



**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇANKIRI ÇANKAYA TUZ MADENİ'NDEN HALOFİLİK ARKELERİN**  
**İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**EVİRİM YILDIZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Antakya/HATAY**

**AĞUSTOS 2008**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	V
ABSTRACT .....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Arkeler.....	3
2.1.1. Halofilik Arkeler .....	3
2.2. <i>Halobacteriales</i> Ordosunun Özellikleri .....	8
2.2.1. <i>Halobacterium</i> Cinsi .....	9
2.2.2. <i>Halobaculum</i> Cinsi.....	10
2.2.3. <i>Halorubrum</i> Cinsi.....	10
2.2.4. <i>Haloarcula</i> Cinsi .....	11
2.2.5. <i>Natronomonas</i> Cinsi .....	11
2.2.6. <i>Halococcus</i> Cinsi.....	11
2.2.7. <i>Natrialba</i> Cinsi.....	12
2.2.8. <i>Natronobacterium</i> Cinsi .....	12
2.2.9. <i>Halogeometricum</i> Cinsi .....	13
2.2.10. <i>Natronococcus</i> Cinsi.....	13
2.2.11. <i>Haloferax</i> Cinsi .....	13
2.2.12. <i>Natrinema</i> Cinsi .....	14
2.2.13. <i>Haloterrigena</i> Cinsi.....	14

2.2.14. <i>Natronorubrum</i> Cinsi (düzeltilmiş).....	14
2.2.15. <i>Halosimplex</i> Cinsi .....	15
2.2.16. <i>Halobiforma</i> Cinsi .....	15
2.2.17. <i>Halorhabdus</i> Cinsi (düzeltilmiş).....	16
2.2.18. <i>Halomicrobium</i> Cinsi.....	16
2.2.19. <i>Halosarcina</i> Cinsi.....	16
2.2.20. <i>Halostagnicola</i> Cinsi .....	17
2.2.21. <i>Halalkalicoccus</i> Cinsi.....	17
2.2.22. <i>Halopiger</i> Cinsi .....	17
2.2.23. <i>Haloplanus</i> Cinsi.....	18
2.2.24. <i>Halodaptatus</i> Cinsi .....	18
2.2.25. <i>Haloquadratum</i> Cinsi .....	18
2.2.26. <i>Halovivax</i> Cinsi .....	19
2.2.27. <i>Natronolimnobi</i> Cinsi.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	20
3.1 Materyal.....	20
3.1.1 Tuzlu Su Örnekleri .....	20
3.1.2. Tuzlu Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	20
3.1.3. Halofilik Arkeler .....	20
3.1.4. Besiyeri.....	20
3.1.5. Mikroskopik İnceleme .....	21
3.1.6. Antibiyotikler .....	21
3.1.7. İnce Tabaka Kromatografisi .....	21
3.1.8. Elektroforez.....	21

3.2 Yöntem .....	22
3.2.1. Tuzlu Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	22
3.2.2. Halofilik Arkelerin İzolasyonu ve Kültürü .....	22
3.2.3. Koloni Morfolojisi ve Pigmentasyon .....	22
3.2.4. Gram Boyama ve Hücre Morfolojisi.....	23
3.2.5. Biyokimyasal Testler .....	23
3.2.6. Antibiyogram Testi.....	25
3.2.7. Polar Lipitlerin İnce Tabaka Kromatografisi .....	25
3.2.7.1. Polar Lipit Ekstraksiyonu.....	25
3.2.7.2. İnce Tabaka Kromatografisi.....	26
3.2.8. Tüm Hücre Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) .....	26
3.2.8.1. Protein Ekstraksiyonu .....	26
3.2.8.2. SDS-PAGE.....	26
3.2.9. İzolatların Üreme İçin Gerekli Minimum ve Optimum Tuz (NaCl) Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	27
3.2.10. Hücre Lizisini Önleyen Minimum Tuz (NaCl) Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	29
4.1. Tuzlu Su Örneklerinin Kimyasal Özellikleri.....	29
4.2. Halofilik Arke İzolatları .....	30
4.3. Halofilik Arke İzolatlarının Gram Reaksiyonu, Hareket, Koloni ve Hücre Morfolojisi Özellikleri .....	31
4.4. Halofilik Arke İzolatlarının Biyokimyasal Özellikleri.....	38



4.5. Halofilik Arke İzolatlarının Gelişimi İçin Gerekli Minimum ve Optimum NaCl Konsantrasyonu .....	42
4.6. Halofilik Arke İzolatlarının Hücre Lizisini Önleyen Minimum NaCl Konsantrasyonları .....	42
4.7. Halofilik Arke İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları.....	43
4.8. Halofilik Arke İzolatlarının Tüm Hücre Protein Profilleri.....	45
4.9. Halofilik Arke İzolatlarının Membran Polar Lipitlerinin Analizi.....	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	50
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	59
TEŞEKKÜR .....	60

## ÖZET

ÇANKIRI ÇANKAYA TUZ MADENİ'NDEN HALOFİLİK ARKELERİN  
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Çankaya tuz madeninden alınan ve pH'ı 6.61-7.06 ve Na<sup>+</sup> miktarı 18600-102300 ppm olarak belirlenen tuzlu su örneklerinden, %25 NaCl içeren kompleks besiyeri kullanılarak halofilik arkeler izole edilmiştir. Toplam 15 izolat arasından koloni morfolojisi, hücre morfolojisi ve tüm hücre protein profillerine göre farklılık gösterdiği tespit edilen 7 izolat, Gram reaksiyonu, hareketlilik, minimum optimum ve hücre lizisini önleyen NaCl konsantrasyonları, çeşitli biyokimyasal özellikleri, farklı antibiyotiklere duyarlılıkları ve membran polar lipid içerikleri yönünden incelenmiştir. Buna göre izolatlardan 6 tanesinin Gram(-) ve hareketli bir tanesinin Gram değişken ve hareketsiz olduğu belirlenmiştir. Kırmızı-pembe tonlarında koloni rengine sahip izolatlardan üçünün çubuk, üçünün pleomorfik ve birinin kok şekilli oldukları gözlenmiştir. İzolatların optimum tuz konsantrasyonlarının 4-4.5 M ve hücre lizisini önleyen tuz konsantrasyonlarının ise kok şekilli izolat hariç %10 ve 12,5 olduğu bulunmuştur. Tüm halofilik arke izolatlarının oksidaz ve katalaz aktivitesine sahip oldukları, sadece bir izolatın nitrat varlığında anaerobik üreyebildiği, L-arjinin ve TMAO varlığında anaerobik üreyemedikleri ve bazı şekerleri fermente edebildikleri ancak gaz üretmedikleri tespit edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda tüm arkeal izolatların Basitrasin ve novobiyosin antibiyotiklerine karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir. İnce tabaka polar lipid profillerine göre, izolatların tümünde fosfatidilgliserol (PG), fosfatidil gliserofosfat metil esteri (PGP-Me) ve 2 izolat hariç fosfatidil gliserosülfat (PGS) fosfolipitleri bulunmuştur. Kromatografi sonucunda triglikozil dieter (TGD-2) içeren pleomorfik iki izolatın *Haloarcula* cinsine ve sülfatlı glikozil dieter (S-DGD-3) içeren çubuk şekilli üç izolatın *Halorubrum* cinsine ait olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca kok şekilli izolatın bir adet ve pleomorfik şekilli diğer izolatın ise iki adet tanımlanmamış glikolipit içerdikleri tespit edilmiştir.

2008, 60 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Halofilik arke, Çankırı tuz madeni, izolasyon, karakterizasyon, PAGE, polar lipid.

## ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HALOPHILIC ARCHAEA  
FROM ÇANKIRI ÇANKAYA SALT MINE

Making use of complex medium with 25% NaCl content halophilic archaea were isolated from brine samples from Çankaya salt mine (Çankırı), with pH value 6.61-7.06 and Na<sup>+</sup> 18600-102300 ppm. Out of totally 15 isolates, 7 of them varying in colony morphology, cell morphology and whole cellular protein profiles were studied in the view of Gram reaction, motility, both minimum, optimum NaCl concentration and that preventing cellular lyse, certain biochemical properties, sensitivity to varies antibiotics and membran polar lipid content. According to results, 6 of the isolates were found to be Gram (-) and motile while one isolate was Gram variable and nonmotile. It was found out that among the isolates having red-pink colony pigmentation, three were rod shaped, three were pleomorphic and one was in coc cell morphology. It was observed that optimum salt concentrations of isolates ranged between 4-4.5 M while cellular lyse preventing salt concentrations ranged between 10% and 12.5% excluding that of coc cellular isolate. The results indicated that all halophilic archaea isolates exhibited oxidase and catalase activity, that only one of the isolates could reproduce anaerobic in the presence of nitrate while none had anaerobic reproduction in the presence of L-arginine and TMAO and that they could ferment certain carbohydrates but they didn't produce any gases. It was found that all archaeal isolates were sensitive to bacitracine and novobiocine antibiotics. According to thin layer polar lipid profiles, all isolates contained phosphatidyl glycerol (PG), phosphatidyl glycerophosphate methyled ester (PGP-Me) and phosphatidyl glycerosulphate (PGS) excluding two isolates. On the basis of chromatography it was considered that two of pleomorphic isolates containing three sulfated triglycosyl glycolipid (TGD-2) should be belong to *Haloarcula* genus and three rod shaped isolates containing sulphated glycosyl diether (S-DGD-3) should be belong to *Halorubrum* genus. It was also found that one coc and one pleomorphic shaped isolate contained some unidentified glycolipid.

2008, 60 pages

**Key Words:** Halophilic archaea, Çankırı salt mine, isolation, characterization, PAGE, polar lipid.

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

APS	Amonyum Persülfat
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
L	Litre
mA	Miliamper
mL	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molar
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SG	Sehgal-Gibbons Besiyeri
TEMED	Tetrametil Etilen Diamin
V	Volt
Me	Milieuvalent
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

**ÇİZELGELER DİZİNİ****Sayfa**

<b>Çizelge 4.1.</b> Çankırı Çankaya tuz madeninden alınan tuzlu su örneklerinin kimyasal analiz sonuçları.....	29
<b>Çizelge 4.2.</b> İzolatların hücre morfolojileri, gram reaksiyonları ve hareket özellikleri .....	31
<b>Çizelge 4.3.</b> Halofilik arke izolatlarının koloni morfolojisi özellikleri.....	37
<b>Çizelge 4.4.</b> Halofilik arke izolatlarının bazı biyokimyasal test sonuçları.....	40
<b>Çizelge 4.5.</b> Halofilik arke izolatlarının çeşitli karbohidratlardan asit ve gaz üretimi sonuçları .....	41
<b>Çizelge 4.6.</b> Halofilik arke izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık test sonuçları .....	43

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>Şekil 2.1.</b> Gliserole eter bağlı fitanil zinciri yapısı.....	5
<b>Şekil 4.1.</b> SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH2 izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm) .....	33
<b>Şekil 4.2.</b> SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH3 izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm) .....	33
<b>Şekil 4.3.</b> SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CHA1 izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm) .....	34
<b>Şekil 4.4.</b> SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CHC izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm) .....	34
<b>Şekil 4.5.</b> SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH7 izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm) .....	35
<b>Şekil 4.6.</b> SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH8K izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm) .....	35
<b>Şekil 4.7.</b> SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH8B izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm) .....	36
<b>Şekil 4.8.</b> SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH11 izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm) .....	36
<b>Şekil 4.9.</b> SG agar besiyerinde 37.5°C 15 gün üretilen CHA1 izolatının koloni morfolojisi .....	37
<b>Şekil 4.10.</b> Halofilik arke izolatlarının SDS-PAGE hücre protein profilleri .....	46
<b>Şekil 4.11.</b> Standart suş ve izolatların polar lipid profillerinin ince tabaka kromatogramı.. .....	48

## 1. GİRİŞ

Halofilik arkeler, *Archaea* domaini *Euryarchaeota* filumu, *Halobacteria* sınıfına dahil *Halobacteriales* ordosunun tek familyası olan *Halobacteriaceae* altında toplanmıştır. *Halobacteriaceae* ilk olarak 1974 yılında Gibbons tarafından, gelişebilmeleri için minimum 2.0 M NaCl gerektiren obligat halofilik mikroorganizmaları içeren familya olarak tanımlanmıştır (Savage ve ark., 2007).

*Halobacteriaceae* familyası üyeleri, tuz gölleri, sodalı göller, tuzlalar ve tuzlu topraklar gibi toplam tuz konsantrasyonu, iyonik kompozisyon ve pH bakımından çeşitlilik gösteren yüksek tuzlu ortamlarda yoğun bir şekilde bulunmaktadır (Castillo ve ark., 2007). Hatta büyük bir kısmı pembe-kırmızı renk tonlarında olan familya üyeleri yüksek tuzlu ortamlarda yoğun olarak bulduklarından dolayı bu ortamların da kırmızı renkte görünmesine neden olabilmektedirler (Castillo ve ark., 2006 a).

*Halobacteriaceae* familyası üyeleri genel olarak; aerobik yada fakültatif anaerobik, içerdikleri karotenoid pigmentlerinden dolayı pembe-kırmızı renk tonlarında ve çok çeşitli hücre şekillerinde bulunabilen (çubuk, kok, üçgen, kare, yamuk), katalaz ve oksidaz aktivitelerine sahip, Gram (-), kemoorganotrofik ve üremeleri için minimum 1.5 M NaCl'e ihtiyaç duyan organizmalardır (Castillo ve ark., 2007). Üremeleri için 1.5 M NaCl gereksinimleri olmasına rağmen bazı familya üyeleri deniz suyu ve kükürtçe zengin kaynak suyu gibi düşük tuzlu çevrelerden de izole edilebilmişlerdir (Rodriguez-Valera, 1979, Elshahed ve ark., 2004).

*Halobacteriales* ordosuna dahil olan halofilik arkeler özellikle sahip oldukları tuz-bağımlı enzim ve bakteriorodopsin gibi proteinlerinden dolayı, gıda, elektronik, tıp alanlarında ve organik maddelerin parçalanması, kazalar sonucunda doğal ortama dökülen petrolün bioremediasyonu gibi önemli biyoteknolojik potansiyel ve uygulamalara da sahiptirler.

Halofilik arkelerin taksonomik olarak sınıflandırılması geçmiş dönemlerde biyokimyasal özellikler, hücre morfolojisi ve üreme özellikleri gibi fenotipik verilere dayalı geleneksel yöntemlere göre yapılmıştır. Ancak daha sonraki yıllarda ve günümüzde halofilik arkelerin taksonomik pozisyonunun belirlenmesi, fenotipik özelliklerin yanı sıra, kimyasal (özellikle polar lipid kompozisyonu) ve moleküler (16S rRNA sekans analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu) verilerin de dahil edildiği polifazik

bir yaklaşıma göre yapılmaktadır (Castillo ve ark., 2006 b; Guti rrez ve ark., 2007). Moleküler verilerin taksonomik çalışmalara dahil edilmesiyle birlikte özellikle cins seviyesindeki çeşitlilik oranında artış gözlenmiştir. Buna bağlı olarak bazı cinsler yeniden tanımlanmış ve bazı tanımlanmış türler ise farklı cinslere dahil edilmiştir. Günümüzde değişik yüksek tuzlu (tuz g lleri, tuzlalar, tuz madenleri, tuzlanmış yiyecek ve deri) ya da daha düşük tuz konsantrasyonuna sahip çevrelerde (deniz suyu, kükürtlü kaynak suları) izolasyon çalışmaları sürdürülmekte ve yeni cins ve türlerin tanımlanmasına devam edilmektedir. Özellikle son yıllarda cins ve tür sayısında önemli artış gözlenmiştir. Örneğin, 2006 yılında 20 farklı cins ve 60 farklı tür rapor edilirken (Goh ve ark., 2006) 4 Temmuz 2008 tarihi itibariyle *Halobacteriaceae* familyası altında 27 farklı cins ve 113 farklı tür bulunduğu belirtilmiştir (<http://www.bacterio.cict.fr/classifgenerafamilies.html#halobacteriaceae>).

Dünyanın farklı tuzlu alanlarından halen halofilik arke izolasyon ve tanımlamaları büyük bir hızla devam ederken ülkemizde de halofilik arkelerin izolasyon ve karakterizasyonları ile ilgili çalışmalara ilgi duyulmaya başlanmıştır ve farklı araştırma grupları tarafından halofilik arkelerle ilgili çalışmalara devam edilmektedir (Elevi ve ark., 2004; Birbir ve ark., 2004; Ozcan ve ark., 2006; Ozcan ve ark., 2007).

Bu alışma ile, ankırı ankaya Tuz Madeni'nden toplanan tuzlu su örneklerinden halofilik arkelerin izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda halofilik arke izolasyonu yapılan tuzlu su örneklerinin kimyasal analizi, izolatların koloni ve hücre morfolojileri, biyokimyasal özellikleri, çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları, minimum ve optimum NaCl gereksinimleri, hücre lizisini önleyen minimum NaCl konsantrasyonları ile birlikte membran polar lipid ve tüm hücre protein profilleri belirlenmiştir.



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Arkeler

Sınıflandırmada kullanılan moleküler seviyedeki çalışmaların canlılar arasındaki evrimsel ilişkileri, klasik sınıflandırma yöntemlerine göre daha iyi ortaya çıkardığının anlaşılması üzerine 16S ve 18S rRNA dizi analizlerini içeren moleküler karşılaştırmalar sonucunda canlılar, 1977 yılında Carl Woese tarafından bakteriler, ökaryotlar ve arkeler olmak üzere 3 temel gruba ayrılmıştır. Üç temel gruba en üst hiyerarşik takson olan Domain adı verilmiştir (Woese ve ark., 1990). Arke domaini 3 farklı grup organizma içermektedir; Ekstrem Halofilik arkeler, Metanojenler ve Hipertermofilik arkelerdir.

#### 2.1.1. Halofilik Arkeler

*Halobacteriales* ordosuna ait halofilik arkeler çok çeşitli yüksek tuzlu ekosistemlerde bulunabilmektedirler. Halofilik arkelerin doğadaki dağılımını belirleyen en önemli faktörler; mevcut toplam tuz konsantrasyonu, tuzların iyonik kompozisyonu ve mevcut besinlerdir. Halofilik arkelerin çoğu türleri, 2.5-3 M'in altındaki tuz konsantrasyonlarında gelişmemektedirler. 1-2 M tuzlu su içerisinde hücreler zarar görmekte ve türlerin çoğu ise lizise uğramaktadır. Bu nedenle, yeterli miktarda tuz konsantrasyonunun bulunması halofilik arkelerin gelişebilmeleri için ön şarttır. Dünya üzerinde halofilik arkeler, evaporasyonla denizden kaynaklanan ve baskın iyon kompozisyonu  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  olan deniz kökenli (thalassohaline) ve oldukça farklı iyonik kompozisyona ait deniz kökenli olmayan (athalassohaline) sularda yaşamaktadırlar. İsrailde bulunan Ölü Deniz divalent katyonlar yönünden zengin bir deniz kökenli olmayan sucul bir ekosistemdir ve iyonik kompozisyonu; 1.9 M  $\text{Mg}^{2+}$ , 0.4 M  $\text{Ca}^{2+}$ , 1.7 M  $\text{Na}^+$ , 0,14 M  $\text{K}^+$  şeklindedir. Kırmızı halofilik arkeler ayrıca yüksek tuzlu, yüksek pH değerlerine sahip, Magadi gölü (Kenya), Wadi Natürn gölü (Mısır) gibi soda göllerinde de yoğun olarak bulunmaktadır. Doğal ortamların yanı sıra bu grup organizmalar yüksek tuz içeren tuzlanmış et, deri, sos gibi yapay ortamlardan da izole edilmişlerdir (Oren, 2001).

Halofilik arkelerin büyük çoğunluğu yüksek karotenoid içerdiklerinden dolayı nötral veya alkali aşırı tuzlu ortamlarda yüksek yoğunluğa ulaştıklarında buldukları

ortamın kırmızı renk tonlarda görünmelerine neden olmaktadır (Arahal ve ark., 1996; Oren ve Rodriguez-Valera 2001; Castillo ve ark., 2006 a).

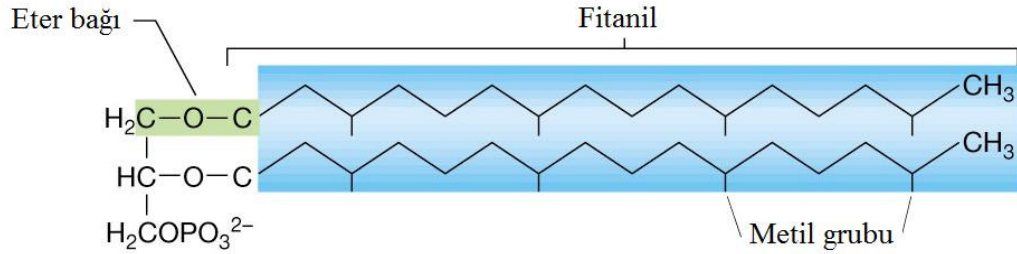
Halofilik arkelerin büyük bir kısmı nötral pH derecelerinde üreme özelliğine sahipken, asidofilik karakterde halofilik arkeler henüz rapor edilmemiştir. pH değeri 6.0 civarında olan Ölü Deniz halofilik arkelerin yoğun olarak gelişebildikleri en asidik ortam olmasıyla dikkat çekmektedir (Oren ve Gurevich, 1993).

