanların biyoremediasyonunda biyodegrade edici ajan olarak kullanılabilir.

Bu çalışmayla petrol hidrokarbonlarını metabolize etme yetenekleri hakkında kısıtlı bilgi bulunan *Halobacillus*, *Halomonas* ve *Thalassobacillus* cinsine ait halofilik bakterileri türlerinin BTX bileşenlerini biyodegradasyonu üzerine çalışılarak, literatüre veri kazandırılmıştır.

Çalışmada, *Halobacterium salinarium* NB20, NB21 ve NB28 ve *H. halobium* NB22 arke suşları, çalışılan diğer bakteri suşları arasında benzen, toluen ve ksileni en yavaş ve en düşük seviyede degrade eden türler olarak değerlendirilmiştir. Bunun nedeninin arkelerin, bakterilere göre degradasyon yeteneklerinin daha düşük olması olabilir. MİK değerleri de göz önüne alınarak, bu halofilik arke türlerinin petrol hidrokarbonlarını biyodegre etme kapasitelerinin çok düşük olduğu ve bu bileşenlerin *Halobacterium salinarium* ve *H. halobium* türleri üzerinde lethal etki

gösterdiği görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda Hazar Denizi'nin doğusunda ki Kalamkass petrol sahasından izole edilen ve aşırı tuzcul arke olan *Haloferax mediterranei*'nin %10-%25 (v/v) NaCl konsantrasyonlarında petrolü tek karbon kaynağı olarak kullanarak geliştiği bildirilmiştir [Zvyagintseva ve ark., 1995]. Rusya'da ki tuzcul petrol sahalarında %32 tuzlulukta petrol hidrokarbonlarını degrede edebilen arke türleri tespit edilmiştir [Kulichevskaya ve ark., 1991]. Bu çalışmalarda petrol hidrokarbonlarıyla kontamine olmuş alanlardan alınan örneklerin biyodegradasyon kapasiteleri petrol kontaminasyonuna maruz kalmalarıyla birlikte geliştirdikleri adaptasyonlarla ilişkilendirilse de, hiç petrol kontaminasyonuna uğramamış tuzcul alanlarda da arkeal türlerin petrol hidrokarbonlarını parçalayabildiği bildirilmektedir. Fransa'da daha önce hiç kontamine olmamış Camargue tuz gölünde Tapilatu ve meslektaşları, *Holarcula argentinensis*, *Haloferax volcanii* ve *H. alexandrinus* türleri ile yaptığı çalışmada, kullanılan suşlarının 40°C'de 30 gün inkübasyonu sonucunda %32 ile %95 oranlarında hidrokarbonları degrede edebildiğini göstermişlerdir [Tapilatu ve ark., 2010]. Çalışmada kullanılan halofilik arke suşları BTX bileşenlerini degrede ederek, %0,5 ile %5,3 aralıklarında canlı kalabilmişlerdir. Diğer araştırmacıların buldukları sonuçlardan daha düşük degradasyon kapasitesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu durum örnekleme yapılan alanın sürekli ve düzenli olarak petrol kontaminasyonlarına maruz kalmamasından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmada Tuz Gölü'nden izole edilen *Halobacterium salinarium* NB20, NNB21, NB28 ve *H. halobium* NB22 arke suşları her ne kadar ekstrem tuzlu şartlara adaptasyon gösterebilmiş olsalar da, petrol bileşenlerinin düşük seviyedeki konsantrasyonlarında gelişimleri inhibe olduğu için petrol kirliliklerinde biyodegradasyon elemanı olarak kullanılamayacakları düşünülmektedir.

