

TC
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KOZLUK (BATMAN) İLÇESİ TUZLAGÖZÜ TUZLASINDAN HALOFİLİK
BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Reyhan KAYALIK
DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN

VAN-2012

TC
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KOZLUK (BATMAN) İLÇESİ TUZLAGÖZÜ TUZLASINDAN HALOFİLİK
BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Reyhan KAYALIK

Bu çalışma, Y.Y.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'nın 2010-FBE-YL-022 nolu projesiyle desteklenmiştir.

VAN-2012

KABUL VE ONAY SAYFASI

Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN'ün danışmanlığında, Reyhan KAYALIK tarafından sunulan "Kozluk (Batman) İlçesi Tuzlagözü Tuzlasından Halofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 20/01/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. İbrahim Hakkı YÖRÜK

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Kerem ÖZDEMİR

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim kurulunun 18/05/2012 gün ve 2012/138 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Turgut AYGÜN

Enstitü Müdürü

ÖZET

KOZLUK(BATMAN) İLÇESİ TUZLAGÖZÜ TUZLASINDAN HALOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

KAYALIK, Reyhan
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN
Eylül-2011, 60 sayfa

Bu araştırmada; 15 Mayıs 2009 tarihinde Batman İli Tuzlagözü Köyü sınırları içerisinde bulunan Tuzlagözü Tuzlasından toplanan kristalize tuz, tuzlu toprak ve tuzlu su örneklerinden halofilik bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlandı.

Seyreltme plaka yöntemi ile yapılan sayımlarda su örneklerindeki halofilik bakteri sayısı 5×10^2 kob/ml ve toprak örneklerindeki halofilik bakteri sayısı 2×10^3 kob/gr olarak belirlendi.

İzole edilen suşların tuz içermeyen ortamlarda üremediği ve %2.5, %5, %10, %15 %20 ve %25 oranında NaCl içeren ortamlarda ürediği tespit edildi. Koloni morfolojisine göre seçilen beş izolatın dördünün gram negatif, birinin ise gram pozitif özellikte boyandığı belirlendi. Suşların; fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenerek RAPD-PCR tekniği ile ayırımı yapıldı. Suşların benzerlikleri dendogram halinde sunuldu.

Anahtar Kelimeler: Halofilik bakteri, Tuzlagözü Tuzlası, Karakterizasyon, RAPD-PCR

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF HALOPHILIC BACTERIA FROM TUZLAGOZU SALTERN OF KOZLUK (BATMAN)

KAYALIK, Reyhan
MSc, Biological Science
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Erdal ÖĞÜN
September-2011, 60 pages

This investigation was carried out 15 May 2009 Tuzlagözü saltern located within the village of Batman province Tuzlagözü collected crystallized salt, saline soil and saline water samples was to isolation and characterization of halophilic bacteria.

Halophilic bacteria in water samples of the dilution plate method and censust here are 5×10^{-2} cfu/ml and the number of cacteria in soil samples halophilic 2×10^{-3} cfu/g respectively.

Not growing strains isolated from salt-free media, 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20%, and 25% were found to breed in media containing NaCl. Four of the five isolates selected according to colony morfology, gram negative, gram pozitive is one the properties were painted. Strains, physiological and biochemical characteristics were determined and the seperation of RAPD-PCR tecnique. Dendgogram of the strain presented as the similarities.

Key Words: Halophilic Bacteria, Tuzlagözü Saltern, Characterisation, RAPD-PCR

ÖN SÖZ

Mikroorganizmalar doğada geniş bir yayılış alanına sahiptir. Prokaryotlar aşırı sıcak ve soğuk sıcaklık limitlerinde, 1.000 atmosfer hidrostatik basıncın üzerinde ve doygunluk dercesine yakın total tuz konsantrasyonlarında canlılığını sürdürmektedir. Ekstremofilik prokaryotlar olarak adlandırılan fizyolojik grupların üyeleri, ekolojik faktörler yönünden uç şartlarda canlılığını devam ettirmektedir. Uç şartlarda yaşayan prokaryotlar son yıllarda bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. Alkalofilik, asidofilik, termofilik, psikrofilik, barofilik ve halofilik bakteri gruplarının tümü uç şartlarda yaşamaktadır. Halofilik bakteriler yüksek oranda tuz içeren ortamlarda yaşayan tuzu seven bakterilerdir. Halofilik prokaryotlar türleri, hem bakteriler içerisinde, hem de arkebakteriler içerisinde yer alır. Halotolerant ve halofilik prokaryotlar biyoteknolojik öneme sahiptirler.