Halofilik arkelerin çoğu genellikle 35 ile 50°C aralığındaki yüksek sıcaklıkları tercih ederler (Shand ve Perez, 1999). Fakat bu sıcaklıklardan çok daha soğuk ortamlara adapte olmuş türler de bulunmaktadır. Antartika'daki Deep Lake, sıcaklığı 0°C'nin altındaki sıcaklıklarla 11.5°C arasında değişen su sıcaklığına sahip bir göldür. Bu gölden *Halorubrum lacusprofundi* halofilik arke türü izole edilmiştir. Bu türün optimum üreme sıcaklığı 31°C ile 37°C arasında olmasına rağmen 4°C gibi düşük sıcaklıklarda da yavaş gelişebilmektedir (Franzmann ve ark., 1988). Halofilik arkeler ayrıca tuzlu topraklardan da izole edilmiştir. İspanyanın Akdeniz kıyıları (Queseda ve ark., 1982), eski SSCB'nin yüksek dağ ve düzlüklerindeki çorak alanlardan da izole edilmiştir (Kulicheuskaya ve ark., 1992; Zyvagintseva ve Tarasov 1988). *Halobacteriaceae* üyeleri ayrıca, bozulmadan saklanması için tuzlanmış yiyecek, deri ve diğer ürünlerde de bulunabilmektedirler (Rodriguez-Valera, 1988).

*Halobacteriaceae* familyasındaki cins ve türler arasında tuz gereksinimi ve toleransı arasında büyük farklılık görülmektedir. *Halobacterium* cinsine ait türlerin aksine *Haloferax* cinsine ait olanlar daha düşük tuz konsantrasyonlarında gelişebilmektedirler (Rodriguez-Valera ve ark., 1985). Ortamdaki  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu da halofilik arkelerin gelişimlerini etkilemektedir. Nötrofil halofilik arkelerin büyük çoğunluğu daha fazla  $Mg^{2+}$  konsantrasyonuna (minimum 50-100 mM) gereksinim duymaktadırlar. Alkalifilik üyeler ise üremeleri için yüksek  $Mg^{2+}$  konsantrasyonuna gerek duymamaktadırlar (Ozcan ve ark., 2006).

Halofilik arkelerde hücresel yapıları bakımından diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında önemli farklılıklara sahiptirler ve bu farklılıklar filogenetik açıdan büyük önem taşımaktadır. Bakterilerin aksine arkelerde peptidoglikan yapısında bir hücre duvarı bulunmamaktadır. Bakteri ve ökaryotların hücre zarında gliserole ester bağı ile bağlanan yağ asitleri bulunurken, arkelerin hücre zarında ise gliserole eter

bağları ile bağlanmış uzun hidrokarbon zincirleri bulunmaktadır (Şekil 2.1) (Kates, 1992).



**Şekil 2.1.** Gliserole eter bağı fitanil zinciri yapısı (Madigan ve ark., 2000)

Halofilik arkelerin hücre zarlarında nötral lipitler, fosfolipitler, sülfolipitler ve glikolipitlerden oluşan polar lipit tipleri bulunmaktadır. Bu yapıların çeşitliliği ve mevcudiyeti halofilik arkelerin taksonomisinde önemli bir özellik olarak kullanılmaktadır (Kamekura ve Kates 1999). Tüm halofilik arkeler fosfolipitlerden fosfatidil gliserol (PG) ve metil ester fosfatidil gliserofosfat dieter (me-PGP) türevlerini içerirler. Fosfatidil gliserosülfat (PGS), nötrofilik türlerin çoğunda bulunurken bazı nötrofilik üyeler ve özellikle alkalifilik üyeler PGS içermeyişleri ile karakterize edilebilmektedirler. *Halobacteriales*'in farklı üyelerinde di-, tri- veya tetra glikozil dieter yapısında çeşitli glikolipitler tanımlanmıştır: Mannozi-(1-2)-glukozi-gliserodieter (DGD-1), mannozi-glukozi-gliserodieter (DGD-2 tanımlanmamış), glukozi-(1-6)-glukozi-gliserodieter (DGD-4), mannozi-6-Sülfat-(1-2)-glukozi-gliserodieter (SDGD-1), mannozi-2-sülfat-(1-4)-glukozi-gliserodieter(S-DGD-3), mannozi-2-sülfat-(1-2)-glukozi-gliseroldieter(S-DGD-5), mannozi-2,6-bisülfat-(1-2)-glukozi-gliseroldieter (S<sub>2</sub>-DGD-1), galaktozi-(1-6)-mannozi-(1-2)-glukozi-gliserodieter (TGD-1), glukozi-(1-6)-mannozi-(1-2)-glukozi-gliserodieter(TGD-2), galaktozi-3-sülfat-(1-6)-mannozi-(1-2)-glukozi-gliserodieter (S-TGD-1), galaktozi-(1-6)-mannozi-(3-1)-galaktozi-(1-2)-glukozi-gliserodieter (TeGD), galaktozi-3-sülfat-(1-6)-mannozi-(3-1)-(galaktozi)-(1-2)-glukozi-gliserodieter (S-TeGD). Polar lipitlerin yanı sıra halofilik arkelerin total lipid içeriklerinin yaklaşık %10'unu nötral lipitler oluşturmaktadır (Kamekura ve Kates 1999, Oren 2001).

Halofilik arkelerin çok büyük bir bölümü hücre zarlarında çok yüksek miktarda  $\alpha$ -bakterioruberin'in  $C_{50}$  düz zincir türevli karotenoid pigmentlerinden ve daha az miktarda içerdikleri  $C_{40}$  tipi karotenoidlerden (likopen ve  $\beta$ -karoten) dolayı parlak kırmızıdan turuncuya kadar değişen renk tonlarında görülürler. Karotenoid pigmentleri sayesinde hücreyi iyonize radyasyona karşı korumaktadırlar ve fotoreaktivasyona yardım etmektedirler (Wu ve ark., 1983). Ayrıca halofilik arkelerde retinal pigment içeren 4 farklı protein tanımlanmıştır; bakteriyorodopsin (ışıkla çalışan dış proton pompası), halorodopsin (ışıkla çalışan iç  $Cl^-$  pompası) ve 2 adet alıcı rodopsin (ışığa duyarlı fototaksis olayına katılırlar). Mor pigmentli bakteriyodopsin, *Halobacterium salinarum* ve *Halorubrum sodomense*'de bulunmuştur (Oesterhelt, 1998; Oren, 2001). *H.salinarum*'daki bakteriyorodopsin retinal içeren sadece bir polipeptid zincirinden meydana gelmiş bir integral zar proteinidir. Bu protein hücre dışına protonların ışık ile transferini sağlayarak transmembran elektrokimyasal gradiyenti ile ATP sentezlenmesini sağlar (Yatsunami ve ark., 2000).

Halofilik arkelerin büyük bir bölümü, çözüner oksijen miktarı düşük olan tuzlu sularda oksijen ve ışık alınımını arttıran ve yüzmeye olanak sağlayan gaz vezikülleri içermektedirler. Ayrıca bu gaz veziküllerinin UV ışınlarına karşı da koruyucu kalkan görevi gördüğü belirtilmiştir (DasSarma, 1993; Beard ve ark., 1997).

Halofilik arkelerle ilgili taksonomik çalışmalarda antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılık özelliği sıkça kullanılmaktadır (Oren ve ark. 1997). Halofilik arkeler murein yapıda hücre duvarına sahip olmadığından Penisilin, Ampisilin, Sikloserin, Kanamisin, Neomisin, Polimiksin, Karbenisilin, Sefatoksim ve Streptomisin gibi bakterileri etkileyen antibiyotiklere karşı dirençlidirler. Halofilik arkelerin Novobiyosin, Basitrasin, Rifampisin ile ökaryotlarda protein sentezi inhibitörü olan Anizomisin ve Quinolon türevlerine karşı duyarlılık gösterdikleri belirtilmiştir (Pecher ve Böck, 1981; Bonelo ve ark., 1984; Böck ve Kandler, 1985).

Halofilik arkeler doygun tuz konsantrasyonlarında (5.2 M NaCl) yaşayabilmek için "salt-in" stratejisi ile ozmotik dengeyi sağlamak zorundadırlar. Bu amaçla yüksek osmotik basınca karşı koyabilmek için sitoplazmalarında başta  $K^+$  ve  $Cl^-$  olmak üzere yüksek oranlarda iyonlar biriktirmektedirler. Yaklaşık 5 M olan hücre içi tuz konsantrasyonunun, büyük kısmını KCl ve daha az olmak üzere NaCl oluşturmaktadır (Kushner, 1985; Hough ve Danson, 1989). Halofilik arkeler, iç ortamlarında ozmolit

çözünür madde olarak, dış ortamdakinin 100 katı oranında KCl biriktirdikleri için, hücresel bileşenleri de bu tuz konsantrasyonuna adapte olmuştur. Proteinlerin stabilitesi ve fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için bu tuz oranı gereklidir. Halofilik arkeler protein yapısında diğer canlılara göre negatif yüklü amino asit sıklığını arttırmış ve ortamın “salting out” etkisini dengelemek için polar olmayan amino asit miktarını azaltarak adapte olmuşlardır. (Danson ve Hough, 1997; Sellek ve Chaudhuri, 1999; Hough ve Danson, 1999; Kunte ve ark., 2001).

Halofilik arkeler aerobik ve heterotrofik karakterdedirler. Karbon kaynaklarının aerobik yıkımı, gliksilat döngüsü ve sitokrom zinciri içeren elektron transport sistemi ile trikarboksilik asit döngüsü temelinde gerçekleşmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda oksijen çözünürlüğünün az olmasından dolayı halofilik arkelerin çoğu fumarat, trimetilamin N-oksit (TMAO), dimetilsülfoksit (DMSO), arjinin varlığında veya ışık varlığında bakteriyorodopsin aracılığıyla anaerobik olarak üreme yeteneğine sahiptirler (Hartmann ve ark., 1980; Mancinelli ve Hochstein, 1986; Oren ve Trüper, 1990; Oren ve Litchfield, 1999)

*Halobacteriales* ordosunda bulunan Halofilik arkeler önemli biyoteknolojik potansiyel ve uygulamalara sahiptirler. Halofilik arkelerin eter lipitleri esterazlara karşı dirençli oldukları için lipozom yapımında kullanılması ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivite gösteren ekzoenzimleri, yüksek tuz içeriğine sahip ortamlardaki makromoleküllerin yıkımı ile ilgili biyoteknolojik proseslerde kullanılabilirler (Chaga ve ark., 1993; Margesin ve Scihinner, 2001). *Halobacterium salinarum*'dan elde edilen ışığa bağımlı proton pompası bakteriyorodopsin önemli biyoteknolojik potansiyele sahip olup bilgi depolamada kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Oesterhelt ve ark., 1991). Bakteriyorodopsin'in protein tabanlı güçlü bilgisayarlar da işlemci ve hafıza olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Birge, 1995). Ayrıca bakteriyorodopsinin, güneş ışığından elektrik üretimi, kimyasal ve biyosensörlerde kullanılması gibi alanlarda da biyoteknolojik potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Margesin ve Scihinner, 2001). Bazı halofilik arke türleri hücrelerinde biyoplastik yapımında kullanılan poli- $\beta$ -hidroksialkonat (PHA) biriktirmektedirler (Rodriguez-Valera ve ark., 1991, Hezayen ve ark. 2002).

Halofilik arkelerin taksonomik olarak tanımlanması geçmiş yıllarda standart biyokimyasal testler ve hücre morfolojisi özelliklerine göre yapılmaktaydı. Günümüzde moleküler yöntemlerin hızla gelişmesi ile yeni taksonların tanımlanmasında biyokimyasal özellikler ve fenotipik özelliklerin yanında, kemotaksonomik yöntemler ve DNA dizi analizlerini kapsayan moleküler taksonomik karakterler kullanılmaya başlanmıştır (Oren, 2001).

*Halobacteriales* ordosuna ait yeni bir taksonun tanımlanabilmesi için gerekli minimum standartlar, Oren ve arkadaşları tarafından (1997) belirtilmiştir. Bu standartlar; koloni şekli, büyüklüğü ve pigmentasyonu, hücre morfolojisi ve hareket, Gram reaksiyonu, minimum ve optimum NaCl ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları, sıcaklık ve pH aralığı, anaerobik üreme yeteneği (nitrat, L-arjinin v.b varlığında), karbonhidratlardan asit üretimi, tek karbon kaynağında üreyebilme, katalaz ve oksidaz aktivitesi, indol üretimi, nişasta, jelatin, kazein, ve tween 80 hidrolizi, antimikrobiyal maddelere duyarlılık, polar lipid içerikleri, DNA'nın G+C içeriği, 16S rRNA sekans analizi gibi verileri içermektedir. Günümüzde halofilik arkelerin sınıflandırılması, fenotipik özellikler, kimyasal (özellikle polar lipid kompozisyonu) ve genetik (16S rRNA sekans analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu) veriler olmak üzere üç tip veri esas alınarak yapılmaktadır (Castillo ve ark., 2006 b; Gutiérrez ve ark., 2007). Bu kriterler göz önünde bulundurularak yapılan taksonomik çalışmalar sonucunda günümüzde *Halobacteriaceae* familyasına dahil 27 cins ve bu cinslere ait 113 tür tanımlanmıştır (<http://www.bacterio.cict.fr/classifgenerafamilies.html#halobacteriaceae> )

## **2.2. *Halobacteriales* Ordosunun Özellikleri**

*Halobacteriales* ordosuna ait türlerin hücreleri, çubuk, kok, pleomorfik, düz kare, üçgen, trapezoid şekilli morfolojik özelliklere sahip olabilmektedir (Oren, 2001). Halofilik arkelerde dinlenme yapıları veya spor yapılarına rastlanmamıştır. Hareketsiz olabildikleri gibi bazı türler flagellumları ile aktif hareket edebilmektedirler. Gram reaksiyonu yönünden çoğunlukla (-) olmalarına rağmen bazıları Gram değişken olabilmektedir (Dussault, 1955; Grant ve ark., 2001). Aerobik mikroorganizmalardır, oksidaz ve katalaz aktiviteleri pozitifdir. Bazı suşlar nitrat varlığında ya da bakteriyorodopsin yardımıyla anaerobik olarak üreyebilmektedirler. Ayrıca arjinin varlığında fermentatif üreyebilen suşlar rapor edilmiştir (Hartman ve ark., 1980;

Oesterhelt, 1998; Oren ve Litchfield, 1999). Üremeleri için en az 1.5 M NaCl'e ihtiyaç duyan suşların çoğunluğu 3.5-4.5M NaCl konsantrasyonunda en iyi üreme göstermektedir (Oren, 2000). Birçok suşun koloni renkleri C<sub>50</sub> ve C<sub>40</sub> karotenoidlerinden dolayı kırmızı tonlardadır. Optimum üreme sıcaklıkları 35-50°C sıcaklık aralığındadır. Kemoorganotrofik karakterdedirler, karbon kaynağı olarak karbonhidratları veya amino asitleri kullanırlar. Bazı suşlar tek karbon kaynağı içeren inorganik ortamlarda üreyebilirler (Grant ve ark., 2001). Fitanyl (C<sub>20</sub>) ya da sesterpanil (C<sub>25</sub>) yan zincirleri olan di-izoprenoid gliserol eter türevli polar lipidleri mevcuttur (Kates, 1993). DNA'ları genellikle bir majör ve bir minör komponent içerir. Minör komponent toplam DNA'nın %10-30'unu oluşturmaktadır. DNA'nın %mol G+C oranı majör komponentte 59-71, minör komponentte 51-59 arasındadır (Pfeifer ve ark., 1988; Gutierrez ve ark., 1986). *Halobacteriales* ordosu ile içerisindeki tek familya olan *Halobacteriaceae* familyası'nın da özellikleri ordo ile aynıdır. *Halobacteriaceae* familyasının cins tipi *Halobacterium*'dur (Grant ve ark., 2001). Daha öncede belirtildiği gibi günümüze kadar *Halobacteriaceae* familyasına dahil 27 cins tanımlanmıştır. Bunlar; *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Natronomonas*, *Halococcus*, *Natrialba*, *Natronobacterium*, *Halogeometricum*, *Natronococcus*, *Haloferax*, *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Natronorubrum*, *Halosimplex*, *Halobiforma*, *Halorhabdus*, *Halomicrobium*, *Halosarcina*, *Halostagnicola*, *Halalcalicoccus*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Halodaptatus*, *Haloquadratum*, *Halovivax*, *Natronolimnobiuss* cinsleridir.

### 2.2.1. *Halobacterium* Cinsi

*Halobacterium* cinsinin özellikleri; hücreleri çubuk şekilli ve hareketlidir. Optimum NaCl konsantrasyonu 4-5 M, NaCl aralığı 3-5.2 M, optimum Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonu ise 0.005 M'dan yüksektir. Optimum pH nötral olarak belirlenmiştir. Optimum üreme sıcaklığı 35-50°C arasındadır. Nitratın nitrite indirgenmesi, nitrattan gaz oluşumu, nitrat varlığında anaerobik üreme, karbonhidratlardan asit oluşumu, tek karbon kaynağında üreme, triptofandan indol oluşumu, nişastanın hidrolizi, tween80 hidrolizi özellikleri negatiftir. Jelatin hidrolizi, L-arjinin varlığında anaerobik üreme, kazein hidrolizi özellikleri pozitiftir. Bu cinsin koloni pigmentasyonu kırmızı-mor renklindedir. Majör glikolipitleri olarak S-TGD ve S-TeGD, PGS içermektedirler.

DNA'nın G+C oranı 66-70.09 %mol (majör), 57-60 %mol (minör) olarak tespit edilmiştir. Bu cinse ait türler; *H. salinarum* (tür tipi) *H. jilantaiense*, *H. noricense*, *H. cutirubrum*, *H. denitrificans*, *H. distributum*, *H. halobium*, *H. lacusprofundi*, *H. mediterranei*, *H. pharaonis*, *H. saccharovorum*, *H. sodomense*, *H. trapanicum*, *H. vallismortis*, *H. volcanii*'dir (Oren, 2001; Yang ve ark., 2006)

### 2.2.2. *Halobaculum* Cinsi

*Halobaculum* cinsinin özellikleri; hücreleri çubuk şekilli, hareketli ya da hareketsiz olmakla birlikte gaz vezikülü bulunmamaktadır, Optimum NaCl konsantrasyonu 1.5-2.5 M, NaCl aralığı 1-2.5 M, optimum  $Mg^{+2}$  oranı 0.6-1.0 M, optimum pH 6-7, optimum sıcaklık ise 40°C'dir. Nitratın nitrite indirgenmesi, karbonhidratlardan asit oluşumu ve nişasta hidrolizi pozitif olarak belirlenmiştir. Nitratın gaz oluşumu, nitrat varlığında anaerobik üreme, L-arjinin varlığında anaerobik üreme, tek karbon kaynağında üreme, triptofandan indol oluşumu, tween 80 hidrolizi, jelatin hidrolizi ve kazein hidrolizi özellikleri ise negatiftir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipidi olarak S-DGD-1 bulundurur ve PGS içermemektedir. DNA'nın G+C oranı 70 % mol olarak bulunmuştur. Tek türü *H. gomorrhense* (tür tipi)'dir (Oren ve ark., 1995).

### 2.2.3. *Halorubrum* Cinsi

*Halorubrum* cinsinin özellikleri; Hücreler çubuk şekilli, hareketlidir ve gaz vezikülleri yoktur. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.5-4.5 M, NaCl aralığı 1.5-5.2 M, optimum  $Mg^{+2}$  en az 0.005, optimum pH nötral, optimum sıcaklık ise 50°C olarak tespit edilmiştir. Nitratın nitrite indirgenmesi, karbonhidratlardan asit üretimi pozitifdir. Nitrat varlığında anaerobik üreme, L-arjinin varlığında anaerobik üreme, triptofandan indol oluşumu, nişastanın hidrolizi, nitratın gaz oluşumu, jelatin ve kazein hidrolizi özellikleri negatiftir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipitleri olarak S-DGD-3 veya S-DGD-1 içerirler ayrıca PGS vardır. DNA'nın G+C oranı 69.1-72.1 % mol (majör), 54.8-56.5 % mol (minör) olarak bulunmuştur. Cinsin türleri; *H. saccharovorum* (tür tipi), *H. aidingense*, *H. alkaliphilum*, *H. arcis*, *H. coriense*, *H. distributum*, *H. ejinoreense*, *H. ezzemoulense*, *H. lacusprofundi*, *H. lipolyticum*, *H.*



*litoreum*, *H. luteum*, *H. orientale*, *H. sodomense*, *H. tebenquichense*, *H. terrestre*, *H. tibetensedur*, *H. trapanicum*, *H. vacuolatum*, *H. xinjiangense*'dir (Oren, 2001).

#### **2.2.4. *Haloarcula* Cinsi**

*Haloarcula* cinsinin özellikleri; hücreler pleomorfik çubuk ve hareketli karakterdedir ve gaz vezikülleri yoktur. Optimum NaCl konsantrasyonları 3.5-4.3 M, optimum pH 7.4-7.5, optimum üreme sıcaklığı 40°C'dir. Nitratın nitrite indirgenmesi, nitrattan gaz oluşumu ve nitrat varlığında anaerobik üreme pozitif, L-arjinin varlığında anaerobik üreme negatif, karbohidratlardan asit oluşumu, tek karbon kaynağında üreme, triptofandan indol oluşumu ve nişasta hidrolizi pozitif, tween80, jelatin ve kazein hidrolizi negatiftir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipitleri TGD-2 olup PGS vardır. DNA'nın G+C oranı 64.7%mol olarak tespit edilmiştir. Cinsine ait türler; *H. vallismortis* (tür tipi), *H. amyolytica*, *H. argentinensis*, *H. hispanica*, *H. japonica*, *H. marismortui*, *H. mukohataei*, *H. quadrata*'dır (Torreblanca ve ark., 1986).

#### **2.2.5. *Natronomonas* Cinsi**

*Natronomonas* cinsinin özellikleri; çubuk şekilli hücreler hareketlidir ve gaz vezikülü içermezler. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.5 M, NaCl aralığı 2.0-5.2 M, optimum Mg<sup>+2</sup> en fazla 0.01 M, optimum pH 9.5-10.0, optimum sıcaklık ise 45°C'dir. Nitrattan gaz oluşumu, nitrat varlığında anaerobik üreme, karbohidratlardan asit üretimi, tek karbon kaynağında üreme, nişasta hidrolizi, tween80 hidrolizi ve kazein hidrolizi özellikleri negatif, jelatin hidrolizi pozitifdir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipitleri ve PGS ihtiva etmezler. DNA'nın G+C oranı 61.2 %mol (majör), 51.9 %mol (minör) olarak tespit edilmiştir. Tek türü tür tipi olan *N. pharaonis*'tir (Kamekura ve ark., 1997).