Sonuç olarak günlük hayatımızdan endüstriyel alanlara kadar çeşitli amaçlarla kullanılan, su ve karasal ekosistemlerde risk oluşturan petrol kirleticilerinin oluşturdukları kirliliklerin mikroorganizmalar yoluyla giderilmesinde,

biyodegradasyon ve biyoremediasyon çalışmaları gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bu alanda kullanılan mikroorganizmaların özellikle halofilik çevrelerde oluşan petrol hidrokarbonu kirliliklerinin giderilmesinde *Halomonas trueperi* NB8 ve *Halomonas aquamarina* NB2 suşlarının yardımı ile hem çevrede sorun oluşturan kirletici ajanlar ortadan kaldırılarak evre kirliliği azaltılması hem de biyoteknolojik ve biyoçeşitlilik açısından önemli araştırmalara yeni bir boyut getireceğini düşünmekteyiz. Türkiye denizlerindeki halofilik olup BTX bileşenlerinin biyodegradasyon yeteneğine sahip mikroorganizmaların tanıtılması açısından bu çalışmanın ilk olması sebebiyle konu ile ilgili bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağı inancındayız.

KAYNAKLAR

Akolkar, A.V., Deshpande, G.M., Ravel, K.N., Durai, D., Nerurkar, A.S., Desai, A.J., “Organic solvent tolerance of *Halobacterium* sp. SP1(1) and its extracellular protease”, *J Basic Microbiol.*, 48: 421–425 (2008).

Al-Mailem, D.M., Sorkhoh, N.A., Marafie, M., Al-Awadhi, H., Eliyas, M., Radwan, S.S., “Oil phytoremediation potential of hypersaline coasts of the Arabian Gulf using rhizosphere technology”, *Bioresour Technol.*, 101:5786–5792 (2010).

Anderson, R.T., Lovley, D.R., “Ecology and biogeochemistry of in situ groundwater bioremediation”, *In: Jones, J.G. (ed.), Advances in Microbial Ecology*, 15: 289-350 (1997).

Anderson, R.T., Lovley, D.R., “Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer”, *Environ. Sci. Technol.*, 34: 2261-2266 (2000).

Antoń, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., “Extremely halophilic *Bacteria* in crystallizer ponds from solar salterns”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3052-3057 (2000).

Anton, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodriguez-Valera, F., Amann, R. and Rossello-Mora, R., “*Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremelyhalophilic member of the Bacteria from saltem crystallizer ponds”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 485-491 (2002).

Arulazhagan, P., Vasudevan, N., Yeom, I. T., “Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment”, *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 7 (4): 839-852 (2010).

Asad, S., Amoozegar, M. A., Pourbabaee, A., Sarbolouki, M. N., Dastgheib, S. M. M., “Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria”, *Bioresource Technol.*, 98 (11): 2082-2088 (2007).

Atlas R., Bragg J., “Bioremediation of marine oil spills: when and when not-the Exxon Valdez experience”, *Microbial Biotechnol.*, 2 (2): 213–221 (2009).

Azetsu, S., “BTEX Degradation at High Salinity in Rozel Point”, Master Thesis, *Oklahoma State University*, USA, 15-35 (2009).

Bahçeci, H., “Fatty acid methyl ester analysis of bacterial isolates from salt lake, turkey and characterization of their extracellular enzymes” ,Doktora Tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi*, Ankara, 20-45 (2004).

Ball, H.A., Reinhard, M., “Monoaromatic hydrocarbon transformation under anaerobic conditions at Seal Beach, California: Laboratory studies”, *Environ.Toxicol. Chem.*, 15: 114-122 (1996).

Bartilson, M., Shingler, V., “Nucleotide sequence and expression of the catechol 2, 3-dioxygenase-encoding gene of phenol catabolizing *Pseudomonas* CF600”, *Gene* 85: 233-238 (1989).

Benlloch, S., Acubasm S.G., López- López, A., Luz, S.P., Rodríguez-Valera, F., “Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR”, *Microb. Ecol.*, 41: 12-19 (2001).

Berlendis S., Cayol, J.L., Verhé, F., Sophie, L., Tholozan, J.L., Ollivier, B., Auria, R., “First evidence of aerobic biodegradation of BTEX compounds by pure cultures of Marinobacter”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160:1992–1999 (2010).

Birbir, M., Kallı N., Johansson, C., “Morphological Characteristics and Sensitivity of Extremely Halophilic Isolates to Antibiotics”, Plants of the Balkan Paninsula: *In to the Next Milleum*, Ed: Gözükırmızı, N., Vol. II., 45-54 (2001).