Bu tez çalışmasını, konu olarak bana öneren ve çalışmalarım sırasında benden bilgi ve olanaklarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN'e, bilimsel deneyimi ile bana destek olan Prof. Dr. Ekrem ATALAN'a moleküler yöntemlerde yardımını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Kerem ÖZDEMİR, Metin ERTAŞ'a ve araştırma alanının haritasının çizen Öğr.Gör. Mucip DEMİR'e teşekkür ederim.

Ayrıca, **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına** "2010-FBE-YL-022" nolu proje ile bu çalışmaya verdiği desteğinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Reyhan KAYALIK

İÇİNDEKİLER

	sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
EKLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER ve/veya KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM	13
3.1. Materyal	13
3.1.1. Kristalize tuz, tuzlu toprak ve tuzlu su örnekleri	13
3.1.2. Halofilik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyerleri	13
3.1.2.1 Halofil broth	13
3.1.2.2 Halofil agar	14
3.1.2.3. Çeşitli yoğunluktaki NaCl içeren besiyerleri	14
3.1.2.4. Halofil jelatin ortamı	14
3.1.2.5. Halofil nişasta agar	14
3.1.2.6. SIM agar	14
3.1.2.7. Simmons Sitrat Agar	15
3.1.2.8. Üre agar	15
3.1.2.9. Nitrat broth	15
3.1.2.10. Karbonhidrat Fermentasyon ortamı	15
3.1.3. Kullanılan Boyalar ve Çözeltiler	15
3.1.3.1. Alfa-Naftol çözeltisi	15
3.1.3.2. Sülfanilik asit çözeltisi	16
3.1.3.3. Lügol çözeltisi	16
3.1.3.4. Kristal Viyole boyası	16
3.1.3.5. Safranin boyası	16
3.1.3.6. % 5'lik Malaşit Yeşili Boyası	16
3.1.3.7. Oksidaz ayırıcı	17
3.1.3.8. % 10'luk Demir Klorür Çözeltisi	17
3.1.3.9. %3'lük Hidrojen Peroksit çözeltisi	17
3.1.3.10. Karbon Kaynakları	17
3.1.3.11. Antibiyotik diskler	17
3.2. Yöntem	17
3.2.1 Tuzlu su, tuzlu toprak ve tuz örneklerinin toplanması	17
3.2.2. Tuzlu su örneklerinin analizinin yapılması	18
3.2.3. Tuz örneklerinin pH'larının ölçümü	18
3.2.4. Uçucu madde nem tayini	19
3.2.5. Tuzlu su ve tuz örneklerinde bulunan halofilik bakterilerin toplam sayısının belirlenmesi	20
3.2.6. Tuzlu su ve tuz örneklerinden aşırı halofilik bakterilerin izolasyonu	20
3.2.7. Halofilik bakterilerin saf kültürlerinin elde edilmesi	20