#### **2.2.6. *Halococcus* Cinsi**

*Halococcus* cinsinin özellikleri; hücreleri kok şeklinde, hareketsiz ve gaz vezikülleri yoktur. Optimum NaCl konsantrasyonları 3.5-4.5 M, NaCl aralığı 2.5-5.2 M, optimum pH nötral, optimum sıcaklıkları ise 30-45°C aralığındadır. Nitrattan nitrit

oluşumu pozitif, nitrattan gaz oluşumu, nitrat varlığında anaerobik üreme, karbonhidratlardan asit oluşumu ve tek karbon kaynağında üreme negatif, triptofandan indol oluşumu pozitif, nişasta, tween ve jelatin hidrolizi değişken, kazein hidrolizi negatiftir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipitleri S-DGD-1 olup PGS mevcut değildir. DNA'nın G+C oranı 61-66 % mol olarak bulunmuştur. Tür tipi *H. morhuae*'dir (Oren, 2001). Diğer türleri; *H. dombrowskii*, *H. hamelinensis*, *H. qingdaonensis*, *H. saccharolyticus*, *H. salifodinae*, *H. thailandensis*, *H. turkmenicus*'tur.

### 2.2.7. *Natrialba* Cinsi

*Natrialba* cinsinin özellikleri; hücreler çubuk ve hareketli olup gaz vezikülleri yoktur, optimum NaCl konsantrasyonları 3.5-4.0 M, NaCl aralığı 2.0-5.2 M, optimum  $Mg^{+2}$  en az 0.005 M, optimum pH 6.6-7.8, optimum sıcaklık ise 35-40°C aralığındadır. Nitratın nitrite indirgenmesi pozitif, nitrattan gaz oluşumu, nitrat varlığında anaerobik üreme ve L-arjinin varlığında anaerobik üreme negatif, karbonhidratlardan asit üretimi değişkendir, triptofandan indol oluşumu pozitif, nişasta hidrolizi değişken, kazein hidrolizi pozitiftir. Koloni pigmentasyonu beyazdır. Majör glikolipit içermez, DNA'nın G+C oranı 60.3-63.1 % mol olarak bulunmuştur. Cinsin türleri *N. asiatica* (tür tipi), *N. aegyptia*, *N. chahannaensis*, *N. hulunbeirensis*, *N. magadii*, *N. Taiwanensis*'dir (Kamekura ve Dyall-Smith, 1995).

### 2.2.8. *Natronobacterium* Cinsi

*Natronobacterium* cinsinin özellikleri; hücreler çubuk şekilli, hareketsiz ve gaz vezikülleri yoktur. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.0 M, NaCl aralığı 2.0-5.2 M,  $Mg^{+2}$  minimum 0.01 M, pH optimum 9.5, optimum sıcaklık 37°C'dir. Nitratın nitrite indirgenmesi, nitrattan gaz oluşumu, nitrat varlığında anaerobik üreme, karbonhidratlardan asit oluşumu, tek karbon kaynağında üreme ve nişasta hidrolizi negatif, jelatin hidrolizi pozitiftir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipitleri bilinmemektedir, PGS içermezler. DNA'nın G+C oranı 65.0 %mol olarak bulunmuştur. Cinsin türleri; *N. gregoryi* (tür tipi), *N. magadii*, *N. nitratireducens*, *N. pharaonis*, *N. vacuolatum dur* (Oren, 2001).

### 2.2.9. *Halogeometricum* Cinsi

*Halogeometricum* cinsinin özellikleri; hücreler pleomorfik düz ve hareketli olup gaz vezikülleri vardır. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.4-4.3 M, NaCl aralığı 1.4-5.2 M, optimum  $Mg^{+2}$  0.04-0.08 M, optimum pH 7, optimum sıcaklık ise 40°C'dir. Nitratın nitrite indirgenmesi, nitrattan gaz oluşumu ve nitrat varlığında anaerobik üreme pozitif, L-arjinin varlığında anaerobik üreme negatif, karbonhidratlardan asit üretimi ve tek karbon kaynağında üreme, triptofandan indol oluşumu nişasta hidrolizi ve jelatin hidrolizi pozitifdir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipitleri olmayıp PGS bulunmaz. DNA'nın G+C oranı 59 % mol olarak tespit edilmiştir. Tek türü aynı zamanda tür tipi olan *H. borinquense*'dir (Montalvo-Rodriguez ve ark., 1998).

### 2.2.10. *Natronococcus* Cinsi

*Natronococcus* cinsinin özellikleri; hücreleri kok şekilli, hareketsiz ve gaz vezikülü içermemektedir. Optimum NaCl konsantrasyonu 3.4-3.8 M, NaCl aralığı 1.4-5.2 M, optimum  $Mg^{+2}$  en az 0.01, optimum pH 9.5, optimum sıcaklık ise 35-40°C'dir. Nitratın nitrite indirgenmesi ve jelatin hidrolizi pozitifdir, nitrattan gaz oluşumu, nitrat varlığında anaerobik üreme, tek karbon kaynağında üreme ve nişasta hidrolizi negatiftir,. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipitleri ve PGS bulunmaz. DNA'nın G+C oranı 64.0 %mol (majör), 55.7 %mol (minör) olarak tespit edilmiştir. Cinsin türleri; *N. occultus* (tür tipi), *N. amyolyticus*, *N. Jeotgali*'dir (Oren, 2001).

### 2.2.11. *Haloferax* Cinsi

*Haloferax* cinsinin özellikleri; hücreler pleomorfik düz, hareketsiz ve gaz vezikülü yoktur. Optimum NaCl konsantrasyonu 1.7-2.5 M, NaCl aralığı 1.0-4.5 M, optimum  $Mg^{+2}$  0.2 M, optimum pH nötral, optimum üreme sıcaklığı ise 40°C'dir. Nitratın nitrite indirgenmesi pozitif, nitrattan gaz oluşumu negatif, nitrat varlığında anaerobik üreme ve L-arjinin varlığında anaerobik üreme negatif, karbonhidratlardan asit üretimi , tek karbon kaynağında üreme ve triptofandan indol oluşumu pozitifdir, nişasta hidrolizi, tween80 hidrolizi, jelatin hidrolizi ve kazein hidrolizi özellikleri negatiftir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipidi S-DGD-1 olup PGS içermezler. DNA'nın G+C oranı 63.4 % mol (majör), 55.3 % mol (minör) olarak tespit

edilmiştir. *Haloferax* cinsinin şüana kadar tanımlanmış türleri; *H. volcanii* (tür tipi), *H. alexandrinus*, *H. denitrificans*, *H. elongans*, *H. gibbonsii*, *H. larsenii*, *H. lucantense*, *H. mediterranei*, *H. mucosum*, *H. prahovense*, *H. .sulfurifontis*'dir (Torreblanca ve ark., 1986).

### 2.2.12. *Natrinema* Cinsi

*Natrinema* cinsi, çubuk veya pleomorfik şekilli, hareketsiz ve gaz vezikülü bulundurmeyen hücrelerle karakterizedir. Optimum NaCl konsantrasyonları 3.4-4.3 M, optimum pH 7.2-7.8 dir. Nitratın nitrite indirgenmesi pozitif, nitrattan gaz oluşumu ve karbonhidratlardan asit oluşumu negatif, triptofandan indol oluşumu ve nişasta hidrolizi negatif, jelatin hidrolizi pozitiftir. Koloni pigmentasyonları açık kırmızı renkten turuncu tonlara kadar değişebilmektedir. PGS bulunmamaktadır. DNA'nın G+C oranı 69.9 % mol (majör), 60.0 % mol (minör) olarak bulunmuştur. Cinsin türleri tür tipi olan *N. pellirubrum*, *N. altunense*, *N. ejinorensis*, *N. pallidum*, *N. versiforme* türleridir (Mc Genity ve ark., 1998).

### 2.2.13. *Haloterrigena* Cinsi

*Haloterrigena* cinsinin özellikleri; kok şekilli hücreler hareketsizdir ve gaz vezikülü içermemektedirler. Optimum pH nötral ve optimum üreme sıcaklığı 45°C'dir. Nitratın nitrite indirgenmesi pozitif, nitrattan gaz oluşumu ve nitrat varlığında anaerobik üreme negatif, karbonhidratlardan asit oluşumu pozitif, triptofandan indol oluşumu, nişasta hidrolizi ve jelatin hidrolizi negatiftir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipidi S<sub>2</sub>DGD-1 olup PGS içermemektedirler. DNA'nın G+C oranı 59.2-60.2 % mol olarak bulunmuştur. Cinsin türleri *H. turkmenica* (tür tipi), *H. hispanica*, *H. limicola*, *H. longa*, *H. saccharevitans*, *H. thermotolerans*'dir (Ventosa ve ark., 1999).

### 2.2.14. *Natronorubrum* Cinsi (düzeltilmiş)

*Natronorubrum* cinsinin özellikleri; hücreler Gram negatif, çubuk şeklinde veya pleomorfik yassı (üçgen, kare, disk ve çokgenler) şekilli. Koloniler kırmızı renklidir. Hücreler hareketsiz veya hareketli olabilirken zorunlu aerobiktirler, oksidaz ve katalaz

özellikleri pozitifdir. Büyüme için en az %12 NaCl konsantrasyonuna ihtiyaç duyarlar. Hücreler distile suda lizize uğrar. Alkalifilik yada nötrofilik özellikte olabilirler. Mezofilik ve kemoorganotrofik özelliktedirler. Bu cins üyeleri birçok şekeri (glukoz, fruktoz, maltoz vs.) kullanabilmekte ve bazen bunlardan asit oluşturabilmektedirler. Polar lipitleri PG ve PGP nin C<sub>20</sub>-C<sub>20</sub> ve C<sub>20</sub>-C<sub>25</sub> türevleridir. Hücreler ayrıca TGD-1 ve diğer tanımlanmamış glikolipitleride içerebilmektedir. Günümüze kadar bu cinse ait *N. bangense* (tür tipi), *N. aibiense*, *N. sulfidifaciens*, *N. tibetense* türleri tanımlanmıştır (Cui ve ark., 2006).

### 2.2.15. *Halosimplex* Cinsi

*Halosimplex* cinsinin özellikleri; hücreler çubuk şeklinde ve hareketlidir. Optimum NaCl konsantrasyonları 4.3 M, optimum Mg<sup>+2</sup> %1-2 w/v, optimum üreme sıcaklık aralığı ise 37-40°C'dir. Nitrat varlığında anaerobik üreme ve L-arjinin varlığında anaerobik üreme negatif, tek karbon kaynağında üreme pozitif, nişasta hidrolizi ve jelatin hidrolizi negatiftir. Koloni pigmentasyonu pembe-kırmızıdır. Majör glikolipitleri S<sub>2</sub>-DGD ve S-TeGD olup PGS ihtiva etmezler. DNA'nın G+C oranı 64.4 % mol olarak tespit edilmiştir. Tek türü ve tür tipi *H. carlbadense*'dir (Vreeland ve ark., 2002).

### 2.2.16. *Halobiforma* Cinsi

*Halobiforma* cinsinin özellikleri; hücreler çubuk, kok veya pleomorfik şekilli olup hareketlidirler, optimum NaCl konsantrasyonları 3.4 M, optimum NaCl aralığı 2.2-5.2 M, optimum pH 7.5, optimum üreme sıcaklığı ise 42°C'dir. Nitratın nitrite indirgenmesi, nitrattan gaz üretimi, karbonhidratlardan asit üretimi, tween80 hidrolizi, jelatin hidrolizi, kazein hidrolizi ve indol üretimi pozitif olarak tespit edilmiştir. nişastanın hidrolizi negatiftir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipitleri S-TGD ve TGD olup PGS içermezler. DNA'nın G+C oranı 66.9 % mol olarak tespit edilmiştir. Cinsin türleri; *H. haloterrestris* (tür tipi), *H. lacisalsi*, *H. nitratireducens*'tir (Hezayen ve ark., 2002).

### 2.2.17. *Halorhabdus* Cinsi (düzeltilmiş)

*Halorhabdus* cinsinin özellikleri; hücreler pleomorfik şekilli ve hareketlidir. Optimum NaCl konsantrasyonları 4.6 M, NaCl aralığı 1.5-5.1 M, optimum MgSO<sub>4</sub>% 0.05-20, optimum pH 6.7-7.1, optimum üreme sıcaklığı ise 50°C'dir. Nitratın nitrite indirilmesi pozitif, L-arjinin varlığında anaerobik üreme negatif, karbohidratlardan asit üretimi, indol üretimi, nişasta hidrolizi ve jelatin hidrolizi negatiftir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipit S-TGD olup PGS içermemektedir. DNA'nın G+C oranı 64 % mol olarak tespit edilmiştir. Tür tipi *H. utahensis*'tir (Waino ve ark., 2000). *Halorhabdus* cinsinin temel özellikleri yukarıda tanımlanmıştır bunlara ek olarak bazı türleri flagellasız, hareketsiz, pigmentsiz koloniler oluşturmakta, anaerobik koşulları tercih etmektedir. DNA G+C içeriği 61.7-64.0 mol % arasında bulunmuştur. Cinsin türleri *Halorhabdus utahensis* (tür tipi), *H. tiamatea*'dir (Antunes ve ark., 2008).

### 2.2.18. *Halomicrobium* Cinsi

*Halomicrobium* cinsinin özellikleri; hücreler çubuk şekilli ve hareketli olup gaz vezikülü bulunmamaktadır. Optimum NaCl konsantrasyonları 3-3.5 M, NaCl aralığı 2.5-4.5 M, optimum Mg<sup>+2</sup> 0.003-0.3 M, optimum pH nötral ve optimum üreme sıcaklığı 40°C'dir. Karbohidratlardan asit üretimi pozitifdir. Koloni pigmentasyonu kırmızıdır. Majör glikolipit S-DGD-1, DGD-1 olup PGS içermektedir. DNA'nın G+C oranı 65 % mol olarak bulunmuştur. Tek türü ve tür tipi *H. mukohataei*'dir (Oren ve ark., 2002).

### 2.2.19. *Halosarcina* Cinsi

*Halosarcina* cinsinin özellikleri; bu cinsin hücreleri kok şekilli salkım halinde gram negatif ve hareketsizdir. Oksidaz ve katalaz pozitif, kemoorganotrofik karakterdedirler. Tek ve kompleks karbon kaynakları dahil birçok substrat ortamında gelişebilirler. Karbohidratlardan asit oluşturabilirler, aerobik olarak nitratı nitrite indirgeyebilirken gaz üretmedikleri tespit edilmiştir. Distile suda hücreler lizise olmaktadır. Hücreler fosfatidilgliserolfosfat (PGP), fosfatidilgliserol (PG), fosfatidilgliserofosfat metil esterleri (PGP-Me) içermektedir. Fakat fosfatidilgliserol sülfat (PGS) bulunmamaktadır. Kromatografik olarak benzer S-DGD1 ve DGD1

glikolipitlerini bulundurmaktadırlar. Tek ve tipik türü *Halosarcina pallida*'dır (Savage ve ark., 2008).

#### **2.2.20. *Halostagnicola* Cinsi**

*Halostagnicola* cinsinin özellikleri; gram negatif, hücrelerin çoğu çubuk şeklinde olsa da pleomorfik yapıdadır. Koloniler pembe renklidir. Terminal elektron alıcısı olarak oksijeni kullandığından zorunlu aerobik özelliğindedir. Gelişme 6.0 ve 9.0 pH değerlerinde, 25-50°C sıcaklarda ve %15-%30 tuzluluk arasında (2.5-5 M) meydana gelirken optimal büyüme ise pH 7.0-8.0, 37 °C ve %20 (3.4 M) NaCl ortamında gerçekleşir. Polar lipitler fosfatidilgliserol (PG), fosfatidilgliserolmetilfosfat (PGP-Me) içerir. Bunların her ikisinde C<sub>20</sub>-C<sub>20</sub> C<sub>20</sub>-C<sub>25</sub> gliseroldieterden ve iki tanımlanamamış glikolipitten türemiştir. Tek türü aynı zamanda tür tipi olan ve ilk olarak bir tuz gölünden izole edilen *H. larsenii*'dir (Castillo ve ark., 2006b).

#### **2.2.21. *Halalkalicoccus* Cinsi**

*Halalkalicoccus* cinsinin özellikleri; hücreler sıvı kültürler içerisinde ve plaklar üzerinde tek, çift ya da düzensiz salkımlar halinde bulunan koklardır. Gram negatiftirler, fakat bazı genç hücreler Gram (+) reaksiyon gösterir. Hücreler distile su içinde lizise uğramamaktadır. Hareketsiz özelliktedirler. Zorunlu aerobik, alkalifilik, kemoorganotrofik karakterdedirler. Ayrıca C<sub>20</sub>-C<sub>20</sub> C<sub>20</sub>-C<sub>25</sub> dieterleri içerir. Glikolipit veya PGS görülmemiştir. Bu cinse ait türler *H. tibetensis* (tür tipi), *H. jeotgali*'dir (Xue ve ark., 2005).

#### **2.2.22. *Halopiger* Cinsi**

*Halopiger* cinsinin özellikleri; Gram negatif hücreler pleomorfik olsa da çoğu uzun çubuk şekillidir. Bu cinse ait koloniler kırmızı pigmentasyon göstermektedirler. Oksijen terminal elektron alıcısı olduğundan zorunlu aerobiktir. Gelişim pH 6.0-11.0, 28-45°C ve 2.5-5 M NaCl konsantrasyonunda (%15-30) meydana gelmektedir. Optimum gelişim pH 7.5-8.0, 37 °C ve 4.3 M (%25) NaCl koşullarında gerçekleşmektedir. DNA G+C içeriği yalnızca cinsin türü için 63.1 % mol olarak

bulunmuştur. Polar lipitleri fosfatidilgliserol (PG) ve fosfatidilgliserometilfosfat (PGP-Me), C<sub>20</sub>-C<sub>20</sub> C<sub>20</sub>-C<sub>25</sub> gliseroldieterlerden ve glikolipit S<sub>2</sub>-DGD-1 in her ikisinden türemiştir. Tuz göllerinden izole edilmiştir. Tek türü ve tür tipi; *H. xanaduensis*'tir (Gutierrez ve ark., 2007).

### **2.2.23. *Haloplanus* Cinsi**

*Haloplanus* cinsinin özellikleri; hücreler pleomorfik yassı morfolojide olup gaz vezikülleri içermektedir. Durgun sıvı kültürlerde hücreler yüzeyde yüzer. Ayrıca hücreler Gram negatif reaksiyon vermektendirler. Zorunlu aerobik olan bu cins üyelerinin oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitifdir. Genomik DNA G+C içeriği 66.1-66.4 mol % olarak belirlenmiştir. Tek türü ve tür tipi *H. natans*'tir (Bardavid ve ark., 2007).

### **2.2.24. *Halodaptatus* Cinsi**

*Halodaptatus* cinsinin özellikleri; Gram negatif özellikte olan hücreler kok veya kokbasil tek ya da çiftler halinde bulunmaktadır, koloni pigmentasyonları pembe, en az iki heterogen 16S rRNA gen dizisine sahiptir. Hücreler PG, PGP-Me, ve PGS fosfolipitleri ile iki tanımlanamamış glikolipit içermektendirler. Kemoorganotrofik özellikteki cins üyeleri, birçok substratı kullanarak, tek veya kompleks karbon kaynağında gelişebilir ve karbonhidratlardan asit üretebilme yeteneğine sahiptir. Nişasta, kazein, tween80 ve jelatin hidrolizi özellikleri pozitifdir. Geniş aralıklı NaCl konsantrasyonunda gelişebilirler, Novobiyosin, Basitrasin, Anisomisin, Amfidikolin antibiyotiklerine karşı hassastır. Rifampisin ve Trimetoprim karşı kısmen hassastır. Eritromisin, Penisilin, Amfisilin, Kloramfenikol, Neomisin, Nalidiksikasit, ve Gentamisine karşı dirençlidir. Ayrıca bu cins üyeleri düşük tuz konsantrasyonunda yaşayabilmektedir. Tek türü ve tür tipi *H. paucihalophilus*'tur (Savage ve ark., 2007).

### **2.2.25. *Haloquadratum* Cinsi**

*Haloquadratum* cinsinin özellikleri; düz kare hücre morfolojisine sahiplerdir ve genellikle gaz vezikülü içermektendirler, aynı zamanda PHA (poli-β-hidroksialkonat)



depo granülleri vardır, aerobik heterotrof özelliktedirler, oksidaz ve katalaz reaksiyonları negatiftir. Gram negatif boyanmaktadırlar, DNA'nın G+C oranı tipik türde 46.9% mol olarak bulunmuştur. Tek türü aynı zamanda tür tipi olan *H. walsbyi*'dir (Burns ve ark., 2007).

#### **2.2.26. *Halovivax* Cinsi**

*Halovivax* cinsinin özellikleri; Gram negatif reaksiyon gösterdikleri tespit edilmiştir. Hücreler ekstrem pleomorfik olsa da çoğu çubuk şekillidir. Koloni pigmentasyonu soluk pembedir. Oksijen final elektron alıcısı olduğundan kesin aerobiktir. Gelişim pH 6.0-9.0, 25-45°C sıcaklıkta ve %15-25 (2.5-4.3 M) NaCl konsantrasyonunda meydana gelirken optimum gelişim ise pH 7.0-7.5, 37 °C sıcaklıkta ve %20 (3.4 M) NaCl konsantrasyonunda meydana gelmektedir. DNA'nın G+C içeriği tür tipi için 60.3 % mol olarak belirlenmiştir. Fosfatidilgliserol, fosfatidilgliserol fosfat metil ester polar lipitlerini içerir. *Natrinema pellirubrum* dakine benzer iki majör bir minör glikolipit ve belirlenememiş bir glikolipit mevcuttur. Tuz gölünden izole edilmiştir. Cinsin türleri; tür tipi olan *H. asiaticus* ve *H. ruber*'dir (Castillo ve ark., 2006a).