Birbir, M., Sesal, C., “Extremely halophilic bacterial communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey”, *Turk J. Biol.*, 27: 7–22 (2003).

Birbir, M., Calli, B., Mertoglu, B., Bardavid, R. E., Oren, A., Ogmen, M. N., Ogan, A., “Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23 (3): 309-316 (2007).

Bonfa, M.R.L., Grossman, M.J., Mellado, E., Durrant, L.R., “Biodegradation of aromatic hydrocarbons by haloarchaea and their use for the reduction of the chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced water”, *Chemosphere*, 84:1671–1676 (2011).

Braddock, J.F., McCarthy, K.A., “Hydrologic and microbiological factors affecting persistence and migration of petroleum hydrocarbons spilled in a continuous-permafrost region”, *Environ. Sci. Technol.*, 30: 2626-2633 (1996).

Bragg, J.R., Prince, R.C., Harner, E.J., Atlas, R.M., “Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill”, *Nature*, 368: 413-418 (1994).

Bradley, P.M., Chapelle, F.H., “Rapid toluene mineralization by aquifer microorganisms at Adak, Alaska: implications for nutrient amended bioremediation”, *Environ. Sci. Technol.*, 29: 2778-2781 (1995).

Brusa, T., Borin, S., Ferrari, F., Sorlini, C., Corselli, C., Daffonchio, D., “Aromatic hydrocarbon degradation patterns and catechol 2, 3-dioxygenase genes in microbial cultures from deep anoxic hypersaline lakes in the eastern Mediterranean Sea”, *Microbiol. Res.*, 156: 49-57 (2001).

Burg, B., “Extremophiles as a Source for Novel Enzymes” , *Current Opinion in Microbiol.*, 6: 213-218 (2003).

Burland, S.M., Edwards, E.A., “Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 529-533 (1999).

Caldwell, M.E., Suflita, J.M., “Detection of phenol and benzoate as intermediates of anaerobic benzene degradation under different terminal electronaccepting conditions”, *Environ. Sci. Technol.*, 34: 1216-1220 (2000).

Cavicchioli, R., “Archaea Molecular and Cellular Biology”, Washington, DC ,4-9, 315-318, 341-347 (2007).

Cerniglia, C.E., “Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons”, *Adv. Appl. Microbiol.*, 30: 31–71 (1984).

Chen, C.I., Taylor, R.T., “Thermophilic biodegradation of BTEX by two *Thermus* species”, *Biotechnol. Bioeng.*, 48: 614-624 (1995).

Chen, C.I., Taylor, R.T., “Themophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 121-128 (1997a).

Chen, C.I., Taylor, R.T., “Batch and fed-batch bioreactor cultivations of a *Thermus* species with thermophilic BTEX-degrading activity”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47: 726-733 (1997b).

Coates, J.D., Phillips, E.J.P., Lonergan, D.J., Jenter, H., Lovley, D.R., “Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1531-1536 (1996).

Cook, G.T., “Urease and other biochemical reactions of the *Proteus* group”, *J. Path. Bact.*, 60: 171-181 (1948).

Cuadros-Orellana, S., Pohlschröder, M., Durrant, L.R., “Isolation and characterization of halophilic archaea able to grow in aromatic compounds”, *Int. Biodet. Biodegrad.*, 57: 151-4 (2006).

Çoban, H.S., “Isolation of Haloalkaliphilic Microorganisms from Leather Industry”, Master Thesis, *Izmir Institute of Technology*, İzmir, 4-5, (2004).

Dalvi, S., Azetsu, S., Patrauchan, M.A., Aktaş, D.F., Fathepure, B.Z., “Proteogenomic Elucidation of the Initial Steps in the Benzene Degradation Pathway of a Novel Halophile, *Arhodomonas sp.* Strain Rozel, Isolated from a Hypersaline Environment”, *Appl Environ Microbiol.*, 78:7309-7316 (2012).