3.2.8. Nümerik Taksonomi İçin Kullanılan Testler	21
3.2.9. Farklı tuz konsantrasyonlarında suşların gelişmelerinin incelenmesi	21
3.2.10. Halofilik bakteri suşlarının koloni ve hücre morfolojilerinin incelenmesi	21
3.2.11. Bakteri suşlarının modifiye gram boyama ile boyanması	21
3.2.12. Bakteri suşlarının endospor boyama yöntemi ile boyanması	21
3.2.13. Biyokimyasal testler	22
3.2.13.1. Katalaz testi	22
3.2.13.2. Oksidaz testi	22
3.2.13.3. Sitrat testi	23
3.2.13.4. Hidrojen sülfür oluşumu testi	23
3.2.13.5. Hareket testi	23
3.2.13.6. Üreaz testi	23
3.2.13.7. Jelatinaz testi	24
3.2.13.8. Nişasta hidrolizi testi	24
3.2.13.9. Kazein hidrolizi testi	24
3.2.13.10. Tween 80 hidrolizi testi	24
3.2.13.11. Esculin Hidrolizi	25
3.2.13.12. Fenilalanin Deaminasyon Testi	25
3.2.13.13. Nitrat İndirgenmesi Testi	25
3.2.13.14. Karbon Kaynaklarının Kullanımı Testi	26
3.2.13.15. Antibiyotiklere Duyarlılık Testi	26
3.2.14. Nümerik Taksonomik Analiz	26
3.2.15. Genomik DNA İzolasyonu.	27
3.2.16. Test Organizmalarının RAPD-PCR ile Karakterizasyonu	28
4. BULGULAR	29
4.1. Su, toprak ve kristalize tuz örneklerinin fizikokimyasal özellikleri	29
4.2. Su ve toprak örneklerindeki bakteri sayısı	29
4.3. Halofilik İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	30
4.4. Antibiyotiklere duyarlılık test sonuçları	35
4.5. Nümerik analiz sonuçları	36
4.6. RAPD-PCR analizi	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	44
KAYNAKLAR	48
EKLER	56
ÖZ GEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Araştırma alanının haritası	7
Şekil 1.2. Tuzgözü tuzlasında tuzlu sularla kaplı bir alan	7
Şekil 3.1. Tuzlagözü tuzlu toprak örneği	13
Şekil 3.2. Tuzlagözü tuzlu su örneği	13
Şekil 3.3. 200 mesh'lik elekten geçirilmiş toprak örneği	18
Şekil 3.4. Toprak pH'sının ölçümü	19
Şekil 3.5. Nem oranı ölçülecek toprak örneği	19
Şekil 4.1. Halofilik agarda 0.1 ml su örneğindeki ılımlı halofil bakteriler	29
Şekil 4.2. Halofilik agarda 0.1 ml toprak çözeltilisindeki ılımlı halofil bakteriler	29
Şekil 4.3. Anaerobik jar	31
Şekil 4.4. Anaerobik ortamda üreme testi	31
Şekil 4.5. Hareket testi	32
Şekil 4.6. Nitrat redüksiyonu testi	32
Şekil 4.7.a. Farklı tuz yoğunluklarında üreme	32
Şekil 4.7.b. Farklı tuz yoğunluklarında üreme	32
Şekil 4.8.a. Farklı pH değerlerinde üreme	33
Şekil 4.8.b. Farklı pH değerlerinde üreme	33
Şekil 4.9. Oksidaz testi	33
Şekil 4.10. Katalaz testi	33
Şekil 4.11. Karbonhidrat kullanım testi	34
Şekil 4.12. Jelatin hidroliz testi	34
Şekil 4.13. Üre hidroliz testi	34
Şekil 4.14. Sitrat testi	34
Şekil 4.15. Nişasta hidrolizi testi	35
Şekil 4.16. Tween 80 hidroliz testi	35
Şekil 4.17. Kazein hidroliz testi	35
Şekil 4.18. Esculin hidroliz testi	35
Şekil 4.19. Antibiyotik duyarlılık testi	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

	Sayf
Şekil 4.20. Beş test izolatu için 42 farklı karakter bakımından uygulanan test sonuçlarının MVSP.32 (multi-variate statistical package) programı simple matching coefficient ile oluşturulan dendogram	37
Şekil 4.21. Test izolatlarından ekstrakte edilen genomik DNA izolasyonu görüntüsü	38
Şekil 4.22. Test izolatlarının simple matching coefficient ile oluşturulan RAPD-PCR sonuçlarını oluşturduğu jel görüntüsü	39
Şekil 4.23. Test izolatlarının simple matching coefficient ile oluşturulan RAPD-PCR sonuçlarını oluşturduğu dendogram	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 4.1. Tuzlu toprak ve tuzlu su örneklerinin fiziko-kimyasal özellikleri	29
Çizelge 4.2. İzole edilen şuşların morfolojik fizyolojik biyokimyasal ve antibiyotiklere duyarlılık özellikleri	30

EKLER DİZİNİ

	sayfa
Ek 1. Halofilik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyerleri ve çözeltiler	56
Ek 2. Kullanılan Çözelti ve Boyalar	57
Ek 3. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
cm	Santimetre
gr	Gram
M	Molar
ml	Mililitre
mm	Milimetre
pH	Hidrojen iyonunun logaritma cinsinden değeri

Kısaltmalar

Atm	Atmosfer
ATP	Adenozin Tri Fosfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
HA	Halofil agar
HCl	Hidroklorik Asit
kob	Koloni oluşturan birim.
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA)
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SIM	Sülfür indol hareket
STE	Sodyum Tris EDTA

1. GİRİŞ

Avcı (2003) tarafından bildirildiğine göre Kurslansky, tuzun, tarih öncesinden beri bilinen ve kullanılan bir madde olduğunu belirtmiştir. İlk kez nasıl ve hangi koşullar altında kullanıldığına ilişkin veriler olmamasına karşılık; hayvanların belli özellikteki taşları yalamaları veya tuzlu kaynak sularını içmelerinin insanların dikkatini çektiği ya da bir tuz kaynağı içinde ölmüş hayvanların bozulmadığının fark edilmesi ile koruma amacıyla tuzun kullanılmaya başlandığı kabul edilmektedir