#### **2.2.27. *Natronolimnobius* Cinsi**

*Natronolimnobius* cinsinin özellikleri; aerobik, kemoorganotrofik, Gram negatiftir. Optimum üreme sıcaklığı 37-45°C, optimum pH 9.0-9.5, optimum NaCl konsantrasyonu %15-20 olup hareketli çubuk veya hareketsiz kok, düz pleomorfik şekilli hücrelere sahiptir. Fosfatidil gliserol ve fosfatidilgliserolfosfat metil ester ihtiva ederler. Glikolipit tespit edilememiştir. Cinsin türleri *N. baerhuensis* (tür tipi) ve *N. innermongolicus*'tur (Itoh ve ark., 2005).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Tuzlu Su Örnekleri

Halofilik arkelerin izolasyonu amacıyla tuzlu su örnekleri Çankırı ilinde Çankaya tuz madeni işletmesinden alınmıştır. Örnekler tuz mağarasının farklı bölgelerinden steril şişelere alınarak bekletilmeden tez çalışmasının yürütüldüğü laboratuvara getirilmiştir.

##### 3.1.2. Tuzlu Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Tuzlu su örneklerinin kimyasal özellikleri Merck spektroquant test kitleri ve ICP-AES cihazı ile belirlenmiştir.  $SO_4^{2-}$  tayini için 1144548 nolu,  $Cl^-$  tayini için 114897 nolu ve toplam sertlik tayini için 100961 nolu test kitleri ve Nova 60 Marka spektrofotometre kullanılmıştır. pH ölçümleri için cam elektrotlu WTW ino Lab pH 720 marka pH metre kullanılmıştır.  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  ve  $Na^+$  tayini için Varian ICP-AES Liberty-series II cihazı kullanılmıştır.

##### 3.1.3. Halofilik Arkeler

Tuzlu su örneklerinden 8 adet halofilik arke izole edilmiş ve izolatlar CH1, CH2, CHA1, CHC, CH7, CH8K, CH8B, CH11 şeklinde isimlendirilmiştir. Çalışma kapsamında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji araştırma laboratuvarında bulunan bazı halofilik arke standart suşları kullanılmıştır. Bunlar; *Halobacterium salinarum* DSM 3754, *Natrialba asiatica* DSM 12278, *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137, *Haloferax denitrificans* DSM 4425, *Haloarcula vallismortis* DSM 3756, *Haloferax mediterranei*, *Haloarcula marismortui*, *Haloferax volcanii*'dir.

##### 3.1.4. Besiyeri

Tuzlu su örneklerinden halofilik arkelerin izolasyonu ve kültüre alınması amacıyla Sehgal-Gibbons besiyeri (SG) (Gonzales ve ark., 1978; Montalvo-Rodriguez

ve ark., 2000) kullanılmıştır. Sehgal-Gibbons (SG) besiyeri; 250g/L NaCl, 20g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2g/L KCl, 3g/L Sodyum sitrat, 0.023g/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 7.5g/L casamino asit, 1g/L yeast ekstrakt, içermektedir ve pH'ı 7.3' e ayarlanmıştır.

### **3.1.5. Mikroskopik İnceleme**

İzolatların hücre morfolojisi, Gram reaksiyonları ve hareket yeteneklerinin belirlenmesi ve fotoğraf çekimleri için faz-kontrast ataçmanlı mikroskop (Olympus BX51) ve Olympus Camedia C-7070 fotoğraf makinesi kullanılmıştır. Koloni morfolojisinin belirlenmesinde ise stereo mikroskop (Euromex model KTD) kullanılmıştır.

### **3.1.6. Antibiyotikler**

Halofilik arke izolatlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını belirlemek amacıyla Oxoid marka, Trimetoprim (5µg), Novobiyosin (30µg), Neomisin (30µg), Norfloksasin (10µg), Penisilin G (10IU), Ampisilin (10µg), Azitromisin (15µg), Streptomisin (25µg), Tetrasiklin (30µg), Sülfametazol/trimetoprim (25µg), Vankomisin (30µg), Kloramfenikol (30µg), Eritromisin (15µg), Basitrasin (10IU), Rifampisin(5µg) antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

### **3.1.7. İnce Tabaka Kromatografisi**

İnce tabaka kromatografisi için analitik saflıkta kloroform, metanol, asetik asit, α-naftol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kimyasalları (Merck) ile cam silikajel plakaları (Merck, 60F<sub>254</sub>, 20x20) ve molibden mavisi ayırıcı (Sigma) kullanılmıştır.

### **3.1.8. Elektroforez**

Sodyum dodesil sülfat (SDS) protein elektroforezi için, sodyum dodesil sülfat (SDS), merkaptoetanol, bromofenol mavisi, akrilamid-bisakrilamid monomerleri, trizma base, amonyum per sülfat (APS), tetra metil etilen daimin (TEMED), glisin, coomassie brillant (R250-Sigma), gliserol, izopropil alkol, asetik asit, bütanol,

hidroklorik asit, molekül ağırlık standardı (Fermentas) ve Protean II xi Cell B10-RAD elektroforez sistemi kullanılmıştır.

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1. Tuzlu Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

Tuzlu su örneklerinin kimyasal analizi Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Merkez laboratuvarında yapılmıştır.

SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> tayini için 1144548 nolu, Cl<sup>-</sup> tayini için 114897 nolu ve toplam sertlik tayini için 100961 nolu test kitleri ve Nova 60 Marka spektrofotometre kullanılmıştır. pH ölçümleri için cam elektrotlu WTW ino Lab pH 720 marka Ph metre kullanılmıştır. Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> tayini için Varian ICP-AES Liberty-series II cihazı kullanılmıştır.

### **3.2.2. Halofilik Arkelerin İzolasyonu ve Kültürü**

Steril şartlarda toplanan tuzlu su örneklerinden her biri için hazırlanmış %0.1 oranında penisilin G (1000000 IU) içeren SG besiyerine (Torreblanca ve ark., 1986) 1'er mL ekim yapılmıştır. Ekim yapılan sıvı ortamlar 120 rpm de 37.5°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 5. gününden itibaren sıvı ortamlarda üreme bulanıklığı 7. günden itibaren pembe-kırmızı renklenme meydana gelmiştir. Bu kültürlerden yine %0.1 penisilin G içeren SG agar besiyerine seri sulandırma ile yayma ekim yapılarak 37.5°C'de inkübe edilmiş ve 10-15. günden itibaren pembe-kırmızı renk tonlardaki ve farklı morfolojiye sahip kolonilerden örnek alınarak tekrar saflaştırma amacıyla SG agar besiyerlerine ekilmiştir. Bu işlem ardışık olarak en az 5 kez tekrar edilmiştir.

### **3.2.3. Koloni Morfolojisi ve Pigmentasyon**

İzolatların saf kültürlerinin koloni morfolojileri standart mikrobiyolojik kriterlere göre yapılmıştır. Halofilik arke suşlarının koloni özellikleri (mukoidlik, koloni şekli, yandan görünüş, pigmentasyon, ışık geçirgenliği, koloni kenarı, yüzey görüntüsü

ve koloni çapı) katı ortamda 37.5°C'de 15 gün geliştirilmiş kültürler kullanılarak belirlenmiştir.

#### **3.2.4. Gram Boyama ve Hücre Morfolojisi**

Halofilik arke izolatlarının Gram boyamaları 7 günlük gelişmiş sıvı kültürlerden hazırlanan preparatlardan Dussault (1955)'e göre yapılmıştır. Preparatlar %2 asetik asitle muamele edildikten sonra rutin Gram boyama işlemi yapılarak immersiyon objektifi ile ışık mikroskopunda incelenmiştir.

İzolatların hücre morfolojileri ve hareket özellikleri 7 gün geliştirilen sıvı kültürlerden çukur ve düz lam kullanılarak hazırlanan preparatlar faz-kontrast mikroskopunda incelenerek belirlenmiştir.

#### **3.2.5. Biyokimyasal Testler**

İzolatların karakterizasyonu amacıyla Oren ve ark. (1997) tarafından önerilen biyokimyasal testler yapılmıştır. Testlerde inokülasyon için 15 günlük katı ve sıvı kültürler kullanılmış olup 37.5°C ve 120 rpm inkübasyon koşulları uygulanmıştır. Her biyokimyasal test için söz konusu test yönünden pozitif ve negatif özelliğe sahip standart halofilik arke suşları kullanılmıştır.

Katalaz aktivitesi, SG agarda geliştirilmiş 15 günlük kültürler üzerine %3 lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak belirlenmiştir (Rodriguez-Valera ve ark., 1983; Montalvo-Rodriguez ve ark. 1998).

Oksidaz aktivitesi, SG agar besiyerinde 15 gün geliştirilmiş kültürlerden platin öze ile alınan örneklerin %1 tetrametil-p-fenilendiamin emdirilmiş filtre kağıtlarına sürülmesi ile belirlenmiştir (Gonzalez ve ark., 1978; Montalvo-Rodriguez ve ark., 2000).

Jelatin ve Tween (20, 40, 60, 80) hidrolizi, Gutierrez ve Gonzalez (1972)'e göre yapılmıştır. SG agar besiyerinde 15 gün geliştirilen kültürlerde jelatin hidrolizini belirlemek amacıyla Frazier's ayracı kullanılmıştır. Tween hidrolizi ise kolonilerin etrafında opak zonlar oluşmasına göre değerlendirilmiştir.

Nişasta hidrolizi, %1 oranında nişasta içeren SG agarda 15 gün üretilen kültürler üzerine lugol damlatılarak belirlenmiştir (Takashina ve ark., 1990; Montalvo-Rodriguez ve ark., 1998).

Kazein hidrolizi, %0.15 oranında Skim Milk Powder içeren SG agar besiyerinde 15 gün geliştirilmiş kültürler ve %1 HCl kullanılarak belirlenmiştir (Tomlinson ve Hochstein 1976).

İndol retimi, %1 Tripton içeren SG sıvı besiyerinde 15 gün geliştirilen kültürler zerine Kovac's ayracı eklenerek test edilmiştir (Rodriguez-Valera ve ark., 1983).

Sodyum tiyosülfattan ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )  $\text{H}_2\text{S}$  retimi, sodyum tiyosülfat kurşun asetat emdirilmiş kağıtlar içeren sıvı SG besiyerinde 15 gün geliştirilen kültürlerdeki kurşun asetat emdirilmiş kağıt şeritlerdeki siyah renk oluşumuna bakılarak tespit edilmiştir (Franzmann ve ark., 1988).

Nitratın nitrite indirgenmesi ve gaz oluşumu, %1 oranında  $\text{KNO}_3$  içeren içerisinde durham tüpü bulunan sıvı SG besiyerinde 15 gün geliştirilmiş kültürlere Sülfanilik asit ve  $\alpha$ -naftilamin ayrağları eklenerek belirlenmiştir (Gonzalez ve ark., 1978; Montalvo-Rodriguez ve ark., 1998; Xin ve ark., 2000).

şekerlerden asit ve gaz üretiminin belirlenmesi amacıyla, D(+)-ksiloz, D(-)-riboz, D(+)-maltoz, D(+)-mannoz, D(+)-glukoz, D(-)-fruktoz, sükroz ve laktoz kullanılmıştır. şekerler filtre edilerek steril edilmiş ve SG sıvı besiyerine %1 olacak şekilde eklenmiştir. Ayrıca asit retimiiyle birlikte gaz oluşumunun da belirlenebilmesi için besiyerlerine durham tüpleri yerleştirilmiştir. İzolatların besiyerine inokülasyonu ve 15 gün inkübasyonu sonucunda kültürlere 1 damla fenol red damlatılarak asit üretimi belirlenmiştir (Torreblanca ve ark., 1986; Oren ve ark., 1999; Xin ve ark., 2000).

Arjinin varlığında anaerobik üremenin saptanması için sıvı SG besiyerine membran filtreyle steril edilmiş L-arjinin %0.5 oranında olacak şekilde eklenmiştir. 15 gün inkübasyon sonucunda üremenin varlığı 600 nm'de absorbans alınarak belirlenmiştir. Kontrol için arjinin içermeyen tüplere ekim yapılmıştır (Oren ve Litchfield 1999).

TMAO (Trimetilamin-N-oksit) varlığında anaerobik üremenin belirlenebilmesi için sıvı HEPES içeren SG besiyerine filtrasyon yöntemi ile steril edilmiş TMAO %0.5 oranında olacak şekilde eklenmiş ve pH 7.35'e ayarlanmıştır. Besiyeri ince ve vida kapaklı tüplere doldurulmuştur. 15 gün süre ile inkübasyon sonucunda üreme 600

nm'de türbidite okunarak yapılmıştır. Kontrol amacıyla TMAO içermeyen ve ekim yapılmış kültürler kullanılmıştır (Oren ve Trüper, 1990).

Nitrat varlığında anaerobik üreme için %0.5 KNO<sub>3</sub> içeren SG broth vida kapaklı tüplerde hazırlanmıştır. 15 günlük inkübasyon sonucunda üreme 600 nm'de absorbans okunarak belirlenmiştir. Kontrol amacıyla KNO<sub>3</sub> içermeyen tüplere ekim yapılarak kullanılmıştır (Mancinelli ve Hochstein, 1986).

Tüm anaerobik çalışmalarda besiyerlerine ekim işlemi azot veya helyum gazı altında gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.6. Antibiyogram Testi**

Antibiyotiklere karşı duyarlılık testlerinde sıvı SG besiyerinde 37.5 °C sıcaklıkta, 120 rpm devirde 7 gün üretilmiş kültürler kullanılmıştır. Kültürlerin yoğunluğu, 3 No'lu Mac-Farland bulanıklık tüpüne göre tuzlu su (SG besiyerinin anorganik kısmı) ile ayarlanmıştır. Bulanıklıkları ayarlanan kültürlerden 0.1ml SG agar besiyerinin yüzeyini örtecek şekilde yayılmış ve 10 dakika kurutulmuştur. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra antibiyotik diskleri yerleştirilmiş ve 37.5°C sıcaklıkta 15 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki zon çapları ölçülerek izolatların antibiyotiklere karşı duyarlılıkları belirlenmiştir (Oren ve ark., 1997).

### **3.2.7. Polar Lipitlerin İnce Tabaka Kromatografisi**

#### **3.2.7.1. Polar Lipit Ekstraksiyonu**

Membran polar lipitlerinin belirlenmesi amacıyla 20 mL sıvı SG besiyerinde 37.5°C de 120 rpm de 15 gün boyunca geliştirilen kültürler kullanılmıştır. Polar lipit ekstraksiyonu için sırasıyla şu işlemler uygulanmıştır; Kültürler 20 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak santrifüj edilmiş ve hücrelerin ayrılması sağlanmıştır, elde edilen hücre pelleti üzerine 0.75 mL distile su ve 3.75 mL kloroform metanol (1/2) eklenmiş ve pelletin çözüldükten sonra ekstraksiyon için 2 saat bekletilmiş ve santrifüj edilmiştir, üst faz temiz bir tüpe aktarılmış ve kalan pellet üzerine 4.75 mL kloroform/metanol/distile su (2/1/0.8) eklenmiş, tekrar santrifüj yapılmış ve üst faz bir önceki tüpte bulunanla birleştirilmiştir, birleştirilmiş üst fazlar üzerine 2.5 mL kloroform ve 2.5 mL distile su eklenmiştir, alt faz alınarak küçük kahverenkli cam

şişelere konulmuş ve solventin vakumlu desikatörde uçması ve ekstraktların kuruması sağlanmıştır.

### **3.2.7.2. İnce Tabaka Kromatografisi**

Kurutulan ekstraktlar üzerine kloroform ilave edilerek polar lipidlerin çözülmesi sağlanmış ve ince tabaka kromatografisi için silikajel kaplı cam plakalara yüklenmiştir. Plakalar, kloroform/metanol/asetik asit/distile su (85/22.5/10/4) içeren yürütme çözeltisine maruz bırakılarak lipid örneklerinin yürümesi sağlanmıştır. Yürütme işlemi sonrası plakalar kurutulmuş ve daha sonra polar lipidlerin belirgin hale getirilmesi için aşağıda belirtilen çözeltiler spreyleneştir.

Polar lipidlerin (fosfolipitler ve glikolipitler) belirlenmesi amacıyla %0.5  $\alpha$ -naftol (%50 metanolde) çözülüp plaka üzerine spreyleneştir ve ardından 47.5 mL etanol ve 2.5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> karışımı spreyleneştir. Plakalar 150°C'de ısıtıldıktan sonra kahverengi lekeler glikolipid olarak, mor lekeler ise fosfolipit olarak tespit edilmiştir (Oren ve Gurevich, 1993; Oren ve ark., 1996; Litchfield ve Oren, 2001).

### **3.2.8. Tüm Hücre Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)**

#### **3.2.8.1. Protein Ekstraksiyonu**

İzolatların 37.5°C'de 120 rpm de çalkalamalı olarak 3 kez arda arda 7 günlük inkübasyonu sonucunda senkron kültürler elde edilmiştir. 3 mL'lik sıvı kültürlerden santrifüjle toplanan hücre pelleti %25 NaCl ile yıkanmış ve tekrar santrifüj edilmiştir. Oluşan pellet üzerine 50  $\mu$ L SDS-örnek tamponundan (Laemmli, 1970) eklenerek proteinlerin ekstraksiyonu sağlanmış ve ekstraktlar denatürasyon için kaynar su banyosunda tutulmuştur.

#### **3.2.8.2. SDS-PAGE**

İzolatların tüm hücre protein profillerinin çıkarılması için %4 yığıma jeli ve %10 ayırma jelinden oluşan SDS-poli akrilamid jel sistemi kullanılmıştır (Laemmli 1970). Jel hazırlama aşamasında; 1.5 M tris çözeltisi (pH 8.8), 0.5 M tris HCL çözeltisi (pH 6.8),



%10'luk SDS çözeltisi, akrilamid/bisakrilamid çözeltisi (%30), %10'luk amonyum persülfat çözeltisi (APS), TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilediamin) kullanılmıştır.

SDS-poliakrilamid jelinin hazırlanması:

Ayırma jeli (%10)

Distile su	14.1 mL
1.5M tris çözeltisi	8.75 mL
Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi ((30g/0.9g)/dL)	11.7 mL
%10 APS çözeltisi	175 µL
%10 SDS çözeltisi	0.35 mL
TEMED	17.5 µL

Yığılma jelinin hazırlanması (% 4)

Distile su	4.3 mL
0.5M tris çözeltisi (pH 6.8)	1.75 mL
Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi (%30)	0.93 mL
%10 APS çözeltisi	35 µL
%10 SDS çözeltisi	70 µL
TEMED	7 µL

Örnekler jele yüklendikten sonra sırasıyla 25 ve 30 mA de yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi sonrası jel boyama çözeltisinde bekletilmiş ve boyanın fazlası giderildikten sonra fotoğrafı çekilmiştir.

### 3.2.9. İzolatların Üreme İçin Gerekli Minimum ve Optimum Tuz (NaCl)

#### Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Minimum ve optimum tuz konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için SG besiyerinde NaCl dışındaki bileşenler sabit tutularak NaCl final konsantrasyonları 0.5, 1, 2, 3, 4, 4.5 ve 5 M olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerine inokülasyon yapıldıktan sonra 37.5°C'de 120 rpm'de çalkalamalı olarak 15 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin üreme oranını belirlemek için 600nm de absorbansları ölçülmüştür.

### **3.2.10. Hücre Lizisini Önleyen Minimum Tuz (NaCl) Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Hücrenin yapısal bütünlüğünü koruması için gereken minimum tuz konsantrasyonu'nun belirlenebilmesi amacıyla kültürler santrifüj edilmiş üst faz tamamen dökülmüştür. Pellet üzerine çalışmanın yürütüleceği konsantrasyonlarda NaCl içeren tuzlu su eklenerek yıkama işlemi yapılmıştır. Hücre süspansiyonu tekrar santrifüjlendikten sonra yine pellet üzerine çalışmanın yapılacağı farklı konsantrasyonlardaki tuzlu su çözeltilerinden (%5, %7.5, %10, %12.5, %14, %20) eklenmiş ve iyice karışması sağlandıktan sonra spektrofotometrede 600 nm'de absorbans alınmıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

##### 4.1. Tuzlu Su Örneklerinin Kimyasal Özellikleri

Halofilik arkelerin izole edildikleri ortamın kimyasal özelliklerinin incelenmesi onların hangi ekolojik koşulları tercih ettiklerinin belirlenmesi açısından önemlidir. Halofilik arke suşlarının izole edildiği, tuz madeninin dört farklı bölgesinden alınan tuzlu su örneklerinin (Csu1, Csu2A, Csu2B ve CsuC) pH, toplam Sertlik,  $\text{CO}_3^{-2}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Na}^+$  konsantrasyonları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.1 de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Çankırı Çankaya tuz madeninden alınan tuzlu su örneklerinin kimyasal analiz sonuçları

	Csu1	Csu2A	Csu2B	Csu3	Saf su
<b>pH</b>	6.61	7.03	7.06	6.72	6.0
<b>T. Sertlik (F)</b>	3.8	3.1	3.8	3.7	<1.2
<b><math>\text{SO}_4^{-2}</math> (mg/L)</b>	7400	7400	7500	7500	8
<b><math>\text{Cl}^-</math> (mg/L)</b>	209000	230000	192000	200000	<10
<b><math>\text{CO}_3^{-2}</math> (me/L)</b>	-	-	-	-	-
<b><math>\text{HCO}_3^-</math> (me/L)</b>	1.2	1.6	2.2	1.8	-
<b><math>\text{Ca}^{2+}</math> (ppm)</b>	790	920	970	940	-
<b><math>\text{Mg}^{2+}</math> (ppm)</b>	530	490	510	560	-
<b><math>\text{K}^+</math> (ppm)</b>	210	190	190	240	-
<b><math>\text{Na}^+</math> (ppm)</b>	67200	18600	102300	88700	-

Tuzlu su örneklerinin, pH değerleri 6.61-7.06,  $\text{SO}_4^{-2}$  değerleri 7400-7500 (mg/l), toplam sertlik değerleri 3.1-3.8 F,  $\text{HCO}_3^-$  değerleri 1.2-2.2 me/l,  $\text{Ca}^{2+}$  değerleri 790-970 ppm,  $\text{Mg}^{2+}$  değerleri 490-560 ppm,  $\text{K}^+$  değerleri 190-240 ppm,  $\text{Na}^+$  değerleri 18600-102300 ppm aralığında bulunurken  $\text{CO}_3^{-2}$  bulunamamıştır.