Dagley, S., “Microbial degradation of organic compounds in the biosphere”, *Americ. Scientist.*, 63: 681-689 (1975).

Das, N., Chandran, P., “Microbial Degredation of petroleum Hydrocarbon Contaminantas: An Overview”, *Biotechnology Research International.*, (2010).

DasSarma, S., Arora, P., “Halophiles”, *Encyclopedia of Life Science*, (2001).

Deeb, R.A., Alvarez-Cohen, L., “Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*”, *Biotechnol. Bioengin.*, 62: 526-536 (1999).

DeFrank, J., Cheng, T.C., “Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrase from a halophilic bacterial isolate”, *J. Bacteriol.*, 173: 1938-1943 (1991).

Demirci A., “Afyonkarahisar Tekstil Boyar Maddelerin Gideriminde Halofilik Bakterilerin Kullanımı”, Yüksek Lisans Tezi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Afyonkarahisar, 6-83 (2009).

Diaz, M.P., Boyd K.G., Grigson, Steve J.W., Burgess, J.G., “Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers”, *Biotechnol. Bioeng.*, 79, 145-153 (2002).

Ding, J.Y., Lai, M.C., “The biotechnological potential of the extreme halophilic archaea *Haloterrigena sp.* H13 in xenobiotic metabolism using a comparative genomics approach”, *Environ Technol.*, 31: 905–914 (2010).

Dolfing, J., Zeyer, J., Blinder-Eicher, P., Schwarzenbach, R.P., “Isolation and characterization of a bacterium that mineralized toluene in the absence of molecular oxygen”, *Arch. Microbiol.*, 154: 336-341 (1990).

Elçin, A.E., Erkoç, F., Sarıkaya, R., Selvi, M., “ Mikrobiyolojik Uygulamalar”, *Başak Matbaacılık*, Ankara, 58-62 (2004)

Evans, P.J., Mang, D.T., Kim, K.S. and Young, L.Y., “Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1139-1145 (1991).

- Fernandez-Linares, L., Acquaviva, M., Bertrand, J.C., Gauthier, M., "Effect of sodium chloride concentration on growth and degradation of eicosane by the marine halotolerant bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*", *Syst. Appl. Microbiol.*, 19: 113-121 (1996).
- Fuse, H., "Oxidation of organic compounds by bacteria", Patent JP10128385, (1998).
- Galinski, E.A., "Osmoadaptation in bacteria", *Adv. Microb. Physiol.*, 37: 273-328 (1995).
- Garcia, M. T., Ventosa, A., Mellado, E., "Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria", *FEMS Microbiol. Ecol.*, 54:97-109 (2005a).
- García, M.T., Gallego, V., Ventosa, A., Mellado, E., "*Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55:1789–1795 (2005b).
- Garcia, M.T., Mellado, E., Ostos, J.C., Ventosa, A., "*Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54:1723–1728 (2004c).
- Gibson, D.T., "Cardini, G.E., Masales, F.C., Kallio, R.E. Incorporation of oxygen-18 into benzene by *Pseudomonas putida*", *Biochem.*, 9: 1631-1639 (1970).
- Gibson, D.T., Subramania, V., "Microbial degradation of aromatic hydrocarbons" In: Gibson, D.T. (ed.), *Microbial degradation of organic compounds. Marcel Dekker, Inc.*, New York. 181-252 (1984).
- Gieg, L.M., Kolhatkar, R.V., McInerney, M.J., Tanner, R.S., Harris, S.H. Jr., Sublette, K.L. and Sufflita, J.M., "Intrinsic bioremediation of petroleum hydrocarbons in a gascondensate-contaminated aquifer", *Environ. Sci. Technol.*, 33: 2550-2560 (1999).
- Gonzales, C., Gutierrez, C., Ramirez, C., "*Halobacterium vallismortis* sp. nov. An Amylolytic and Carbohydratemetabolizing Extremely halophilic Bacterium", *Canadian J. Microbiol.*, 24: 710-715 (1978).
- Grant, S., Grant, W.D., Jones, B.E., Kato, C., Li, L., "Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern", *Extremophiles*, 3: 139-145 (1999).
- Guo, J., Zhou, J., Wang, D., Yang, J., Li, Z., "The new incorporation bio-treatment technology of bromoamine acid and azo dyes wastewaters under high-salt conditions", *Biodegradation*, 19:93-98 (2008).