Tuzun önemi ilk çağlarda anlaşılmış ve insanoğlunun yaşamı ile birlikte gitgide önem kazanmıştır. Eski çağlarda Mısır'ın balık ihracatında tuz kullandıkları tarihi belgelerle kanıtlanmıştır. İlk çağlarda tuz üretimi sadece tuzlu memba sularından yapılmıştır. Romalılar ve Germenler tuzlu memba sularını ısıtılmış taşlar üzerine dökerek tuz üretmişlerdir. Orta çağda Avrupa tuza çok önem vermiş, özel tuz yolları kurulmuş ve isminde tuz kelimesi bulunan şehirler kurulmuştur (Salzburg Salzgitter gibi). Büyük Şarlken zamanında tuz üretim merkezi olan Stassfurt şehrinin başlıca kuruluş nedeni tuzdur. Bu şehir civarında 1452 yıllarında 100 metreyi bulan kuyuların açıldığı saptanmıştır. 1877 de Karl Ochsemus «Tuz yataklarının Ehemmiyeti» isimli kitabı neşretmiştir. XIX. asır Almanya'sında tuz arayan şirketler sayısının yüzü geçtiği tarih kitaplarında kayıtlıdır (Anonim, 2008a).

Brandau ve Schickert tarafından Anadolu'da tuz kullanımına ait belgelerin Hititler dönemine ait olduğunu bildirmektedir. Hititlerin ekmeğe tuz, kimyon, çörekotu, kişniş ve bal ile tatlandırdıkları bilinmektedir. Bu döneme ait çivi yazılı tabletlerde tuzun kullanılmasının yanında ticaretinde yapıldığı bildirilmişlerdir (Avcı, 2003).

Osmanlı Devleti'nde deniz ve büyük göllerin kıyısında bulunan yerleşim birimlerindeki tuzlalarda ve yeraltı tuz yataklarında üretilen tuz, sanayide, yiyecek maddelerinin uzun süre saklanmasında ve gündelik tüketimde fazlasıyla ihtiyaç duyulan maddelerdendi. Osmanlılar döneminde tuz ihtiyacı, Kıbrıs, Becin (Menteşe Sancağı), Batnos (Aydın Sancağı), İzmir, Menemen, Rodos, Çandarlı, Midilli, Kızılcatusla, Enez, Gümölcine, Selanik, İzvonik, Ağrıboz, Mora, İnebahtı, Avlonya, Devline ve Anadolu'da Tekfur Köyü, Koçhisar Gölü, Hacıbekaş ve Divriği'de bulunan tuzlalardan sağlanırdı (Anonim, 2011).

1.1. Doğada Tuzun Oluşumu

Tuzların teşekkülü yağmur sularının toprak, volkanik ve sedimenter taşlar içinden geçtiği sırada eriyen tuzları bünyesi içine almakla başlar. Bu sular dere olarak nehirlere, nehirler de erittikleri tuzlarla beraber denizlere ve göllere dökülürler. Dışarıya akıntısı olmayan buharlaşmanın oldukça fazla olduğu göllerde tuz birikimi söz konusudur. Buharlaşmanın ardından CaCO_3 , CaSO_4 NaCl, KCl ve $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tuzları çöker (Taşman, 1945).

1.2. Tuzun Önemi ve Kullanım Alanları

Tuzun önemli bir özelliği yiyeceklerin bozulmasını önleyen güçlü bir etken olmasıdır. Bu amaçla besin sanayinde bol miktarda kullanılır. Tuz kimya sanayinde önemli bir yer tutar. Bileşimindeki Cl^- nedeni ile birçok üretimin temelini meydana getirir. Bileşimindeki Na^+ nedeni ile de NaOH üretiminin ham maddesidir. Ayrıca tuz deri endüstrisi gibi alanlarda ve karayollarında buzlanmayı önlemek amacı ile de kullanılmaktadır (Avcı, 2003).

1.3. Dünyada Tuz Üretimi

Belli başlı tuz üreticisi ülkeler ABD, Çin, Almanya, Hindistan, Kanada, Avustralya, Meksika, Fransa, Brezilya ve İngiltere'dir. Bu ülkeler tuz üretiminin $\frac{3}{4}$ 'ünü karşılarken, ABD tek başına dünya tuz üretiminin %25'ini gerçekleştirmektedir. Yıllık tuz üretimi 2 milyon tonun üzerinde olan Türkiye, dünya toplam tuz üretiminde nispeten küçük bir paya sahiptir.