Halofilik arkelerin çok yüksek miktarda NaCl ve KCl bulunan ortamlarda geliştikleri ve yüksek miktarda NaCl'e kesinlikle ihtiyaç duymaları halofilik arkelerin en dikkat çekici özelliğidir. Araştırmacılar aşırı halofilik arkelerin gelişmesi için en az 1.5 M NaCl'e ihtiyaç olduğunu, çoğu türlerin ise 3.5-4.5 M NaCl de optimum geliştiklerini belirlemişlerdir. Ortamda bulunan yüksek miktardaki NaCl'nin aktif

taşımada ve halofilik arkelerin yapısal bütünlüğünü kaybetmemesinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Kushner, 1985).

Halofilik arkelerin tercih ettikleri ekolojik koşullarla ilgili olarak, her ne kadar en az 1.5 M NaCl konsantrasyonlarına ihtiyaç duysalar da sahil bataklıkları, derin deniz kuyuları, denizler ve düşük tuz konsantrasyonuna sahip tuzlalar gibi bölgelerden de halofilik arkelerin izole edildikleri rapor edilmiştir (Elshahed ve ark., 2004).

Araştırmalara göre halofilik arkelerin, tuz gölleri, soda gölleri, tuzlalar, tuz madenleri gibi nötrofilik veya alkalifilik, aynı zamanda NaCl oranı minimum 1.5 M olan yüksek tuzlu ortamlarda yoğun şekilde buldukları belirtilmiştir. Özellikle halofilik arkelerin pH değeri bakımından gelişimlerini sürdürebildikleri en asidik ortamın pH değeri 6.0 civarında olan Ölü Deniz olarak rapor edilmiş olması, elde edilen tuzlu su örneklerinin kimyasal analiz sonuçlarını desteklemektedir (Arahal ve ark., 1996; Oren ve Rodriguez-Valera, 2001).

Yüksek tuzlu soda göllerinden çok sayıda alkalifilik halofilik arke türü izole edilmiştir. Bu türlerin optimal geliştikleri pH değerleri 9-10 arasındadır ve nötral pH da gelişemezler. Alkalifilik halofilik arkeler gelişimleri için yüksek  $Mg^{2+}$ 'a ihtiyaç duymazlar. Optimum ihtiyaç duydukları  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu 1 mM'ın altındadır, 10 mM'ın üzerindeki konsantrasyonların bu organizmaları inhibe edebileceği rapor edilmiştir. Nötrofilik halofilik arke türleri ise daha yüksek  $Mg^{2+}$  konsantrasyonuna (min. 50-100 mM) ihtiyaç duymaktadırlar (Oren, 2001).

Alkalifilik ortamlarda  $CO_3^{-2}$  miktarının fazla olmasına karşın Çankırı Çankaya tuz madeninden aldığımız tuzlu su örneklerinde bulunmaması, aynı zamanda tuzlu su örneklerimizin  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunun yüksek olması, pH aralığının da 6.61-7.06 olması izolatlarımızın nötrofilik halofilik arkeler olduğunu ortaya koymaktadır.

#### **4.2. Halofilik Arke İzolatları**

Ülkemizde ve dünyada farklı tuz madenlerinden halofilik arke izolasyonları karakterizasyonları ve identifikasyonları yapılmıştır (Norton ve ark., 1993; Stan-Lotter ve ark., 2002; Birbir ve ark., 2004;).

Çankırı Çankaya Tuz Madeni'nden alınan tuzlu su örneklerinden halofilik arkelerin izolasyon çalışmaları Penisilin G içeren SG sıvı ve katı besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tuzlu ortamlarda aşırı halofilik özellik gösteren arkelerle birlikte

çeşitli halofilik veya halotolerant (tuz toleranslı) bakterilerin de yaşadıkları bilinmektedir (Kushner, 1985; Oren, 2000). Dolayısıyla bu tipteki bakterilerin elimine edilmesi amacıyla izolasyon aşamasında SG besiyerine Penisilin G ilave edilmiştir (Torreblanca ve ark., 1986).

Çalışma kapsamına dahil edilen izolat seçimlerinin ön elemesi Oren ve arkadaşları tarafından (1997) belirtilen koloni ve hücre morfolojisi özelliklerine göre belirlenmiştir. Koloni morfolojisi özelliklerine göre birbirinden farklılık gösteren toplam 15 farklı halofilik arke izolatının saf kültürleri hazırlanmıştır. Bu izolatlar arasında ise öncelikle hücre morfolojilerine göre ve sonra tüm hücre protein profilleri sonuçlarına göre birbirinden farklılık gösterdiği saptanan 8 izolat çalışma kapsamına dahil edilmiştir. İzolatlar; CH2, CH3, CHA1, CHC, CH7, CH8K, CH8B, CH11 şeklinde isimlendirilmiştir.

#### **4.3. Halofilik Arke İzolatlarının Gram Reaksiyonu, Hareket, Koloni ve Hücre Morfolojisi Özellikleri**

İzolatların koloni morfolojisi, pigmentasyonları, hücre morfolojileri, Gram reaksiyonları ve hareket özellikleri halofilik arkelerin taksonomisinde kullanılan özellikler oldukları için önemlidirler (Ozcan ve ark., 2007).

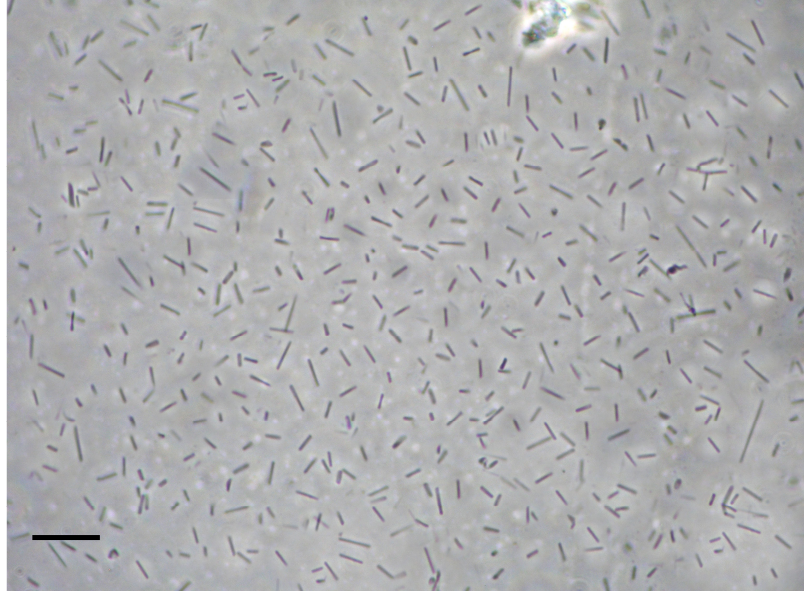
İzolasyon çalışmaları sonrasında elde edilen 8 farklı halofilik arke izolatının, gram reaksiyonu, hücre morfolojisi ve hareket özellikleri Çizelge 4.2.'de, koloni pigmentasyonları, koloni morfolojileri ise Çizelge 4.3.' te verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** İzolatların hücre morfolojileri, gram reaksiyonları ve hareket özellikleri

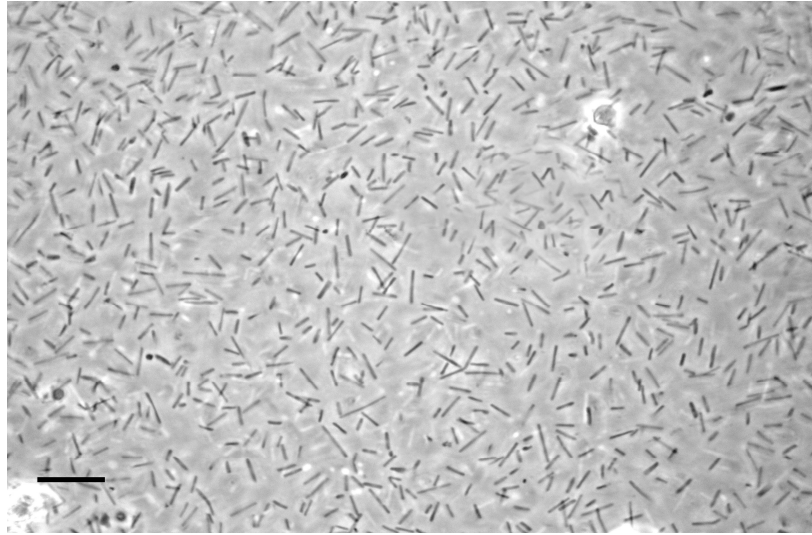
<b>İzolat</b>	<b>Gram reak.</b>	<b>Hücre şekli</b>	<b>Hareket</b>	<b>Hücre boyutları</b>
<b>CH2</b>	Gr(-)	Çubuk	Hareketli	2-15 µm
<b>CH3</b>	Gr(-)	Çubuk	Hareketli	2-10 µm
<b>CHA1</b>	Gr(-)	Pleomorfik	Hareketli	-
<b>CHC</b>	Gr(-)	Çubuk	Hareketli	2-10 µm
<b>CH7</b>	Gr(-)	Pleomorfik	Hareketli	-
<b>CH8K</b>	Gr(+/-)	kok	Hareketsiz	1-3 µm
<b>CH8B</b>	Gr(+/-)	kok	Hareketsiz	1-3 µm
<b>CH11</b>	Gr(-)	Pleomorfik	Hareketli	-

Dussault (1955)'e göre yapılan Gram boyama sonucunda, izolatların 6 tanesinin Gram (-) 2 tanesinin ise Gram değişken boyanma özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Kok şeklindeki 2 izolat olan CH8K ile CH8B Gram boyama sonrasında hücrelerin aynı preparat içerisinde hem Gram (-) hem de Gram (+) boyandığı gözlenmiştir. *Halobacteriales* ordosunun üyelerinin büyük bir kısmı Gram (-) özellikte olduğu ve *Natronococcus* ve *Halococcus* gibi kok morfolojisine sahip bazı üyelerinin Gram değişken özellik gösterdiği belirtilmiştir (Oren ve ark., 1997; Grant ve ark., 2001). Halofilik arkelerin non-kokkoid formlarının yüksek molekül ağırlığına sahip glikoproteinlerden oluşmuş hücre duvarına, *Halococcus* türlerinin ise sülfatlı heteropolisakkarit yapısında kalın bir hücre duvarına sahip oldukları belirtilmiştir (Oren, 2001). Kok şekilli organizmalardaki Gram değişken boyanma özelliğinin, kok şekilli olmayanlardan farklı bir hücre duvarı yapısına sahip olmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

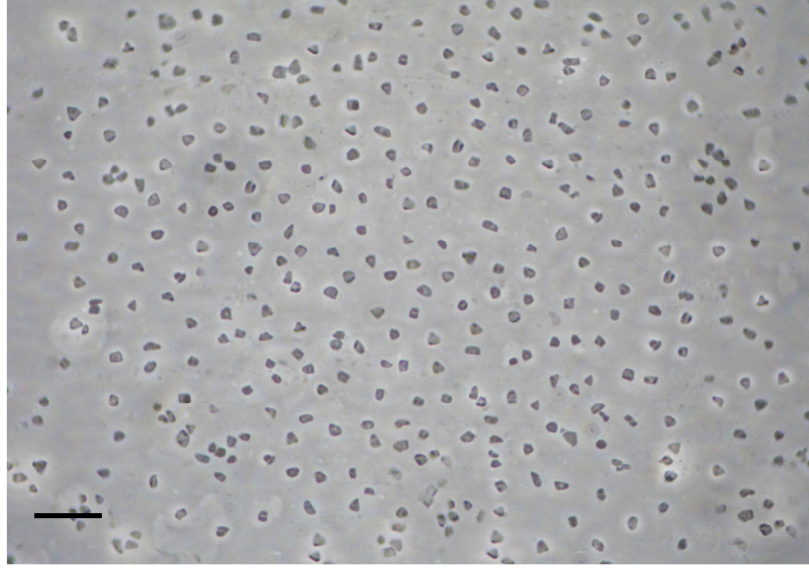
Halofilik arke izolatlarının hücre morfolojileri ve hareket özelliklerini belirlemek amacıyla SG-sıvı besi yerindeki 7 günlük inkübasyonları sonunda hazırlanan preparatların faz kontrast mikroskopunda incelemeleri yapılmıştır. Mikroskobik incelemeler sonucunda CH2, CH3 ve CHC izolatlarının çubuk, CHA1, CH7 ve CH11 izolatlarının pleomorfik, CH8K ve CH8B izolatlarının ise kok şekilli oldukları saptanmıştır (Şekil 4.1-4.8). Çubuk hücre morfolojisine sahip olan izolatların hücrelerinin kısa ve uzun tekli çubuklar halinde olduğu, pleomorfik hücre şekilli olan izolatlardan CHA1 ve CH7 izolatlarının düzensiz üçgen, kare, yamuk ve değişik şekillerde dörtgenlerden oluştuğu, CH11 izolatının yine pleomorfik fakat çok küçük düzensiz şekildeki hücre morfolojisine sahip olduğu, CH8K ve CH8B izolatlarının ise tekli, ikili, dördü ve gruplar halinde bir arada bulunan kok şekilli hücrelerden oluştukları saptanmıştır. *Halobacteriaceae* familyası üyelerinin ekstrem polimorfizm gösterdikleri çubuk, pleomorfik çubuk, kok, düz pleomorfik, düz kare ve üçgene kadar değişen, çeşitli morfolojik şekillere sahip oldukları belirtilmiştir (Oren, 2001).



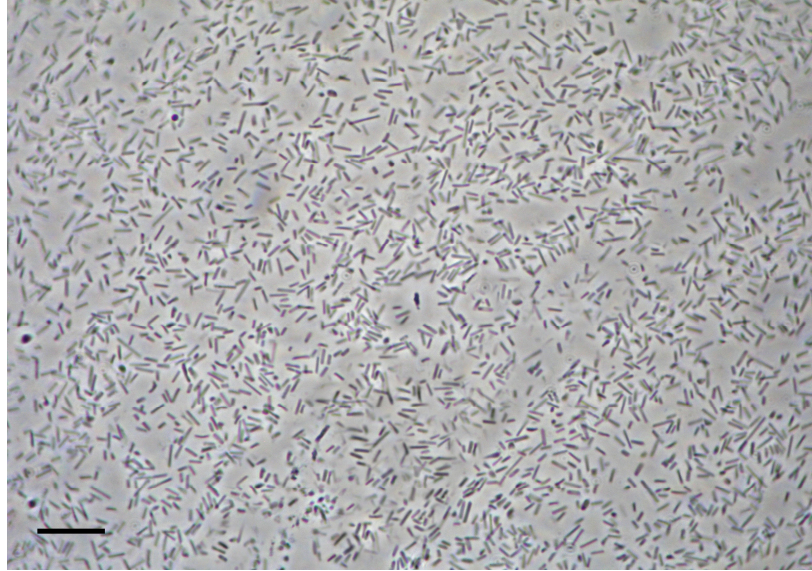
**Şekil 4.1.** SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH2 izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm)



**Şekil 4.2.** SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH3 izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm)

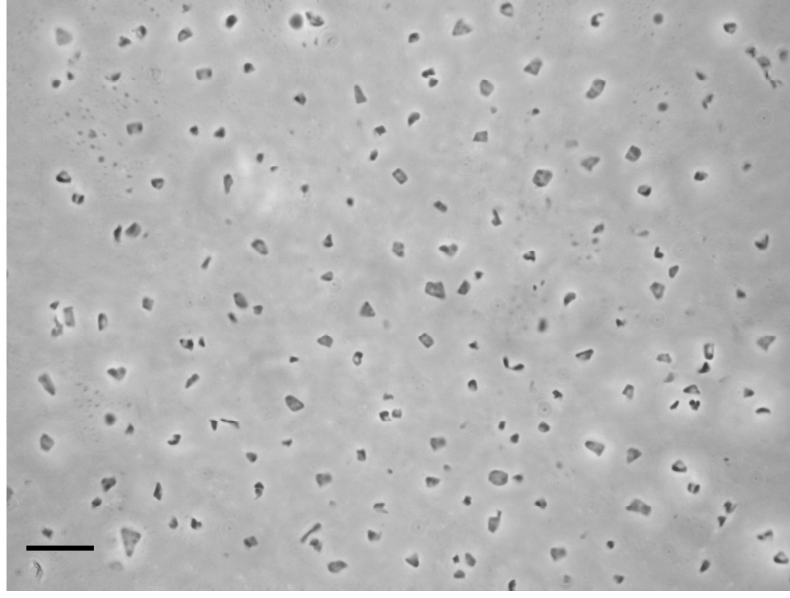


**Şekil 4.3.** SG sıvı besiyerinde 37.5°C'de 120 devir/dk.'da 7 gün üretilen CHA1 izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm)

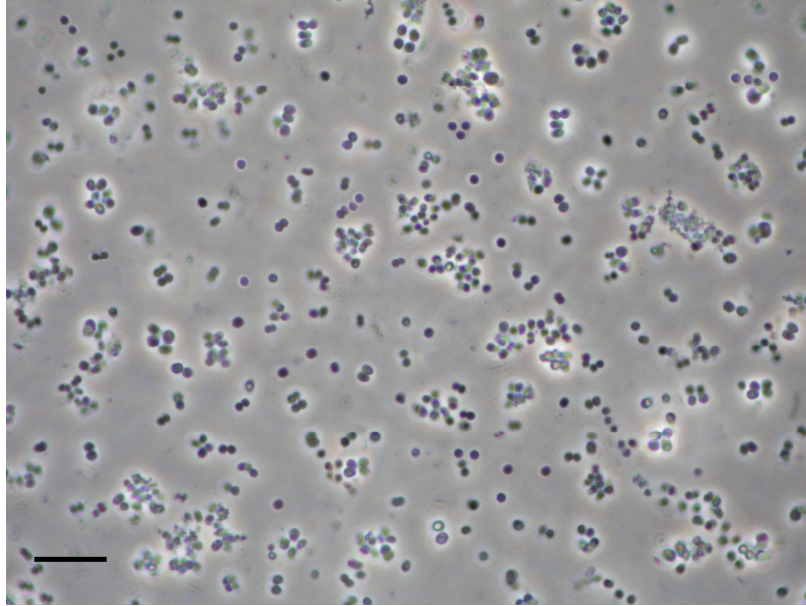


**Şekil 4.4.** SG sıvı besiyerinde 37.5°C'de 120 devir/dk.'da 7 gün üretilen CHC izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm)

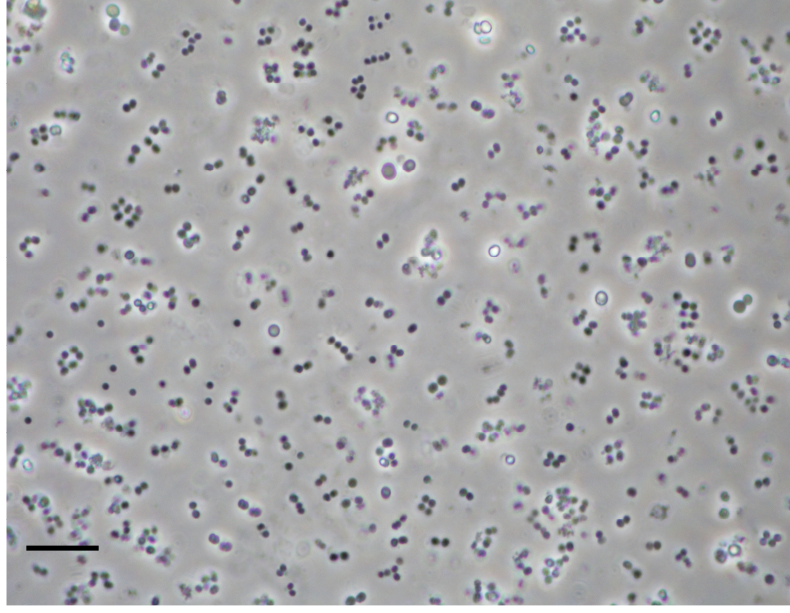




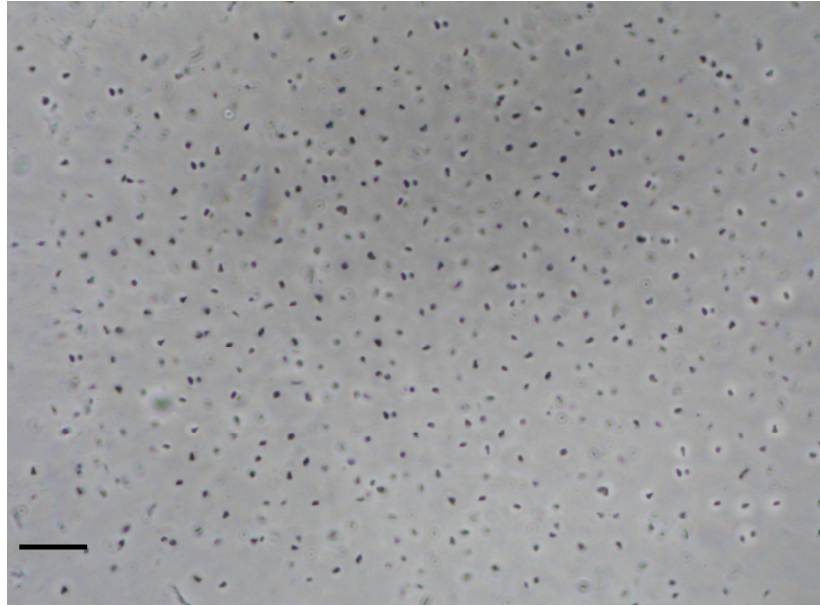
**Şekil 4.5.** SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH7 izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm)



**Şekil 4.6.** SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH8K izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm)



**Şekil 4.7.** SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH8B izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm)



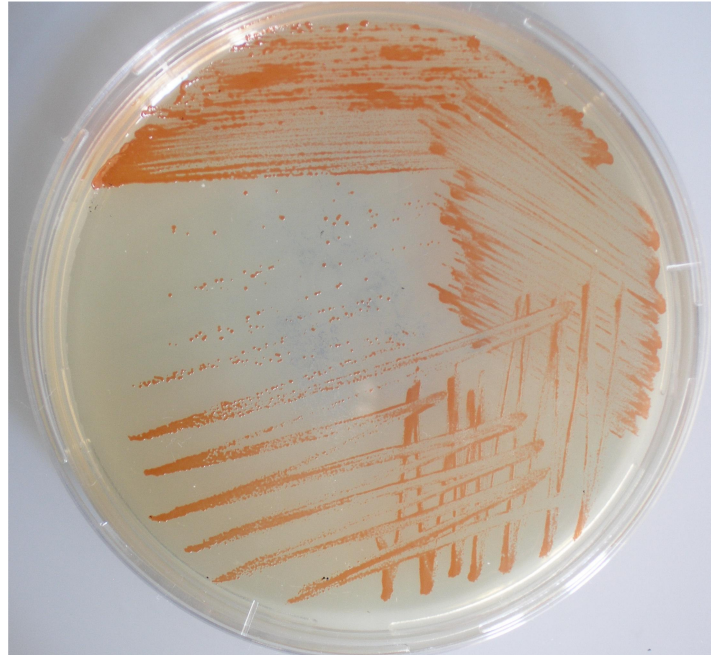
**Şekil 4.8.** SG sıvı besiyerinde 37.5°C’de 120 devir/dk.’da 7 gün üretilen CH11 izolatının faz kontrast mikroskop görüntüsü (bar 10 µm)

İzolatlar, hareket özellikleri yönünden ele alındığında kok şekilli iki izolat olan CH8K ve CH8B'nin hareketsiz, diğer 6 izolatın ise hareketli olduğu saptanmıştır. *Halobacteriaceae* familyası üyelerinin genellikle demet şeklindeki flagella veya polar flagellumları ile hareketli oldukları belirtilmiştir (Oren ve ark., 1999; Grant ve ark., 2001; Oren, 2001).