Ha, D.J., Joo, W.A., Han, G.Y., Kim, C.W., “Proteome analysis of *Halobacterium salinarum* and characterization of proteins related to the degradation of isopropyl alcohol”, *Biochim Biophys Acta.*, 1774: 44–50 (2007).

Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., Shutsubo, K., “Petroleum biodegradation in marine environments”, *J. Molecular Microbiol. Biotechnol.*, 1(1): 63-70 (1999).

Hartmann, L., “Historical Development of Wastewater Treatment Processes”, *in Biotechnology: Environmental Processes*, J Winter (Ed.), 1:5-16, (1999).

Harwood, C.S., Parales, R.E., “The ketoadipate pathway and biology of selfidentity”, *Ann. Rev. Microbiol.*, 50: 553-590 (1996).

Hinteregger, C., Streichsbier, F., “*Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic wastewater”, *Biotechnol. Lett.*, 19:1099–1102 (1997).

Högn, T., Jaenicke, L., “Benzene metabolism of *Moraxella* species”, *Eu. J. Biochem.*, 30: 369-375 (1972).

İnternet: “Benzen, Toluene and ortho-, meta-, para-, Xsilen.svg”
http://en.wikipedia.org/wiki/File:Benzen_Toluene_and_ortho-,meta-,and_para-xylene.svg (2012).

İnternet: “Tuz Gölü-Şereflikoçhisar/Ankara”
http://www.gokceadaliyiz.com/gallery/gokceada_tuz_golu.jpg (2009)

İnternet: “Death Sea View”,
<http://d30mmglg94tqnw.cloudfront.net/wpcontent/plugins/magicgallery/uploads/27/dead%20sea.jpg> (2010).

İnternet: “Evaporation ponds on the Great Salt Lake west of Ogden, Utah, USA”,
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Great_Salt_Lake,_Utah_USA_\(2006\).jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Great_Salt_Lake,_Utah_USA_(2006).jpg) (2006).

İnternet: İnönü Üniversitesi “Bakteriyolojik Besiyerleri Triple Sugar İron Besiyeri”
<http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/iozerol/BAKTERIYOLOJI/BESIYERI/tsiagar.htm> (2012).

İnternet: Austin Community College , “DNase Test” ,
http://www.austincc.edu/microbugz/dnase_test.php (2010).

Iida, T., Sumita, T., Ohta, A., Takagi, M., “The cytochrome P450ALKmultigene family of an n-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members”, *Yeast*, 16 (12):1077-1087 (2000).

James, S. R., Dobson, S. J., Franzmann, P. D., McMeekin, T. A., “Halomonas meridiana, a new species of extremely halotolerant bacteria isolated from Antarctic saline lakes”, *Syst. Appl. Microbiol.*, 13, 270-277 (1990).

Jan, B., Beilen, V., Neuenschwunder, M., “Rubredoxins involved in alkane degradation”, *J. Bacteriol.*, 184 (6) :1722–1732 (2003).

Jördening, H. J., Winter, J., Environmental Biotechnology: Concepts and Applications, *WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim*, ISBN: 3(527):30585-8 (2005).

Kazumi, J., Caldwell, M.E., Suflita, J.M., Lovley, D.R., Young, L.Y., “Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments”, *Environ. Sci. Technol.*, 31: 813-818 (1997).

Kılıç, A.M., Uyanık, E., “Tuz Gölü’nde Oluşan Kirlenmenin Göl Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması”, *IX. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu*”, İzmir, 118-119 (2001).

Kulichevskaya, I.S., Milehina, E.I., Borzenkov, I.A., Zvyagintseva, I.S., Belyaev, S.S., “Oil hydrocarbon oxidation by extremely halophilic archaeobacteria”, *Mikrobiologiya*, 60: 860-866 (1991).