Amerika'daki Büyük Tuz Gölü, Orta Doğudaki Ölü Deniz, Kara Denizin yakınlarındaki Sivash Gölü yüksek oranda tuz içeren göllerdir. Ayrıca; Mısır'daki Wadi Natrun Gölü, Kenya'daki Magadi Gölü ve Amerika'daki Mono Gölü, Owens Gölü, Searles Gölü ve Büyük Soda Gölü yüksek oranda tuz içeren sodalı göllerdir (DasSarma ve Aora, 2001).

1.4. Türkiye’de Tuz Elde Edilen Tuzlalar

Ülkemizde tuz ihtiyacının bir kısmı göllerden ve kalanı da kaya ve tuzlu kaynak sularından elde edilmektedir (Taşman, 1945).

Tuz Gölü(Ankara), Acı Göl(Denizli), Salda Gölü(Burdur), Seyfe Gölü(Kırşehir), Tuzla Gölü(Kayseri) ve Bolluk Gölü(Konya) tuz elde edilen göller arasındadır. Ülkemizde kaya tuzu Gülşehir, Tepesidelik, Sekili, Çankırı, Kağızman ve Tuzluca İşletmelerinde üretilmektedir. Üretim yöntemi olarak yeraltı işletmeciliği yöntemlerinden geniş oda-topuk uygulanmaktadır. Bu yöntemle üretilen tuz, yerüstü kaynaklarından elde edilen tuza göre daha pahalı ve miktar yönünden de daha azdır. Canik(Van), Aktuzla(Malazgirt) ve Tuzlagözü(Kozluk) yer altı tuzlu su kaynakları havuzlarda buharlaştırılarak tuz elde edilmektedir (Birbir ve Sesal, 2003; Özcan ve ark., 2006; Demirtaş, 2010).

1.5. Halofilik Prokaryotların Sistematikteki Yeri

Canlılar alemi 1500 baz büyüklüğündeki 16S rRNA ve 18S rRNA ribonükleotidlerinin dizilişlerine göre Bacteria, Archaea ve Eucarya olmak üzere üç domaine ayrılır. Bakteriler ve Arkebakteriler prokaryotik hücre yapısına sahiptirler. Arkebakterilerin hücre duvar yapısında peptidoglikanın yerine polisakkarit, protein ve glikoproteinler bulunur. Bacteria domaini içerisinde halofil türler *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* ve *Bacteroidetes* filumları içerisinde yayılış gösterirler.

Arkebakteriler filumu içerisinde yer alan Halobacteria sınıfına mensup *Halobacteriaceae* familyası içerisinde halofilik arkebakteri türleri yayılış gösterir (Oren, 2008). Bu familya içerisinde *Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halomicrobium*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halosimplex*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Halovivax*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronolimnobius*, *Natronomonas* ve *Natronorubrum* cinsleri bulunur (Kamekura, 1998; Anonim, 2008b).

Gammaproteobacteria içerisinde yer alan Halomonadaceae familyası neredeyse sadece halofilik bakterileri içerir. Bu familyanın içerisinde *Carnimonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Halomonas* ve *Zymomonas* genusları bulunur (Arahal ve ark., 2002; Arahal ve ark., 2007). Bu familyada tür sayısı en fazla olan *Halomonas* genusudur (Mata ve ark., 2002).

1.6. Halofilik Prokaryotlarda Osmotik Düzenleme

Halofilik mikroorganizmaların habitatları tuzcul ortamlardır. Halofilik mikroorganizmalar tuzu seven mikroorganizmalardır. Halofilik prokaryotlar içerisinde hem bakterilere hem de arkebakterilere ait türler bulunur. Bu mikroorganizmalar tuz göllerinde, tuz üretim tesislerinde ve tuzlanmış balık ve derilerin yüzeyinde bulunurlar. Hafif derecede halofiller 0.2-0.85M (%2-5), ılımlı halofiller 0.85-3.4M (%5- 20) ve ekstrem halofiller ise üremeleri için 3.4-5.1M (%20-30) NaCl konsantrasyonuna ihtiyaç duyarlar (DasSarma ve Arora, 2001; Rothschild ve Mancinelli 2001; Grant, 2004).

Tuzlu habitatlarda yaşayan bazı bakteriler tuzu tölere edebilirler ve halotolerant olarak adlandırılırlar. Mudryk ve Donderski (1991), Polonya'da Gardno Gölü'nden izole ettikleri halofilik bakterilerde metabolik aktivitesi ile ilgili çalışmalarında NaCl konsantrasyonunun artmasıyla substrat kullanımının azaldığını belirlediler.