**Çizelge 4.3.** Halofilik arke izolatlarının koloni morfolojisi özellikleri

İzolat	Muk.	Kol.ş.	Yan.g.	Pigmentasyon	Işık g.	Kol.ken.	Yüz.g.	Kol.ç(mm)
CH2	-	Yuv.	Konveks	Yavruağzı	Şeffaf	Düz	Düz	0.3-0.75
CH3	-	Yuv.	Konveks	Çok açık kırmızı	Yarı şeffaf	Düz	Düz	0.25-0.6
CHA1	-	Yuv.	Konveks	Koyu kırmızı	Opak	Düz	Düz	0.2-0.5
CHC	-	Yuv.	Konveks	Çok açık kırmızı	Şeffaf	Düz	Düz	0.4-0.7
CH7	-	Yuv.	Konveks	Kırmızı	Opak	Düz	Düz	0.2-0.5
CH8K	-	Yuv.	Konveks	Pembe-Kırmızı	Opak	Düzensiz	Düz	0.1-0.2
CH8B	-	Yuv.	Konveks	Beyaz	Opak	Düzensiz	Düz	0.1-0.2
CH11	-	Yuv.	Konveks	Kırmızı	Şeffaf	Düz	Düz	0.15-0.25

Muk.: mukoid, Kol.ş.: koloni şekli, Yan.g.:Yandan görünüş, Işık g.:Işık geçirgenliği, Kol. Ken: koloni kenarı Yüz.g.: yüzey görünümü, Kol.ç.: koloni çapı., Yuv.: yuvarlak



**Şekil 4.9.** SG agar besiyerinde 37.5°C 15 gün üretilen CHA1 izolatının koloni morfolojisi

Sehgal Gibbons (SG) agar ortamında 15 gün geliştirilen izolatların 7 tanesinin (CH2, CH3, CHA1, CH7, CH8K, CH11) pembeden kırmızıya değişen renk tonlarında, 1 tanesinin beyaz renkli (CH8B) olduğu saptanmıştır. İzolat kolonilerinin ışık geçirgenliği yönünden şeffaf, yarı şeffaf veya opak görünümde oldukları tespit edilmiştir. Koloni şekli yönünden tüm izolatların yuvarlak, nonmukoid ve düz yüzeyli oldukları belirlenmiştir. CH2, CH8K ve CH8B kolonilerinin yandan görünüş yönünden alçak konveks, diğerlerinin ise normal yükseklikte konveks özellik gösterdikleri saptanmıştır. Koloni kenar yapısına göre CH8K ve CH8B izolatlarının düzensiz, diğer izolatların ise düz olduğu belirlenmiştir. *Halobacteriales* ordosunun pek çok üyesinin hücre zarlarında bulundurdukları yüksek orandaki karotenoid pigmentlerden dolayı kolonilerinin kırmızıdan pembe-turuncuya kadar değişen renk tonlarında pigmentasyon gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 4.9.) Ayrıca opak şeffaf yada yarı şeffaf, mukoid yada nonmukoid, düz kenarlı konveks görünümlü oldukları bildirilmiştir (Oren, 2001; Oren ve Rodriguez-Valera, 2001; Grant ve ark., 2001; Castillo ve ark., 2006a). Kırmızı pigmentasyon gösteren izolat ve suşlar sıvı besiyerinde ürediklerinde besiyerinin kırmızı renge dönmesine neden olmaktadır. Oren ve Rodriguez-Valera (2001), halofilik arkelerin içerdiği oldukları C-50 karotenoid pigmentlerinden ( $\alpha$ -Bakterioruberin ve türevleri) dolayı sıvı ortamlarda  $10^7$  hücre/mL yada daha yüksek yoğunluğa ulaştıklarında buldukları ortamların kırmızı renkte görünmesine neden olduklarını bildirmişlerdir.

#### **4.4. Halofilik Arke İzolatlarının Biyokimyasal Özellikleri**

Çankırı Çankaya Tuz Madeni'nden alınan tuzlu su örneklerinden izole edilen 8 izolatın çeşitli biyokimyasal özellikleri ve anaerobik üreyebilme özellikleri Oren ve arkadaşları (1997)'na göre belirlenmiştir. Her bir test için pozitif ve negatif özellikte olan standart suşlar kullanılmıştır. İzolatların katalaz aktivitesi, oksidaz aktivitesi, jelatin, nişasta, Tween (20, 40, 60, 80) ve kazein hidrolizi, Sodyum tiyosülfattan H<sub>2</sub>S üretimi, triptofandan indol üretimi, nitrat redüksiyonu ve gaz üretimi sonuçları Çizelge 4.4.'te, çeşitli karbonhidratlardan asit ve gaz üretimi sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir. Ayrıca izolatların çeşitli kimyasallar (nitrat, L-arjinin ve TMAO) varlığında anaerobik üremeleri belirlenmiştir.

Katalaz testi sonucunda tüm izolatlara ve standart suş olarak kullanılan *Haloferax mediterranei* katalaz ve oksidaz pozitif olarak bulunmuştur. Aerobik karakterdeki *Halobacteriales* ordosu üyelerinin katalaz ve oksidaz aktivitelerine sahip oldukları (Oren ve ark., 1997; Grant ve ark., 2001) bilgisiyle sonuçlarımız paralellik göstermektedir.

Pozitif standart olarak *Natrialba asiatica* DSM 12278 ve negatif standart olarak *Haloferax mediterranei* suşlarının kullanıldığı sodyum tiyosülfattan ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )  $\text{H}_2\text{S}$  üretimi testi sonuçlarına göre yalnızca CHA1 ve CH11 izolatlarının negatif sonuç verdiği diğer izolatların ise pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Sodyum tiyosülfattan ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )  $\text{H}_2\text{S}$  üretimi sonuçları daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Allen ve ark., 2008).

Jelatin hidrolizi testlerinde CHA1, CH8K ve CH8B pozitif jelatinaz aktivitesi gösterirken diğer izolatların Jelatinaz aktivitesi göstermedikleri belirlenmiştir. Jelatin hidrolizi testlerinde *Haloferax mediterranei* pozitif, *Haloarcula marismortui* negatif standart olarak kullanılmıştır.

Nişasta hidrolizi testlerinde *Haloarcula vallismortis* DSM 3756 pozitif, *Halobacterium salinarum* DSM 3754 negatif standart olarak kullanılmış olup sonuçta yalnızca CHA1 izolatının nişasta hidrolizini gerçekleştirdiği saptanmıştır.

Tween hidrolizi testlerinde tween 20, 40, 60 ve 80 ayrı ayrı test edilmiştir. CHA1 tüm tween testlerinde pozitif sonuç verirken, CH2, CH3 ve CHC tüm tween testlerinde negatif sonuç vermişlerdir. Diğer izolatlardan CH7 ve CH11 tween 20 ve 40 hidrolizinde pozitif sonuç verirken CH8K ve CH8B ise sadece tween 20 de pozitif sonuç vermişlerdir. Tween testlerinde tween 80 için *Natrialba asiatica* DSM 12278 pozitif, *Halobacterium salinarum* DSM 3754 negatif standart suş olarak kullanılmıştır.

Kazein hidrolizi testlerinde CH8K ve CH8B izolatlarının pozitif diğer izolatların ise negatif sonuç verdiği saptanmıştır. Kazein testlerinde *Natrialba asiatica* DSM 12278 pozitif, *Haloarcula vallismortis* DSM 3756 ise negatif standart olarak kullanılmıştır.

Yapılan araştırmalar, yüksek tuz konsantrasyonunda gelişen halofilik arkelerin buldukları ortamdaki organik madde artıklarını parçalayarak kendileri için karbon, azot ve enerji kaynağı sağladıklarını göstermiştir. Bu nedenle, bu organizmaların yaşadıkları ortamdaki protein (kazein, jelatin), lipid (tween) ve nükleik asit gibi

kompleks molekülleri parçalayabilmek için DNaz, lipaz, amilaz, jelatinaz, gibi özel enzimler ürettikleri saptanmıştır (Birbir ve ark., 2004).

Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) redüksiyonu testlerinde *Haloarcula vallismortis* DSM 3756 pozitif, *Halobacterium salinarum* DSM 3754 negatif standart olarak kullanılmıştır ve test sonucunda sadece CH11'in negatif sonuç verdiği görülmüştür. Nitrat redüksiyonu esnasında gaz üretimi testlerinde ise CHA1 ve CH7'nin pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Grant ve arkadaşları (2001) *Halobacteriales* üyelerinde  $\text{NO}_3^-$  redüksiyonu yeteneğinin olduğunu belirtmişlerdir.

İzolatlardan CHA1, CH8K ve CH8B triptofanın deaminasyonu sonucu indol oluştururken diğer izolatlarda indol üretimi negatif olarak belirlenmiştir. *Haloarcula vallismortis* DSM 3756 pozitif, *Haloarcula marismortui* negatif standart olarak kullanılmıştır. Kemoorganotrofik olan *Halobacteriales* üyelerinin karbon kaynağı olarak aminoasit ve proteinlerin bulunduğu ortamlarda çok iyi gelişebildikleri ve halofilik arkeler arasında proteaz üretiminin yaygın olduğu belirtilmiştir (Grant ve ark., 2001). Triptofanın deaminasyonu sonucu indol üretimi daha önceki çalışmalarla benzer bulunmuştur (Torreblanca ve ark., 1986; Grant ve ark., 2001).

Her biyokimyasal test için kullanılmış olan standart suşlardan beklenen sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar biyokimyasal test sonuçlarını desteklemektedir.

**Çizelge 4.4.** Halofilik arke izolatlarının bazı biyokimyasal test sonuçları

İzolat	Katalaz aktiv.	Oksidaz aktiv.	Jelatin hidrol.	Nişasta hidrol.	Tween hidrol	20	40	60	80	Kazein hidrol.	$\text{H}_2\text{S}$ üret.	Nitrat redük.	Nitrat gaz üret.	İndol üret.
CH2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
CH3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
CHA1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CHC	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
CH7	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
CH8K	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
CH8B	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
CH11	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Farklı şekerlerden asit ve gaz üretimi sonuçlarına göre izolatların hiçbir şekerden gaz üretmediği ve izolatların büyük bir kısmının riboz ve ksiloz şekerlerinden asit oluşturdukları belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Glukoz varlığında CH2, CH3, CHC ve CH11 izolatları asit oluştururken diğer izolatların glukozu fermente edemedikleri saptanmıştır. Sükrozdan asit üretimi sadece CH2 ve CHC izolatlarında görülmüştür. Laktozu hiçbir



izolatın fermente edemediği belirlenmiştir. CHA1 ve CH7 izolatlarının maltoz ve fruktozu kullanıp asit oluşturdıkları, CH2 izolatının ise sadece maltozdan asit ürettiği tespit edilmiştir. Ksilozdan CH8K ve CH8B haricindeki tüm izolatların asit ürettiği belirlenmiştir. Mannozu sadece CH2 ve CHC izolatlarının fermente edebildiği, riboz şekerini ise CH2, CH3 ve CHC izolatları haricinde tüm izolatların fermente edebildiği belirlenmiştir. Kemoorganotrofik ekstrem halofilik arkelerin enerjilerini aminoasitleri kullanarak sağlamalarının yanı sıra çeşitli karbohidratlarda kullanabilecekleri rapor edilmiştir (Oren, 2001; Grant ve ark., 2001). Halofilik arkelerde şekerlerin yıkımının modifiye Entner-Doudoroff metabolik yolu ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Oren, 2001).

**Çizelge 4.5.** Halofilik arke izolatlarının çeşitli karbohidratlardan asit ve gaz üretimi sonuçları

	Glukoz		Sükroz		Laktöz		Fruktoz		Maltoz		Ksiloz		Mannoz		Riboz	
	Asit	Gaz	Asit	Gaz	Asit	Gaz	Asit	Gaz	Asit	Gaz	Asit	Gaz	Asit	Gaz	Asit	Gaz
<b>CH2</b>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<b>CH3</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>CHA1</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<b>CHC</b>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<b>CH7</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<b>CH8K</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>CH8B</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>CH11</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-

L-Arjinin, TMAO (Trimetilamin-N-oksit) ve  $KNO_3$  kimyasalları varlığında izolatların anaerobik gelişimleri test edilmiştir. L-Arjinin ve TMAO varlığında hiçbir izolatta anaerobik üreme görülmemiş fakat  $KNO_3$  varlığında sadece CH7 izolatında pozitif sonuç alınmıştır. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda oksijen çözünürlüğünün az olmasından dolayı halofilik arkelerin çoğu anaerobik olarak farklı kimyasalların varlığında üreme yeteneğine sahiptirler. Anaerobik olarak üreme amacıyla fumarat, TMAO, DMSO veya nitrat gibi alternatif elektron alıcılarını kullanabildikleri ve bazı türlerin L-arjinin fermentasyonu ile anaerobik üreyebildiği belirtilmiştir (Hartmann ve ark., 1980; Mancinelli ve Hochstein, 1986; Oren ve Trüper, 1990; Oren ve Litchfield, 1999).

#### **4.5. Halofilik Arke İzolatlarının Gelişimi İçin Gerekli Minimum ve Optimum NaCl Konsantrasyonu**

*Halobacteriaceae* familyası üyeleri, solar tuzlalar, Ölüdeniz ve diğer yüksek tuzlu göller dahil NaCl konsantrasyonu yaklaşık %25'i aşan yüksek tuzlu ekosistemlerin dominant organizmalarıdır. Halofilik arkelerin ortak özelliği yüksek NaCl konsantrasyonuna ihtiyaç duymalarıdır. Bu familya üyelerinin minimum 1.5 M NaCl gereksinimi olmasına karşın birkaç araştırma bu aile üyelerinin çeşitli düşük tuzlu çevrelerden de izole edilebileceklerini göstermiştir (Oren, 2001; Elshahed ve ark., 2004).

Halofilik arkelerin minimum ve optimum tuz konsantrasyonlarının belirlenmesi, sınıflandırma çalışmalarında da kullanılan bir kriter olduğundan önemlidir (Oren ve ark., 1997).

İzolatların gelişimi için gerekli minimum NaCl değerleri incelendiğinde CHA1 için 2 M, diğer izolatlar içinse 3 M olduğu belirlenmiştir. İzolatların gelişimi için optimum NaCl değerlerinin ise 4-4.5 M aralığında olduğu saptanmıştır. CH2, CHC ve CH11 izolatlarının optimum NaCl gereksinimleri 4 M olarak, diğer izolatların ise 4.5 M olarak bulunmuştur. Genel olarak halofilik arkelerin gelişmeleri için gerekli NaCl konsantrasyonlarının minimum 1.5 M, optimum 3.5-4.5 M aralığında olduğu rapor edilmiştir (Ozcan ve ark., 2007).

#### **4.6. Halofilik Arke İzolatlarının Hücre Lizisini Önleyen Minimum NaCl Konsantrasyonları**

İzolatların hücre lizisini önleyen NaCl konsantrasyon değerleri, CH2, CH3, CHA1 ve CH11 için %10, CHC ve CH7 için %12,5 olarak bulunurken hücreleri kok şeklinde olan CH8K ve CH8B izolatlarının ise distile suda dahi lizize uğramadıkları belirlenmiştir.

*Halobacteriales* ordosunun bir çok üyesi yapısal stabilite için yüksek oranda tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Kok morfolojisine sahip olmayan halofilik arke türlerinde hücrelerin %10'un altındaki NaCl konsantrasyonlarda lizize uğradıkları, fakat



kok hücre şeklinde olan türlerin sülfatlı heteropolisakkarit yapısında kalın hücre duvarına sahip olmalarından dolayı düşük tuzlu ortamlarda lizize karşı yüksek direnç gösterdikleri yada lize olmadıkları belirtilmiştir (Oren ve ark., 1997, Oren 2001).

#### 4.7. Halofilik Arke İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

Halofilik arkelerin karakterizasyonu ve karşılaştırılması ile ilgili taksonomik çalışmalarda antibiyotik duyarlılık testleri önemli yer tutmaktadır (Oren ve ark., 1997). Disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda halofilik arke izolatlarının tamamının kullanılan 15 farklı antibiyotikten Bazitrasin (10 IU) ve Novobiyosin (30 µg)'e karşı ve CH2, CH3 ve CHC dışında diğer izolatların Rifampisin (5 µg)'e karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Buna karşılık tüm izolatların Streptomisin (25 µg), Vankomisin (30 µg), Sülfametazol/Trimetoprim (25 µg), Eritromisin (15 µg), Neomisin (30 µg), Kloramfenikol (30 µg), Azitromisin (15 µg), Trimetoprim (5 µg), Norfloksasin (10 µg), Ampisilin (10 µg), Penisilin G (10 IU), Tetrasiklin (30 µg) antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları bulunmuştur.

**Çizelge 4.6.** Halofilik arke izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık test sonuçları

Antibiyotikler	İzolat							
	CH2	CH3	CHA1	CHC	CH7	CH8K	CH8B	CH11
Rifampisin(5µg)	R	R	0.9cm	R	0.3cm	1.4cm	1.5cm	0.8cm
Streptomisin (25µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Vankomisin (30µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Sülfametazol/trimetoprim (25µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Eritromisin (15µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Bazitrasin (10IU)	1.6cm	1.2cm	2.5cm	1.5cm	2.1cm	2.7cm	3.4cm	1.2cm
Neomisin (30µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Kloramfenikol (30µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Azitromisin (15µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Trimetoprim (5µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Norfloksasin (10µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Novobiyosin (30µg)	1.7cm	2cm	2.2cm	1.8cm	1.8cm	3.5cm	2.5cm	3.3cm
Ampisilin (10µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Penisilin G (10IU)	R	R	R	R	R	R	R	R
Tetrasiklin (30µg)	R	R	R	R	R	R	R	R

Zon değerleri yarıçap ve cm cinsinden verilmiştir, R: dirençli

*Halobacteriales* üyeleri karakteristik olarak penisilin, Ampisilin, Neomisin, Streptomisin, Kanamisin gibi bakterilere spesifik antibiyotiklere karşı dirençlidirler (Pecher ve Böck, 1981; Bonelo ve ark., 1984).  $\beta$ -Laktam halkası içeren penisilin ve ampisilin bakterilerde hücre duvarı sentezinde transpeptidasyonu sağlayan trans peptidaz enzimini inhibe ederek duvar sentezini engellemektedir. Bir glikopeptid olan vankomisin ise peptidoglikan öncüllerinde bulunan D-alanil-D-alanin peptidinin uç kısmına dönüşümsüz olarak bağlanarak peptidoglikan sentezini inhibe etmektedir (Jocklik ve ark., 1992; Madigan ve ark., 2000). Halofilik arkealar, bakterilere spesifik olan peptidoglikan yapısında hücre duvarına sahip olmadıkları için bu tip antibiyotiklerden etkilenmemektedirler (Pecher ve Böck, 1981; Bonelo ve ark., 1984; Böck ve Kandler 1985).

Bakterilerde 50S ribozom alt birimine bağlanarak translasyonu engelleyen ve bu şekilde protein sentezini inhibe eden makrolid grubundan Eritromisin antibiyotiği ve onun yarı sentetik türevi olan Azitromisine (Jocklik ve ark., 1992; Madigan ve ark., 2000) karşı dirençli oldukları saptanmıştır.