Kumar, A., Kumar, S., Kumar, S., “Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194”, *Biochemical Engineering Journal*, 22 (2): 151-159 (2005).

Kushner, D.J., “The Halobacteriaceae ”, In C. Woese and R.S. Wolfe, S (ed.), The bacteria, *Academic Press*, Inc, London, (8): 171-214 (1985).

Langenhoff, A.A.M., Brouwers-Ceiler, D.L., Engelberting, J.H.L., Quist, J.J., Wolkenfelt, J.G.P.N., Zehnder, A.J.B., Schraa, G., “Microbial reduction of manganese coupled to toluene oxidation” , *FEMS Microbiol. Ecol.*, 22: 119-127 (1997).

Leung, K.T., Nandakumar, K., Sreekumari, K., Lee, H., Trevors, T., “Biodegradation and Bioremediation of Organic Pollutants in Soil” , *Modern Soil Microbiology* ,2nd ed., 522-549 (2006).

Lefebvre, O., Vasudevan, N., Moletta, R., “Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reaktor” , *Water Research* , 39:1471-1480 (2005).

Li H., Zhang Q., Wang X.L, Ma X.Y., Lin K.F., Liu Y.D., Gu J., Lu S., Shi L., Lu Q., Shen T.T., “Biodegradation of Benzen Homologues in Contaminated Sediment of the East China Sea”, *Bioresource Technology*, 124: 129-136 (2012).

Lovley, D.R., Lonergan, D.J., “Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and *p* cresol by the dissimilatory iron-reducing organisms GS-15”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1858-1864 (1990).

Lovley, D.R., Woodward, J.C., “Mechanisms for chelator stimulation of microbial Fe (III)-oxide reduction”, *Chem. Geol.*, 132: 19-24 (1996).

Lovley, D.R., Woodward, J.C., Chapelle, F.H., “Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe (III) forms” , *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 288- 291 (1996).

Madern, D., Ebel, C., Zaccari, G., “Halophilic adaptation of enzymes”, *Extremophiles*, 4: 91-98 (2000).

Maeng, J. H. O., Sakai, Y., Tani, Y., Kato, N., “Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1,” , *Journal of Bacteriology*, 178 (13): 3695–3700 (1996).

Ma’or Z., Simon-Meshulam G., Yehudah, S., Gavrieli, J.A., “Antiwrinkle and skin -moisturizing effects of a mineral – algal –botanical complex” *J Cosmet Sci.*, 51: 27–36 (2000).

Margesin, R., Schinner, F., “Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 650-663 (2001).

Maltseva, O., McGowan, C., Fulthorpe, R., Oriel, P., “Degradation of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteri”, *Microbiol.*, 142: 1115-1122 (1996).

McDonald, I. R., Miguez, C. B., Rogge, G., Bourque, D., Wendlandt, K.D., Groleau, D., Murrell, J.C., “Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments,” , *FEMS Microbiology Letters*, 255 (2): 225–232, (2006).

Melcher, R.J., Apitz, S.E., Hemmingsen, B.B., “Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2858–2868 (2002).

Mnif, S., Chamkha, M., Sayadi, S., “Isolation and characterization of *Halomonas* sp strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions” , *J. Appl. Microbiol.*, 107:785–794 (2009).