Halofilik bakteriler yüksek miktarda tuz içeren ortamlara iki yöntemle adapte olurlar. Bu stratejilerin ilki sitoplazmada KCl'ün molar konsantrasyonunu artırmaktır. Halofilik bakterilerin membranlarında iyonların ve bazı moleküllerin taşınması aktif transport yolu ile gerçekleşir. Halofilik bakterilerin membranlarında bulunan bakteriyorodopsin molekülü proton pompası, halorodopsin molekülü Cl⁻ iyon pompası olarak görev yapmaktadır. Sodyum ve protonlar antiporter, potasyum uniporter, sodyum ve amino asitler symporter, kalsiyum ve sodyum antiporter olarak taşınırlar (DasSarma ve Arora, 2001; Rothschild ve Mancinelli 2001).

Tuz biriktirme stratejisi daha çok Halobacteriaceae familyasında görülmekle beraber bu familya ile sınırlı değildir. Halanaerobiales (Firmicutes) üyeleri de sitoplazmalarında KCl biriktirir. Filogenik olarak Halobacteriaceae'ye akraba olmayan ve son zamanlarda kristalize tuz örneklerinde izole edilen *Salinibacter* türleri de bu stratejiyi kullanır. İkinci strateji sitoplazmada hücre içi osmotik basıncı yükselten tuz

hariç osmolitlerin (organik compatible solutes) sentezi veya biriktirilmesi stratejisidir. Halophilic bakterilerin çoğu ve methanojenik arkebakteriler compatible solutes stratejisini kullanırlar. Organik osmolitler (compatible solutes) arasında glisin betain, ektoin, diğer amino asit türevleri, şekerler ve polioller bulunur (Zahran, 1997; Roberts, 2005).

Salinivibrio türleri yüksek miktarda tuz içeren ortamlara, sitoplazma içerisinde; ektoin, glisin, betain, ve glutamat osmolitlerini biriktirerek adapte olurlar (Zhu ve ark., 2007). *Halobacillus halophilus* tuz biriktirme stratejisinin yanında, glutamin ve glutamat sentezleyerek tuzlu ortamlara adapte olur (Saum ve Müller, 2005).

Zhu ve ark. (2007), *Halomonas ventosae* türünde ozmolit olarak ektoin sentezlendiğini tespit etmişlerdir. Vargas ve ark. (2006), *Chromohalobacter salexigens* türünde ortamda tuz bulunmadığı zaman ektoin ve hidroksi ektoin sentezinin engellendiği belirlemişlerdir.

1.7. Halofilik Prokaryotların Biyoteknolojik Önemi

Halofilik prokaryotların biyoteknolojik diğer bir deyimle ekonomik önemi her geçen gün artmaktadır.

Halofilik arkebakterilerin çoğu büyük oranda karotenoid pigmentine sahiptir. Karotenoid pigmenti bunları güneşten gelen, radyasyondan korur (Grant ve Ross, 1986).

Tuzlaların yapısında yer alan bakteriyoruberin, karatinoidler, klorofil gibi pigmentler ve polar lipitler, mikrobiyal toplulukların yapısı hakkındaki çalışmalarda biyomarkırlar olarak kullanılırlar (Asker, ve Ohta, 1999; Oren ve Valera, 2001).

Ekstrem halofilik arkebakterilerin sahip olduğu bakteriorodopsin molekülünün elektronik endüstrisinde, optik kayıt materyali olarak holografik ortamlarda kullanılmaktadır. Osmolitler biyomoleküller veya bütün hücrenin stabilizasyonunda tuz antagonisti veya stresten koruma ajanı olarak görev yaparlar (Ergin, 1999; Margesin ve Schinner, 2001).

Bu mikroorganizmalardan biyomolekülleri tuz stresinden koruyan ajanlar, biyopolimerler, izomeraz ve hidrolaz gibi enzimler, karoten, fermente gıdalar ve gıda katkı maddeleri endüstriyel yolla üretilmektedir (Oren, 2002; Satyanarayana ve ark., 2005).

Malat dehidrogenaz ve dihidroflat redüktaz, selüloz, alkalın fosfataz ve ekstraselüler hidrolitik enzimler halofilik bakterilerden izole edilirler (Zumsan ve ark., 1989; Mavarech ve ark., 2000; Demirjian ve ark., 2001; Sánchez-Porro ve ark., 2003).