50S ribozom alt birimine bağlanarak bakterilerde peptidil transferaz inhibisyonu ile protein sentezini engelleyen Kloramfenikole karşı halofilik arke izolatlarının dirençli oldukları belirtilmiştir (Madigan ve ark., 2000). Ayrıca arkeal ribozomların, bakteriyel ribozomlarda bulunan Kloramfenikol ve Streptomisin gibi antibiyotiklerin bağlanma bölgelerine sahip olmadıkları da bildirilmiştir (Matheson, 1985).

Tüm izolatların bakterilerde 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe eden aminoglikozit grubu Neomisine karşı dirençli oldukları bulunmuştur. Halofilik arkeaların Neomisine dirençleri ile ilgili olarak, antibiyotiğin bazik bileşikler içeren bağlanma bölgeleriyle yüksek miktardaki tuzun elektrostatik etkileşime girmesinin sonucu olabileceği belirtilmiştir (Bonelo ve ark., 1984; Böck ve Kandler, 1985).

Çalışmalarımız sonucunda izolatların naftasen halkası içeren 30S ribozom alt biriminde aminoasit tRNA'nın A bölgesine bağlanmasını engelleyerek protein sentezini inhibe eden Tetrasikline (Madigan ve ark., 2000) dirençli oldukları bulunmuştur.

Disk difüzyon testleri sonuçlarına göre halofilik arke izolatlarının bakteriyel DNA girazın *gyrA* alt ünitesine bağlanarak DNA'nın süper sarmal oluşturmasını engelleyen Norfloksasin antibiyotiğine karşı dirençli oldukları saptanmıştır (Madigan ve ark., 2000).

Tüm halofilik arke izolatlarının Novobiyosin antibiyotiğine karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir. Novobiyosin antibiyotiği bir DNA giraz inhibitörüdür ve bakterilerde olduğu gibi halofilik arkeleri etkilediği rapor edilmiştir (Sioud ve ark., 1988).

Halofilik arke izolatlarının tamamının Basitrasin antibiyotiğine duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Basitrasin antibiyotiğinin hücre duvarı sentezini inhibe ettiği belirtilmiştir (Jocklik ve ark., 1992; Madigan ve ark., 2000). Yapılan çalışmalarda halofilik arkelerin peptid yapısındaki Basitrasin antibiyotiğine karşı duyarlı oldukları belirtilmiştir (Sioud ve ark., 1988). Basitrasin antibiyotiğinin lipit biyosentezini inhibe ettiği ve bu yol ile hücre duvarı oluşumunu engellediği rapor edilmiştir (Bonelo ve ark., 1984).

Çalışmamızda halofilik arke izolatlarından CH2, CH3 ve CHC Rifampisin antibiyotiğine karşı dirençli, diğer izolatların ise duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Rifampisin antibiyotiğinin bakterilerde DNA'ya bağlı RNA polimerazı inaktive ettiği bilinmektedir (Jocklik ve ark., 1992). Yapılan çalışmalara göre Rifampisin halofilik arkelerin çoğunda inhibitör etkiye sahip olduğu belirtilirken (Pecher ve Böck, 1981; Bonelo ve ark., 1984) diğer bir çalışmada ise bazı halofilik arkelerin Rifampisine dirençli oldukları rapor edilmiştir (Allen ve ark., 2008).

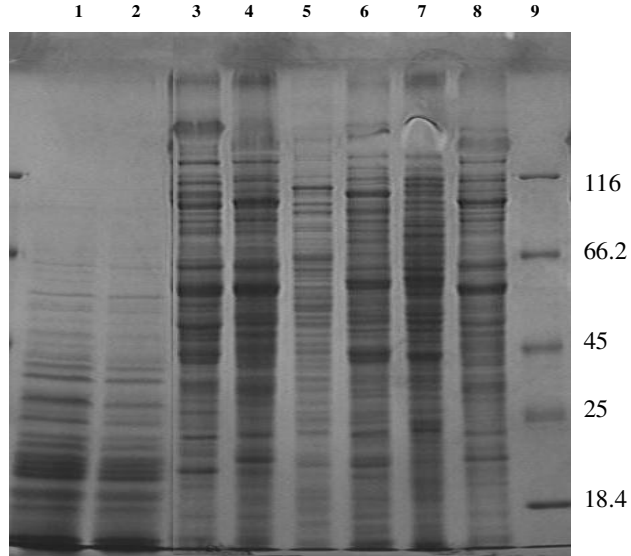
#### **4.8. Halofilik Arke İzolatlarının Tüm Hücre Protein Profilleri**

Tuzlu su örneklerinden halofilik arke izolasyonunun ilk aşamasında elde edilen toplam 15 izolat arasından farklı koloni morfolojisine sahip olanlar belirlenmiş ve bir sonraki aşamada bu izolatların tüm hücre protein profilleri çıkarılmıştır (Laemmli 1970, Ozcan ve ark., 2006). SDS-PAGE sonucuna göre benzer protein içeriğine sahip olanlar elimine edilmiştir. Tüm hücre SDS-PAGE protein profillerinin bakteriyel türlerin ayırt edilmesinde kullanılan hızlı bir metot olduğu ve DNA-DNA hibridizasyonuna benzer bir ayırım sağladığı belirtilmiştir (Jackman, 1987). Ayrıca halofilik arkelerde de tüm hücre protein profili çalışmalarının taksonomik amaçlı araştırmalarda izolat sayısının indirgenmesi için kullanışlı ve kolay bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Hesselberg ve Vreeland, 1995).

Çalışma kapsamında SDS-PAGE sonucunda 15 izolattan CH2, CH4, CH5, CH6, CH9 izolatlarının, CH1 ve CH3'ün, CHA1 ve CHAK'nın, CH7 ile CH12'nin, aynı

protein profiline sahip olduğu, CHC, CH11 izolatlarının ise diğer izolatlardaki protein profillerine benzemediği tespit edilmiştir. CH8K ve CH8B izolatlarının protein profilleri benzemesine rağmen koloni pigmentasyonları farklı olduğu için farklı iki izolat olarak çalışma kapsamına dahil edilmiştir.

Bu alışma ile izole edilen birbirinden farklı kabul edilebilecek izolat sayısı belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da halofilik arke tüm hücre protein profilleri karşılaştırılarak birbirinden farklılık gösteren izolatlar belirlenmiştir (Elevi ve ark., 2004; Ozcan ve ark., 2006). Ayrıca Stan–Lotter ve arkadaşları (2002), *Halococcus dombrowskii* türünün tanımlanması aşamalarında bu organizmanın diğer koklardan ayırd edilmesi amacıyla SDS-PAGE tüm hücre protein profili analizini de kullanmışlardır.



**şekil 4.10.** Halofilik arke izolatlarının SDS-PAGE hücre protein profilleri

1: CH8K, 2: CH8B, 3: CH3, 4: CHC, 5: CH11, 6: CH7, 7: CHA1, 8: CH2, 9: Marker (kDa)

Çalışma sonrasında oluşan bantlar değerlendirildiğinde 8 farklı izolat için 7 farklı protein profili görülürken koloni pigmentasyonları farklı olan CH8K (kırmızı) ve CH8B (Beyaz) protein profillerinin birbirinin aynı olduğu görülmektedir (şekil 4.10). Halofilik arkelerin kromozomlarındaki insersiyon sekanslarının fazla olduğu ve bunların yüksek sıklıkta spontan mutasyonlara neden oldukları belirtilmiştir (DasSarma, 1993). Bu bilgiler ışığında CH8K ve CH8B izolatlarının aynı tür olabilecekleri ve

pigmentasyon farklarının ise belirtilen insersiyon sekanslarından kaynaklanabileceği sonucuna varılmaktadır.

#### 4.9. Halofilik Arke İzolatlarının Membran Polar Lipitlerinin Analizi

Günümüzde halofilik arkelerin sınıflandırılması, fenotipik özellikler, kimyasal (özellikle polar lipit kompozisyonu) ve genetik (16S rRNA sekans analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu) veriler olmak üzere üç tip veri esas alınarak yapılmaktadır (Oren ve ark., 1997; Grant ve ark., 2001; Castillo ve ark., 2006 b; Gutiérrez ve ark., 2007). Halofilik arkelerin membran polar lipitlerinin analiz çalışmaları en önemli kemotaksonomik çalışma olarak kabul edilmektedir.

Çankırı Çankaya Tuz Madeni'nden izole edilen halofilik arke izolatlarının membran polar lipit analizi için *Halobacteriaceae* familyasına ait 5 standart suş kullanılmıştır. Bunlar; *Halobacterium salinarum* DSM 3754, *Natrialba asiatica* DSM 12278, *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137, *Haloferax denitrificans* DSM 4425, *Haloarcula vallismortis* DSM 3756 suşlarıdır.

*Halobacterium salinarum* DSM 3754'un polar lipitleri fosfatidil gliserol (PG), fosfatidil gliserofosfatın metil esteri (PGP-Me) ve fosfatidil gliserosülfat (PGS) fosfolipitleri ile sülfatlanmış tetragliserol dieter'in (S-TeGD) C<sub>20</sub>C<sub>20</sub> formuna sahip glikolipitlerinden oluşmaktadır (Oren ve Gurevich, 1993).

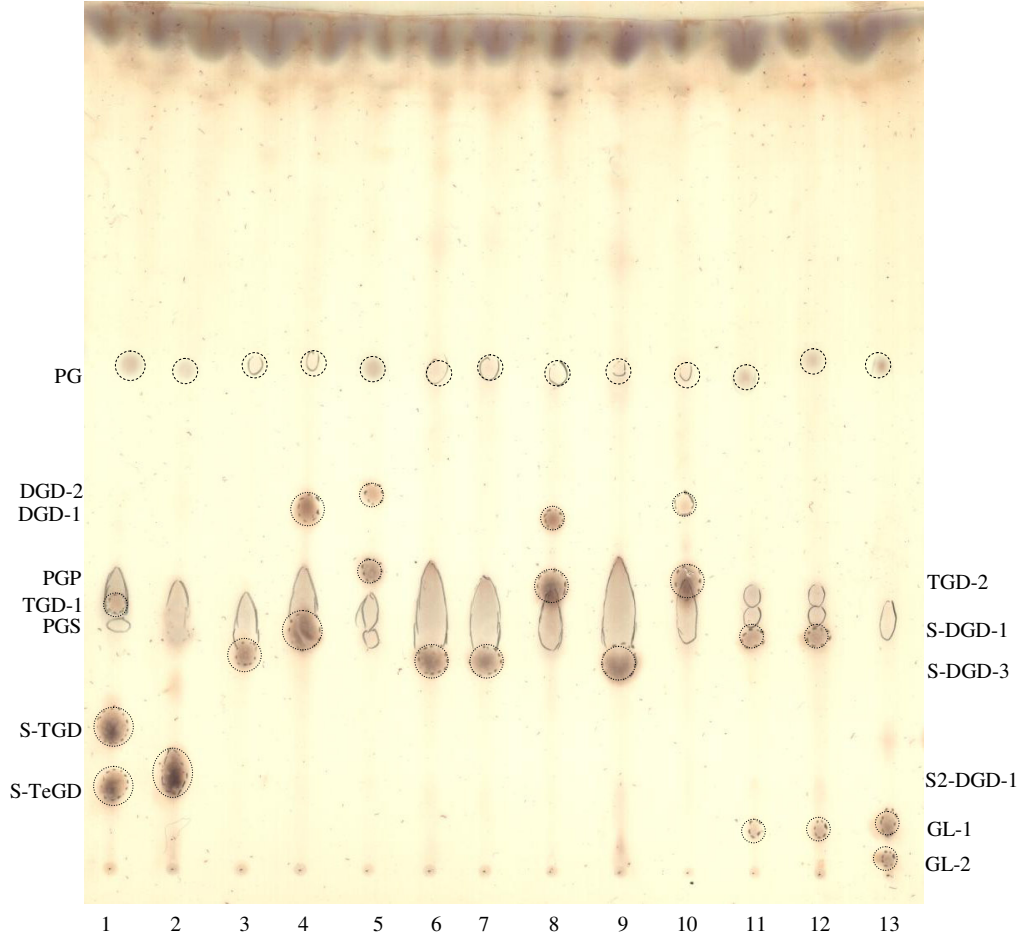
*Haloferax denitrificans* DSM 4425'in polar lipitleri, PGP-Me fosfolipitlerine, diglikosil dieter (DGD-1), ve sülfatlanmış diglikosil dieter'in (S-DGD-1) türevleri olan C<sub>20</sub>C<sub>20</sub> glikolipitlerine sahiptir, ayrıca *Haloferax* cinsi PGS içermemesiyle karakterize edilmektedir (Oren ve Gurevich, 1993).

*Haloarcula vallismortis* DSM 3756 suşunun ana polar lipitleri C<sub>20</sub>C<sub>20</sub> türevi olan PG, PGP-Me, PGS fosfolipitleri ve triglikosil dieter (TGD-2) ile diglikosil dieter (DGD-2) glikolipitleridir (Oren ve Gurevich, 1993).

*Halorubrum saccharovororum* DSM 1137 suşunun PG, PGP-Me, PGS fosfolipitleri ve sülfatlanmış diglikosil dieter (S-DGD-3) glikolipitinin C<sub>20</sub>C<sub>20</sub> türevlerine sahip olduğu belirtilmiştir (Oren, 1994).

*Natrialba asiatica* DSM 12278 suşunun temel fosfolipitlerin yanı sıra S-DGD-1 glikolipitini içerdiği bildirilmiştir (Oren ve Litchfield, 1999).

Polar lipit kromatografi sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.11) tüm izolat ve standart suşların PG ve PGP-Me fosfolipitlerini içerdikleri görülmektedir. Ayrıca *Haloferax denitrificans* DSM 4425 standart suşu ile CH8K ve CH8B izolatları hariç tüm izolat ve standart suşların PGS içerdikleri belirlenmiştir.



**Şekil 4.11** Standart suş ve izolatların polar lipit profillerinin ince tabaka kromatogramı

1: *Halobacterium salinarum*; 2: *Natrialba asiatica*; 3: *Halorubrum saccharovororum*; 4: *Haloferax denitrificans*; 5: *Haloarcula vallismortis*; 6: CH2; 7: CH3; 8: CHA1; 9: CHC; 10: CH7; 11: CH8K; 12: CH8B; 13: CH11. PG: Fosfatidilgliserol; PGP: Fosfatidilgliserol fosfat; PGS: Fosfatidilgliserol sülfat; S-DGD-3: Sülfatlıglikozil dieter (mannoz (1→4)-glokuz gliserol dieter); S-DGD-1: Sülfatlıglikozil dieter (mannoz (1→2)-glokuz gliserol dieter); S2-DGD-1: bis-sülfatlı diglikozil dieter; S-TGD: Sülfatlı triglikozil dieter; S-TeGD: Sülfatlı tetraglikozil dieter; DGD-2: Diglikozil dieter; DGD-1: Diglikozil dieter (mannoz (1→2)-glokuz gliserol dieter); TGD-1: Triglycosyl diether; (galactosylmannosyl-glucosyl diether); TGD-2 : triglikozil dieter GL: Tanımlanmamış glikolipit, Kesikli çizgili daireler Glikolipit yapıları

Çubuk hücre şeklinde olan CH2, CH3 ve CHC izolatlarının benzer polar lipit içeriklerine sahip oldukları bulunmuştur. Bu izolatların temel fosfolipitler dışında S-DGD-3 içerdikleri belirlenmiştir. Bu üç izolatın, temel fosfolipitlerle birlikte S-DGD-3

glikolipidini içeren *Halorubrum saccharovorum* DSM 1137 türü ile benzerlik göstermesiyle *Halorubrum* cinsine ait olabilecekleri tespit edilmiştir.

Pleomorfik hücre morfolojisi gösteren CHA1, CH7 izolatları ve *Haloarcula vallismortis* DSM 3756 suşunun TGD-2 glikolipitini içerdikleri belirlenmiş olup ayrıca CHA1 izolatının, DGD-1, CH7 izolatının ise DGD-2 glikolipitlerini içerdiği saptanmıştır. Bu sonuçla CHA1 ve CH7 izolatlarının *Haloarcula* cinsine ait olabileceği belirlenmiştir.

CH8K ve CH8B izolatlarının benzer lipit profiline sahip oldukları ve S-DGD-1'in yanısıra tanımlanmamış bir adet glikolipit (GL1) içerdikleri saptanmıştır. CH8K ve CH8B izolatlarının, koloni pigmentasyonu dışında koloni morfolojisi, hücre morfolojisi, hareket özellikleri, gram reaksiyonları, biyokimyasal test sonuçları, tüm hücre protein profilleri ve polar lipit içerikleri bakımından aynı özelliklere sahip olduklarından aynı tür oldukları sonucu çıkarılmıştır.

CH11 izolatının, temel fosfolipitlerin yanı sıra 2 adet tanımlanmamış glikolipit (GL1 ve GL2) içerdiği belirlenmiştir.

İzolatların kesin tanımlarının yapılabilmesi için için 16S rRNA analizi, DNA-DNA hibridizasyonu, DNA'nın G+C oranının belirlenmesi gibi moleküler yöntemlerin uygulanması önerilmiştir (Oren ve ark., 1997).

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Moleküler çalışmalar sonucunda canlılar, Carl Woese tarafından 1977 yılında 3 ana gruba ayrılmıştır: Bakteriler, Ökaryotlar ve Arkeler. Arke domaini, metanojenler, hipertermofiller ve aşırı halofilik arkeler olmak üzere üç tip mikroorganizma grubunu içermektedir.

Halofilik arkeler, tuzlular, tuz gölleri, sodalı göller, tuz madenleri ve tuzlu topraklar gibi yüksektuzlu ortamlarda yaşayabilme özelliğine sahip bir mikroorganizma grubudur. Halofilik arkelerle ilgili ilk bilimsel çalışmalar, tuzlanmış fakat renkleri kırmızılaşarak bozulan balık deri gibi ürünlerde mikroorganizmaların rolü ve zararlarının önlenmesi amacıyla başlamıştır. Kırmızı renkli halofilik arkeler mükemmel metabolizmalarıyla da araştırmacıların ilgisini çekmişlerdir. Elektronikten tıp ve gıdaya kadar önemli alanlarda biyoteknolojik potansiyele sahip olmalarından dolayı, bu organizmaların identifikasyonları ile ilgili çalışmalar aralıksız devam etmektedir.

Günümüzde dünyanın çeşitli tuzlu ortamlarından halofilik arkelerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanımlanması ile ilgili çalışmalara hızla devam edilmektedir. Ülkemizde ise bu organizmaların özellikle izolasyon ve karakterizasyonları ile ilgili çalışmalarına son yıllarda ilgi gösterilmeye başlanmıştır.

Çalışma kapsamına halofilik arkelerin izolasyonu amacıyla dahil edilen Çankaya Tuz Madeni, daha önce herhangi bir izolasyon çalışmasının yapılmadığı bir bölgedir. Bu bölgeden alınan tuzlu su örneklerinden toplam 15 adet halofilik arke izole edilmiş ve izolatların SDS PAGE tüm hücre protein profilleri çıkarılmıştır. SDS PAGE analizleri sonucunda 7 izolatın birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların karakterizasyonları amacıyla: çeşitli biyokimyasal özellikleri, hücre ve koloni morfolojileri, Gram boyanma ve hareket özellikleri, üremeleri için ihtiyaç duydukları minimum ve optimum tuz konsantrasyonları, hücresel bütünlüğü sağlayabilmeleri için gerekli tuz konsantrasyonları, farklı kimyasallar varlığında anaerobik üreme yetenekleri ve membran polar lipid içerikleri belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda, sadece koloni pigmentasyonu yönünden farklılık gösteren ancak protein profilleri, lipid kompozisyonları ve diğer özellikleri yönünden birbirine benzediği belirlenen iki izolat (CH8K ve CH8B) aynı tür olarak kabul edilmiştir. Ayrıca polar lipid içeriklerine göre, 3 izolatın (CH2, CH3 ve CHC) *Halorubrum* cinsine, 2 izolatın (CH7 ve CHA1) ise *Haloarcula* cinsine ait olabileceği sonucuna varılmıştır.



Günümüzde halofilik arke izolatlarının identifikasyonu ve taksonomik pozisyonlarının belirlenmesi, fenotipik, polar lipitlerin dahil edildiği kimyasal ve dizi analizlerinin dahil edildiği moleküler verileri kapsayan polifazik bir yaklaşıma göre yapılmaktadır. Polar lipit ve fenotipik özellikler tek başına identifikasyonda kesin bir sonuca ulaşılmasında etkili olamamakta ve özellikle dizilere dayalı moleküler verilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma kapsamında elde edilen halofilik arke izolatlarının polar lipitleri, belirli fenotipik özellikleri ve moleküler düzeyde tüm hücre protein profilleri belirlenmiştir. Ancak dizi bilgisini kapsamayan bu moleküler analiz, izolatların başlı başına identifikasyonu için yeterli değildir. Çünkü, halofilik arkeler yüksek tuz konsantrasyonuna sahip olduklarından dolayı, proteinleri poliakrilamid jel elektroforezinde zayıf bir ayrılma göstermekte ve protein bantlarının gözlemlenmesi zorlaşmaktadır. Bu nedenle protein profilleri halofilik arkelerin sistematüğinde kullanılan etkin bir kriter olamamaktadır.

Sonuç olarak Çankaya Tuz Madeni'den izole edilen halofilik arkeler kimyasal ve fenotipik yönden incelenmiş ancak cins ya da tür düzeyinde tanımlanmaları yapılamamıştır. Ülkemizdeki halofilik arkeal çeşitliliğın ortaya çıkarılması ve Türkiye taksonomik tür veritabanına katkıda bulunulması amacıyla bir sonraki aşamada izolatların G+C oranlarının belirlenmesi, rRNA dizi analizlerinin ve DNA/DNA hibridizasyonlarının yapılması önerilmektedir.