- Morgan, P., Lewis, S.T. and Watkinson, R.J., “Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in gas-condensate-contaminated groundwater”, *Environ. Poll.*, 82: 181-190 (1993).
- Mun˘oz, J. A., Perez-Esteban, B., Esteban, M., de la Escalera, S., Gomez, M. A., Martı´nez-Toledo, M. V., Gonzalez-Lopez, J., “Growth of moderately halophilic bacteria isolated from sea water using phenol as the sole carbon source”, *Folia Microbiol.*, Praha, 46, 297–302 (2001).
- Mutlu, M.B., “Tuz Gölü Bakterilerinin Karakterizasyonu ve Mevsimsel Dağılımı” , Doktora Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir, 1-162 (2006).
- Nicholson, C.A., “Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Halophilic and Halotolerant Microorganisms”, Master Thesis, *Oklahoma State University*, USA,3-40 (2005).
- Nicholson, C. A., Fathepure, B. Z., “Aerobic biodegradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma”, *FEMS microbiology letters*, 245 (2): 257-262 (2005).
- Onbaşılı, D., “Çevredeki Bazı Organik Kirleticilerden Biyoteknolojik Olarak Bazı İkincil Metabolitlerin Üretimi”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 16-63 (2006).
- Onbaşılı, D., Aslım, B., Çelik, G.Y., “ Investigation of Metabolite Productions and Degradation of Hazardous Organic Pollutants by *Pseudomonas* spp.” , *Journal of Applied Biological Sciences.*, 5(2): 9-14 (2011).
- Oren, A., “Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments”, *CRC Pres.*, Boca Raton, London (1999).
- Oren, A., “Salts and brines”, Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space, In: Whitton BA and M Potts (Eds.), *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, 281– 306 (2000).
- Oren, A., “The order Haloanaerobiales”, The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, In: Dworkin M, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer and E Stackebrandt (Eds.), 3rd ed., *Springer -Verlag*, New York , (2001).
- Oren, A., “Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications” , *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 28: 56-63 (2002).

Özcan, B., “Türkiye'den Halofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu” , Doktora Tezi, *Ankara Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 5-84 (2004).

Perry, J. J., “Microbial metabolism of cyclic alkanes,” in Petroleum Microbiology, R. M. Atlas, Ed., *Macmillan*, New York, NY, USA, 61–98, (1984).

Rabus, R., Widdel, F., “Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria.”, *Arch. Microbiol.*, 163: 96-103 (1995).

Rainey, F.A., Zhilina, T.N., Boulygina, E.S., Stackebrandt, E., Tourova T.P., Zavarzin, G.A., “The taxonomic status of the fermentative halophilic anaerobic bacteria: description of Halobacteriales ord. nov., Halobacteroidaceae fam. nov., Orenia gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level”, *Anaerobe*, 1: 185-199 (1995).

Reardon, K.F., Mosteller, D.C., Bull Rogers, J.D., “Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1”, *Biotechnol. Bioengin.*, 69: 385-400 (2000).

Ridgeway, H.F., Safarik, J., Phipps, D., Carl, P., Clark, D., “Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3565-3575 (1990).

Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Kushner, D.J., “*Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate - utilizing extreme halophile.” *System. Appl. Microbiol.*, 4; 369-381 (1983).

Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G., Imhoff, J.F., “Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multipond saltern”, *Microbiol. Ecol.*, 11: 107-115 (1985).

Romanenko, L. A., Schumann, P., Rohde, M., Mikhailov, V. V., Stackebrandt, E., “*Halomonas halocynthiae* sp. nov., isolated from the marine ascidian *Halocynthia aurantium*”, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52 (5), 1767-1772 (2002).

Romano, I.; Giordano, A.; Lama, L.; Nicolaus, B.; Gambacorta, A., “*Halomonas campaniensis* sp. nov., a Halophilic Bacterium Isolated from a Mineral Pool of Campania Region, Italy.” , *Syst. Appl. Microbiol.*, 28 (7): 610-8. (2005).

Rhykerd, R.L., Weaver, R.W., McInnes, K.J., “Influence of salinity on bioremediation of oil in soil”, *Environ. Pollut.*, 90: 127-130 (1995).

Sei, A., B. Z. Fathepure. "Biodegradation of BTEX at high salinity by an enrichment culture from hypersaline sediments of Rozel Point at Great Salt Lake." *Journal of applied microbiology*, 107 (6): 2001-2008 (2009).

Shapir, N., Mandelbaum, R.T., Gottlieb, H., "Atrazine degradation in saline wastewater by *Pseudomonas* sp. strain ADP", *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, 20:153-159 (1998).

Spring, S., Ludwig, W. Marquez, M. C. , Ventosa, A. and Schleifer, K.H., "Halobacillus gen nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov.", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46:492-496 (1996).