Halomonas suşları tabiatta yarılanma süresi çok uzun zaman alan beta ışımaya neden olan Technetium'un ortadan kaldırılmasında kullanılır (Fujimoto ve Morita, 2006). Ayrıca bu bakteriler tekstilde kullanılan azo boyasının dekolorizasyonunda da kullanılırlar (Asad ve ark., 2007; Guo ve ark., 2008).

Mata ve ark. (2006) *Halomonas ventosae* ve *Halomonas anticariensis* türlerinde ilaç ve tarım endüstrisi başta olmak üzere çeşitli endüstrilerde kullanılan eksopolisakkarit ürettiğini tanımlamışlardır.

Halomonas maura tuzlu topraklarda azotu fiske etme yeteneğine sahiptir (Argondona ve ark., 2005).

Halofilik *Actinopolyspora* türleri antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler (Kokare ve ark., 2004).

Bu mikroorganizmaların sentezlediği fibrokristal yapıları tümör oluşumu engelleyen ilaçların üretilmesinde drog olarak kullanılmaktadır (Alba ve ark., 2001). Halofilik bakterilerden elde edilen halosin olarak adlandırılan peptit antibiyotikler (Namenamisinler) antikanser ajanı olarak kullanılırlar (O'Connor ve Shand, 2002; Ireland ve ark., 2003).

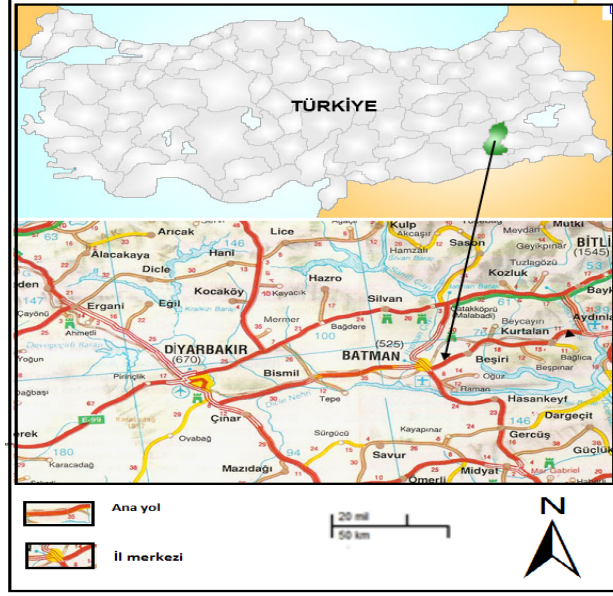
Halofilik bakterilerin bazıları gıdalarda bozulmalara neden olurlar. Yüksek tuz konsantrasyonları içeren su ürünlerinin (kuru tuzlama uygulanmış veya salamura edilmiş balık) bozulmalarına zorunlu halofilik bakteriler ile gram-negatif, halofilik anaerobik veya aerobik bakteriler, ozmotolerant maya türleri neden olmaktadır (Çaklı ve Kışla, 2003).

1.6. Araştırma Alanının Tanıtımı

Bu araştırmada; Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde, Batman İli'nin Kozluk ilçesi sınırları içerisinde yer alan, Tuzlagözü Tuz İşletmesi'nden alınan tuzlu su ve tuzlu toprak örneklerinden halofilik bakterin izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Araştırma alanı olarak belirlenen Tuzlagözü Tuzlası Batman İli, Kozluk ilçesi, Tuzlagözü Köyü sınırları içerisinde yer almaktadır. Tuzla Bitlis-Diyarbakır karayolunun 132.

kilometresinde yer almakta ve Kozluk İlçesi'ne 7km uzaklıktadır. Tuzla yörenin tuz ihtiyacının büyük bir bölümünü karşılamaktadır (Şekil 1.1; Şekil 1.2).



Şekil 1.1 Araştırma alanının haritası.



Şekil 1.2. Tuzlagözü tuzlasında tuzlu sularla kaplı bir alan.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Halofilik prokaryotların tuzlu çevrelerden izolasyonları ve yeni türlerin tanımlanması ile ilgili çok sayıda araştırma mevcuttur.

Ventosa ve ark. (1987), İspanya'da Atlantik Okyanusu kıyısında, Huelva yakınlarında kaya tuzu örneklerinden; heterotrofik, halofilik olmayan, ılımlı halofilik ve ekstrem halofilik toplam 564 strain izole etmişlerdir. Araştırmacılar 140 ılımlı halofilik izolatanın numerik analiz sonucunda 8 fenon oluşturduğunu ve bu fenonlar içerisinde yer alan türlerin *Deleya halophilla*, *Vibrio casticola*, *Flavobacterium* sp. ve *Asineobacter* sp ait olduğunu belirlemişlerdir.