**KAYNAKLAR**

- Allen, A. M., Goh, F., Leuko, S., Echigo, A., Mizuki, T., Usami, R., Kamekura, M., Neilan, B. A. and Burns, P., 2008. *Haloferax elongans* sp. Nov. And *Haloferax mucosum* sp. Nov., isolated from microbial mats from Hamelin Pool, Shark Bay, Australia. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 58; 798-802.
- Anonymous <http://www.bacterio.cict.fr/classifgenerafamilies.html#halobacteriaceae> 06.07.2008.
- Antunes, A., Taborda, M., Huber, R., Moissl, C., Nobre, M. F., and da Costa, M. S., 2008. *Halorhabdus tiamatea* sp. Nov., a non-pigmented, extremely halophilic archaeon from a deep-sea, hypersaline anoxic basin of the Red Sea, and emended description of the genus *Halorhabdus*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 58: 215-220.
- Arahal, D. R., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Volcani, B. E. and Ventosa, A. 1996. Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from dead sea water, determined on the basis of their 16 S rRNA sequences. **Appl. And Environ. Mic.**, 62(10): 3779-3786).
- Bardavid R. E., Mana L., and Oren, A., 2007. *Haloplanus natans* gen. Nov., sp. Nov., an extremely halophilic, gas-vacuolate archaeon isolated from Dead-Sea-Red Sea water mixtures in experimental outdoor ponds. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 57: 780-783.
- Beard, S. J., Hayes P. K. and Walsby, A. E., 1997. Growth competition between *Halobacterium salinarium* strain PHH1 and mutants affected in gas vesicle synthesis. **Microbiology UK**, 143: 467-473.
- Birbir, M., Ogan, A., Cali, B. And Mertoglu, B. 2004. Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. **World J. Of Microbiol and Biotechnol.**, 20:613-621.
- Birge, R. R., 1995. Protein-based computers. **Sci. Am.**, March:66-71.
- Bonelo, G., Ventosa, A.i Megias, M. and Ruiz-Berraquero, F. 1984. The sensitivity of halobacteria to antibiotics. **FEMS Microbiol. Letters**, 21:341-345.
- Böck, A. and Kandler, O., 1985. Antibiotic sensitivity of archaeobacteria. (C.R. Woese and R.S. Wolfe, Editör). In: **the bacteria, treatise, on structure and function. Archaeobacteria**. Academic Press, FL Vol.III, 525-541, Orlando.
- Burns, D. G., Janssen, P. H., Itoh, T., Kamekura, M., Li, Z., Jensen, G., Rodriguez-Valera, F., Bolhuis, H. and Dyll-Smith, M. L., 2007. *Haloquadratum walsbyi* gen. Nov., sp. Nov., the square haloarchaeon of walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 57: 387-392
- Castillo, A.M., Gutierrez, M.C., Kamekura, M., Ma, Y., Cowan, D.A., Jones, B. E., Grant, W.D., and Ventosa, A., 2006a. *Halovivax asiaticus* gen. Nov., sp. Nov., a novel extremely halophilic archaeon isolated from inner Mongolia, China. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 56: 765-770.

- Castillo, A. M., Gutierrez, M. C., Kamekura, M., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B.E., Grant, W.D., and Ventosa, A., 2006b. *Halostacnicola larsenii* gen. Nov., sp. Nov., an extremely halophilic archaeon from a saline lake in inner Mongolia, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56: 1519-1524.
- Castillo, A. M., Gutierrez, M. C., Kamekura, M., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. E., Grant, W. D., Ventosa, A., 2007. *Halorubrum ejinorensis* sp. Nov., isolated from lake Ejnor, inner Mongolia, China. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 57: 2538-2542.
- Chaga, G, Porath, J. and Illéni, T. 1993. Isolation and purification of amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*. **Biomedical chromatography**, 7: 256-261.
- Cui, H.L., Tohty, D., Feng, J., Zhou, P.J., and Liu S.J., 2006. *Natronorubrum aibiense* sp. Nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Aibi salt lake in Xin-Jiang, China, and emended description of the genus *Natronorubrum*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 56: 1515-1517.
- Danson, M. and Hough, D. W. 1997. The structural basis of protein halophilicity. **Comp. Biochem. Physiol.**, 117A (3): 307-312.
- DasSarma, S. 1993. Identification and analysis of the gas vesicle gene cluster on an unstable plasmid of *Halobacterium halobium*. **Experientia**, 49: 482-486.
- Dussault, H. P. 1955. An improved technique for staining red halophilic bacteria. **J. Of Bacteriol.**, 70, 484-485.
- Elevi, R., P. Assa, M. Birbir, A. Ogan, and A. Oren. 2004. Characterization of extremely halophilic archaea isolated from the Ayvalik Saltern, Turkey. **World J. Microbiol. and Biotechnol.** 20: 719-725.
- Elshahed, M.S., Savage, K.N., Oren, A., Gutierrez, M.C., Ventosa, A., and Krumholz, L.R., 2004. *Haloferax sulfurifontis* sp. Nov., a halophilic archaeon isolated from a sulfide- and sulfur-rich spring. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 54: 2275-2279.
- Franzmann, P.D., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, J. K., Cameron, D. E., Stevenson, P. L., McMeekin, T.A. and Burton, H. R. 1988. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. **System. Appl. Microbiol.**, 11; 20-27.
- Goh, F., Leuko, S., Allen, M. A., Bowman, J. P., Kamekura, M., Neilan, B.A., and Burns, B. P., 2006. *Halococcus hamelinensis* sp. Nov., a novel halophilic archaeon isolated from stromatolites in Shark Bay, Australia. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 56: 1323-1329.
- Gonzales, C., Gutierrez, C. and Ramirez, C. 1978. *Halobacterium vallismortis* sp. nov., an amylolytic and carbohydrate-metabolizing extremely halophilic bacterium. **Can. J. Microbiol.**, 24; 710-715.
- Grant, W. D., Kamekura, M., McGenitty, T. J. and Ventosa, A., 2001. Order I. Halobacteriales In: *Bergey's manual of systematic bacteriology V.I, the Archaea and deeply branching and phototrophic bacteria*, Garrity, G. M. (man.Ed.) 2nd Ed. New York, Springer, ISBN: 0387987711.
- Gutierrez, C. and Gonzalez, C. 1972. Method for simultaneous detection of proteinase and esterase activities in extremely halophilic bacteria. **Appl. Microbiol.**, 24; 516-517.

- Gutierrez, M. C., Garcia, M. T., Ventosa, A., Nieto, J. J. and Ruiz-Berraquero, F. 1986. Occurrence of megaplastids in halobacteria. **J. of Applied Bacteriology**, 61: 67-71.
- Gutierrez, M. C., Castillo, A. M., Kamekura, M., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. E., Grant, W. D., and Ventosa, A., 2007. *Halopiger xanaduensis* gen. Nov., sp. Nov., an extremely halophilic archaeon isolated from saline lake Shangmatala in inner Mongolia, China. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 57: 1402-1407.
- Hartmann, R., Sickinger, H., D. and Oesterhelt, D. 1980. Anaerobic growth of halobacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77 (6): 3821-3825.
- Hesselberg, M., and Vreeland, R. H., 1995. Utilization of protein profiles for the characterization of halophilic bacteria. **Current Microbiology**, 31: 158-162.
- Hezayen, F. F., Tindall, B. J., Steinbüchel and Rehm, B. H. A. 2002. Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestri* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobioforma nitratireducens* comb. nov. **Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol.**, 52: 2271-2280.
- Hough, D. W. and Danson, M. J. 1989. Archaeobacteria: ancient organisms with commercial potential. **Letters in Applied Microbiology**, 9; 33-39.
- Hough, D. W. And Danson, D. J. 1999. Extremozymes. **Curr. Opin. In Chem. Biology**, 3: 39-46.
- Itoh, T., Yamaguchi, T., Zhou, P. and Takashina, T., 2005. *Natronolimnobius baerhuensis* gen. Nov., sp. Nov., and *Natronolimnobius innermongolicus* sp. Nov., novel haloalkaliphilic archaea isolated from soda lakes in Inner Mongolia, China. **Extremophiles**, 9: 111-116.
- Jackman, P. J. H., 1987. Microbial systematics based on electrophoretic whole-cell protein patterns. **Methods in microbiology**, 19: 209-225.
- Jocklik, W. K., Wilett, H. P., Amos, D. B. and Wilfert C. M., 1992. Zinsser Microbiology. Appleton and Large Publisher, ISBN: 0838599834
- Kamekura, M. and Dyal-Smith, M. L. 1995. Taxonomy of the family halobacteriaceae and description of two new genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. 1995. **J. gen. Appl. Microbiol.**, 41: 333-350.
- Kamekura, M. Dyal-Smith, M. L., Upasani, V., Ventosa, A. and Kates, M. 1997. Diversity of alkaliphilic halobacteria: Proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba* and *Natronomonas* gen. nov., respectively as *Halorubrum vacuolatum* comb. Nov., *Natrialba magadii* comb. Nov., and *Natronomonas pharaonis* comb. Nov., Respectively. **I. J. Syst. Bact.**, 47(3): 853-857.
- Kamekura, M. and Kates, M. 1999. Structural diversity of membrane lipids in members of *Halobacteriaceae*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 63 (6): 969-972.
- Kates, M., 1992. archabacterial lipids: structure, biosynthesis and function in: the archaeobacteria: biochemistry and biotechnology, Danson, M. J., Hough, D. W. and Lunt, G. G. (editör), The biochemical society, Portland pres, London, ISBN:1-85578-010-0.
- Kates, M. 1993. Membrane lipids of extreme halophiles: biosynthesis, function and evolutionary significans. (R. H. Vreeland, Editör). In: **Halophilic Bacteria, Part II. Experientia**. Birkhäuser Verlag, 49; 1027-1036. Basel

- Kulichevskaya, I. S., Zvyagintseva, I. S., Tarasov, A. L. And Plakunov, V. K., 1992. The extremely halophilic archaeobacteria from some hypersaline ecotops. **Microbiology**, 46: 51-56.
- Kunte, H. J., Trüper, G. and Stan-Lotter, H. 2001. Halophilic microorganisms. Astrobiology. (G. Horneck, C. Baumstark-Khan, Editör) In: **The quest for the conditions of life**. Heidelberg: Springer-verlag, ISBN: 3-540-42101-7.
- Kushner, D. J., 1985. The halobacteriaceae. (C.R. Woese and R.S. Wolfe, Editör). In: **the bacteria-a treatise on structure and function Archaeobacteria**. Academic Press, FL Vol.III, 171-214, Orlando.
- Laemli, U. K., 1970. **Nature**, 227: 680-685.
- Litchfield, D. C., and Oren, A., 2001. Polar lipids and pigments as biomarkers for the study of the microbial community structure of solar salterns. **Hydrobiologia**, 466(1-3): 81-89.
- Madigan, M. T., Martinko, M. J. and Parker, J., 2000. Biology of Microorganisms. Prentice Hall International, ISBN: 0-13-085264-3, USA.
- Mancinelli, R. L., and Hochstein L. I., 1986. The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. **FEMS Microbiol. Letters**, 35: 55-58.
- Margesin, H. and Schinner, F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. **Extremophiles**, 5: 73-83.
- Matheson, A. T., 1985. Ribosomes of Archaeobacteria. (C.R. Woese and R.S. Wolfe, Edt.). In: The Bacteria treatise on structure and function archaeobacteria. Academic Pres Orlando, FL Vol. III, Orlando.
- McGenity, T. J., Gemmell, R. and Grant, W. D. 1998. Proposal of a new halobacterial genus *Natrinema* gen. nov. with two species *Natrinema* gen. nov., with two species *Natrinema Pellirubrum* nom. Nov. and *Natrinema pallidium*. Nom. Nov. **Int. J. Syst. Bact.**, 48: 1187-1196.
- Montalvo-Rodriguez, R., Vreeland, R. H., Oren, A., Kessel, M., Betancourt, C. And Lopez-Gariga, J. 1998. *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. **Int. J. of Syst. Bacteriol.**, 48; 1305-1312.
- Montalvo-Rodriguez, R., Lopez-Garriga, J., Vreeland, H., Oren, A., Ventosa, A. And Kamekura, M. 2000. *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. **Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol.**, 50; 1065-1071.
- Norton, C. F., McGenity, T. J. and Grant, W. D. 1993. Archaeal halophiles (halobacteria) from two British salt mines. **J. of General Microbiol.**, 139; 1077-1081.
- Oesterhelt, D., Brauchle, C., and Hampp, A., 1991. Bacteriorhodopsin: A biological material for information processing. **Quart. Rev. Biophys.**, 24: 425-478.
- Oesterhelt, D. 1998. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Current opinion in structural biology*, 8; 489-500.
- Oren, A., and Trüper, H. G., 1990. Anaerobic growth of halophilic archaeobacteria by reduction of dimethylsulfoxide and trimethylamine *N*-oxide. **FEMS Microbiol. Letters**, 70: 33-36.
- Oren, A., and Gurevich, P., 1993. Characterization of the dominant halophilic archaea in a bacterial bloom in the Dead Sea. **FEMS microbiology Ecology**, 12: 249-256.

- Oren, A. 1994. The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS mic. Reviews*, 13, 415-440.
- Oren, A., Gurevich, P., Gemmel, R. T. and Teske, A. 1995. *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from dead sea. **I. J. Syst. Bact.**, 45(4): 747-754.
- Oren, A., Duker, S., and Ritter, S., 1996. The polar lipid composition of Walsby's square bacterium. **FEMS Microbiol. Letters**, 138: 135-140.
- Oren, A., Ventosa, A. and Grant, W.D. 1997. Proposed minimal standarts for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. **Int. J. of Syst. Bacteriol.**, 47 (1); 233-238.
- Oren, A., Ventosa, A., Gutierrez, M. C., and Kamekura, M., 1999. *Haloarcula quadrata* sp. nov., A square, motile arcaeon isolated from a brine pool in Sinai (Egypt). **Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol.**, 49: 1149-1155.
- Oren, A., and Litchfield, D. C., 1999. A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*. **FEMS Microbiology Letters**, 173: 353-358.
- Oren, A. 2000. Biological processes in the Dead sea as influenced by short-term and long-term salinity changes. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.*, 55; 531-542.
- Oren, A., 2001. The order halobacteriales. (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. And Stackebrandt, E., Editör). In: **The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identifications, applications 3rd. Edition.** Springer-Verlag, New york (electronic publication)
- Oren, A. and Rodriguez-Valera, F. 2001. The contribution of halophilic bacteria to the coloration of saltern crystallizer ponds. **FEMS Microbiology Ecology**, 36: 123-130.
- Oren, A., Elevi, R., Watanabe, S., Ihara, K. and Corcelli, A., 2002. *Halomicrobium mukohatei* gen. Nov., comb. Nov., and emended description of *Halomicrobium mukohatei*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 52: 1831-1835.
- Ozcan, B., Cokmus, C., Coleri, A., Caliskan, M., 2006. Characterization of extremely halophilic archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey. *Microbiology*, 75(6): 739-748.
- Ozcan, B., Ozcengiz, G., Coleri, A., Cokmus, C., 2007. Diversity of halohilic archaea from six hypersaline environments in Turkey. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(6): 985-992.
- Pecher, T. and Böck, A. 1981. In vivo susceptibility of halophilic and mathanogenic organisms to protein synthesis inhibitors. *FEMS Microbiol. Letters*, 10; 295-297.
- Pfeifer, F., Blaseio, U. And ghahraman, P. 1988. Dynamic plasmid populations in *Halobacterium halobium*. **J. of Bacteriology**, 170 (8): 3718-3724.
- Queseda, E., Ventosa, A., Rodriguez-Valera, F. and Ramos-Cormenzana, 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. **J.Appl. Bacteriol.**, 53: 155-161.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. and Ramos-Cormenzana, A. 1979. Isolation of extreme halophiles from seawater. **Appl. And Environ. Microbiol.**, 38 (1):164-165.

- Rodriguez-Valera, F., Juez, G. and Kushner, D.J. 1983. *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. **System. Appl. Microbiol.**, 4; 369-381.
- Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. and Imhoff, J. F. 1985. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. **Microb. Ecol.**, 11: 107-115.
- Rodriguez-Valera, F., 1988. Characteristics and microbial ecology of hipersaline environments. (F. Rodriguez-Valera Editor.). In: **Halophilic Bacteria**, V.I, CRC. Pres, Boca Raton, Florida, 3-30.
- Rodriguez-Valera, F., Lillo, J. A. G., Anton, J. and Meseguer, I., 1991. Biopolymer production by *Haloferax mediterranei*. (Rodriguez-Valera, Editor.). In: **General and applied aspects of halophilic microorganisms Plenum**. Pres New York, 373-380, New York.
- Savage, K. N., Krumholz, L. R., Oren, A., Elshahed, M. S., 2007. *Haladaptatus paucihalophilus* gen. Nov., sp. Nov., a halophilic archaeon isolated from a low salt, sulfide-rich spring. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 57: 19-24.
- Savage, K. N., Krumholz L. R., Oren, A., and Elshaded, M. S., 2008. *Halosarcina pallida* gen. Nov., a halophilic archaeon from a low-salt, sulfide-rich spring. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 58: 856-860.
- Sellek, G. A. and Chaudhuri, J. B. 1999. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. **Enzyme and Microbial Biotech.**, 25: 471-482.
- Shand, R. F., Perez, A. M., 1999. Haloarchaeal growth physiology. (J. Seckbah, Editor.). In: **Enigmatic microorganisms and life in extreme environment**. Kluwer Academic Publisher Dordrecht, 414-424.
- Sioud, M., Baldacci, G., de Rocondo, A. M. and Forterre, P. 1988. Novobiocin induces positive supercoiling of small plasmids from halophilic archaeobacteria *in vivo*. **Nucleic Acids Resourch**, 16 (4):1379-1391.
- Stan-Lotter, H., Pfaffenhuemer, M., Legat, A., Busse, H. J., Radax, C. and Gruber, C. 2002. *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an archaeal isolate from a permian alpine salt deposit. **Int. J. syst. And Evolut. Mic.**, 52; 1807-1814.
- Takashina, T., Hamamoto, T., Otozai, K., Grant, W. D. and Horikoshi, K. 1990. *Haloarcula japonica* sp. Nov., a new triangular halophilic archaeobacterium. **System. Appl. Microbiol.** 13; 177-181.
- Tomlinson, G. A. and Hochstein, L. 1976. *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing extremely halophilic bacterium. **Can. J. Microbiol.**, 22; 587-591.
- Torreblanca, M., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A, Kamekura, M. and Kates, M. 1986. Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov.. **System. Appl. Microbiol.**, 8: 89-99.
- Vaino, M., Tindall, B. J. and Ingvorsen, K., 2000. *Halorhabdus utahensis* gen. Nov., sp. Nov., an aerobic, extremely halophilic member of the archaea, from Great Salt Lake, Utah. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 50: 183-190.

- Ventosa, A. Gutierrez, M. C., Kamekura, M. and Dyal-Smith, M. 1999. Proposal to transfer *Halococcus turkmenicus*, *Halobacterium trapanicum* JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica* gen. nov, comb. nov. **Int. J. of Syst. Bacteriol.**, 49: 131-136.
- Vreeland, R. H., Straight, S., Krammes, J., Dougherty, K., Rosenzweig, W. D., Kamekura, M., 2002. *Halosimplex carlsbadense* gen. Nov., sp. Nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate. **Extremophiles**, 6 :445-452.
- Woese, C.R., Kandler, O. And Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 87: 4576-4579.
- Wu, I., Chow, K. and Mark, K., 1983. The rol of pigments in *Halobacterium cutirubrum* against uv irradiation . **Microbiol. letter**, 24: 85-90.
- Xin, H., Itoh, T., Zhou, P., Suzuki, K., Kamekura, M. and Nakase, T. 2000. *Natrinema versiforme* sp. nov., an halophilic archaeon from Aibi salt lake. **Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol.**, 50; 1297-1303.
- Xue, Y., Fan, H., Ventosa, A., Grant, W.D., Jones, B.E., Cowan, D.A., and Ma, Y., 2005. *Halalkalicoccus tibetensis* gen. Nov., sp. Nov., representing a novel genud of haloalkaliphilic archaea. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 55: 2501-2505.
- Yang, Y., Cui, H., Zhou, P. and Liu S., 2006. *Halobacterium jilantaiense* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a saline lake in iner Mongolia, China. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 56: 2353-2355.
- Yatsunami, R., Kawakami, T. and Ohtani, H. 2000. A novel bacteriorhodopsin like protein from *Haloarcula japonica* strain TR-1: gene cloning, sequencing, and transcript analysis. **Extremophiles**, 4: 109-114.
- Zvyagintseva, I. S. and Tarasov, A. L., 1988. Extreme halophilic bacteria from saline soils. **Microbiology**, 56: 664-668.



## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında İskenderunda doğdum. İlk ve orta eğitimimi İskenderunda tamamladım. 1996 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Antakya MYO Bilgisayar Programcılığı bölümünü kazandım ve 1998 yılında bölüm ikincisi olarak mezun oldum. İki yıl bilgisayar sektöründe çalıştıktan sonra 2001 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandım. 2005 yılında fakülte birincisi olarak mezun oldum ve aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında moleküler biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimime başladım. Halen yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

## TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam süresince değerli fikirlerini, bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü laboratuvar çalışma ortamını sunan danıőman hocalarım Prof. Dr. Mahmut ÇALIŐKAN ve Yrd. Doç. Dr. Birgöl ÖZCAN'a, tuzlu suların kimyasal analizleri aşamasında laboratuvar imkanlarını sağlayan ve deneylerde yol gösteren MKÜ FAM Müdürü Yrd. Doç. Dr. M. Kemal SANGÜN'e ayrıca başta őayeste GÜLYANAR olmak üzere laboratuvar arkadaşlarıma yardımları için çok teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalıőmalarım boyunca da maddi manevi destek sağlayan aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.