Stan-Lotter, H., Pfaffenhuemer, M., Legat, A., Buse, H.J., Radax, C., Gruber, C., "Halococcus dombrowskii sp. nov., an archaeal isolate from a Permo-Triassic alpine salt deposit", *Int. J. System. Evol. Microbiol.*, 52:1807–1814 (2002).

Stoner, D. L., "Biotechnology for the treatment of hazardous waste", *CRC Pres.* Florida, 202 (1993).

Tamer, A. Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Busalıoğlu, M. ve Oğultekin, R., "Mikrobiyoloji Laboratuvarı Klavuzu", *Baskı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Teks.*, İzmir, 55: 260 (1989).

Tapilatu, Y., Grossi, V., Acquaviva, M., Militon, C., Bertrand, J., Cuny, P., "Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France)" *Extremophiles*, 14: 225-31 (2010).

Temiz, A., "Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri" , *Şafak Matbaacılık*, 134-135,

Tomson,G.A., Hochstein, L., "Halobacterium saccharovororum sp.nov.,a carbonhydratemetabolizing extremely halophilic bacterium.", *Can.J.Microbiol.*, 22:584-591 (1976).

Trüper, H.G., Severin, J., Wohlfarth, A., Muller, E., Galinski, E.A., "Halophily, taxonomy, phylogeny, and nomenclature", General and applied aspects of halophilic microorganisms, In: Rodrigues-Valera, F. (ed.), *Plenum Press*, New York. 3-7 (1991) .

Ulrici W., "Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants," in Environmental Process II. *Soil Decontamination Biotechnology*, H. J. Rehm and G. Reed, Eds., 11: 5-42 (2000).

Van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., Van Loon A., "Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases", *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (1):59–65 (2006).

Ventosa , A., Nieto , J.J., Oren , A., "Biology of moderately halophilic aerobic bacteria", *Microbial Mol Biol.*, Rev 62: 504-544 (1998).

Villatoro-Monzon, W.R., Mesta-Howard, A.M., Razo-Flores, E., "Anaerobic biodegradation of BTEX using Mn (IV) and Fe (III) as alternative electron acceptors", *Water Sci. Technol.*, 48: 125-131 (2003).

Vogel, T.M., Grbić-Galić, D., "Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentation transformation", *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 200-202 (1986).

Vogel, T.M., Criddle, C.S., McCarty, P.L., "Transformation of halogenated aliphatic compounds", *Environ. Sci. Technol.*, 21: 722-736 (1987).

Watzman , H., "Left for dead", *New Scientist*, Feb. 8: 37–41 (1997).

Weber, W.J., Corseuil, H.X., "Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates", *Wat. Res.*, 28: 1407-1414 (1994).

Yalçın, F., "Characterization of Bacterial Isolates from Salt Lake", Yüksek Lisans Tezi, *The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University*, Ankara(2000).

Yavuztürk B., "Ekstremofillerin Ülkemiz Çamaltı Tuzlasından İzole Edilmedi ve Tanılanması" , Yüksek Lisans Tezi , *Marmara Fen Bilimleri Enstitüsü* 18- 73 (2005).

Yu, H., Kim, B.J., Rittmann, B.E., "The roles of intermediates in biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene by *Pseudomonas putida* F1", *Biodegradation*, 12: 455- 463 (2001).

Zamanian, M., Mason, J.R. "Benzene dioxygenase in *Pseudomonas putida* subunit composition and immuno-cross-reactivity with other aromatic dioxygenases", *Biochem. J.*, 244: 611-616 (1987).

Zvyagintsev, I.S., Belyaev, S.S., Borzenkov, I.A., Kostrikina, N.A., Milekhina, E.I., Ivanov, M.V., "Halophilic archaeobacteria from the Kalamkass oil field", *Microbiology*, 64:67–71(1995).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı :BALTACI, Nurnehir
Uyruđu :T.C.
Doğum tarihi ve yeri :03.07.1987/ Keçiören
Medeni hali :Bekar
e-mail :nurnehirgazi@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Ayrancı Yabancı Dil Ağırlıklık Lise	2006

Yabancı Dil

İngilizce, Japonca