Ihara ve ark.(1997), Arjantin'in tuzlu topraklarından iki ekstrem halofilik arkebakteri türü, *Haloarcula argentinensis* ve *Haloarcula mukohataei* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Rodriguez ve ark. (1997), Puerto Rico ve Caribbean'da tuz üretim tesislerinden *Halobacterium salinarum*, *Haloferax volcanii* ve *Haloarcula japonica*'yı izole etmiş ve tanımlamışlardır.

Tsu ve ark. (1998), Californiya'da bir tuzladan izole ettikleri *Desulfovibrio senezii* türünü yeni tür olarak tanımlayıp bu türün *Desulfovibrio fructosovorans* türüne filogenetik olarak çok yakın bir tür olduğunu bulmuşlardır.

Ventosa ve ark. (1998), tuzlu çevrelerden izole ettikleri hareketli, endospor oluşturan, çomak şeklindeki toplam 31 ılımlı halofilik bakteri suşunun *Bacillus* cinsi içerisindeki dağılışını fenotipik ve DNA baz kompozisyonlarına göre belirlemişlerdir.

Anton ve ark. (2000), İspanyada Santa Pola bölgesinde Braç de Port Tuzlasından doygunluk derecesinde tuz içeren, birçok havuzdan aldıkları örneklerden izole ettikleri suşların *Salinibacter* genusuna ait ekstrem halofilik bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir.

Chun ve ark. (2000), Kore'de Kunsan bölgesinde bir tuzladan izole ettikleri ılımlı halofilik suşu *Nocardiopsis kunsanensis* olarak yayınlamışlardır.

Lizama ve ark. (2001), 1984-1992 yılları arasında, Şilinin Kuzeyinde Atacama Tuzlasından aldıkları örneklerden izole ettikleri 82 suşun ekstrem halofilik arkebakterilere ait olan türler olduğunu bulmuşlardır.

Anton ve ark. (2002), İspanyada Aicenta ve Mallorca Tuzlarının kristalize tuz havuzlarından aldıkları örneklerden izole ettikleri *Salinobacter ruber* türünü yeni tür olarak yayınlamışlardır.

Arahal ve ark. (2002), ılımlı halofik bakteri gruplarından biri olan Halomonadaceae familyasına ait türlerin 23S ve 16S rDNA skans analizini gerçekleştirmişlerdir.

Mata ve ark. (2002), *Halomonas* genusuna ait 21 türün tip streinlerinin morfolojik, fizyolojik biyokimyasal, beslenme ve antibiyotik duyarlılık testlerini belirleyerek fenotipik özellikleri ortaya koydular. Bu verileri Taxan Programında değerlendirerek türlerin benzerlik oranlarını ortaya koymuşlardır.

Li ve ark. (2003), Çin de tuzlu topraklardan bazı Aktinomycet türlerini izole etmişlerdir. % 20 NaCl ve pH 7'de üreyen bu suşların *Prauserella halophilla* ve *P. alba* olduğunu bulmuşlardır.

Martinez ve ark. (2004), İspanya'nın güneyinde nispeten nemli tuzlu topraklardan izole ettikleri bakteri suşunun *Halomonas anticariensis* türüne ait olduğunu belirlemişlerdir.

Yoon ve ark. (2004), Kore'de Sarı Deniz'e ait tuzlalardan izole ettikleri halofilik bakterilerin *Halobacillus locisalis* olarak tanımlanan yeni bir türe ait olduğunu tespit etmişlerdir.

Lim ve ark. (2005), Kore'de bir tuzladan izole ettikleri halofilik *Pontibacillus chungwhensis* türünü bilim dünyasına tanıtmışlardır.

Pasic ve ark. (2005), Adriatik'teki Secovlje Tuzlasından izole ettikleri suşların halofilik arkebakterilere ait *Halorubrum* ve *Haloqadrum* genuslarına ait olduklarını bulmuşlardır.

Ren ve Zhou (2005), Çin'de Xin-Jiang bölgesinde nötral tuz göllerinden ve toprak örneklerinden izole ettikleri bakterilerin *Tenuibacillus multivorans* olarak tanımlanan yeni bir türe ait olduğunu belirlemişlerdir.

Ghozlan ve ark. (2006), Mısır'da Alexandria bölgesinde tuzlu habitatlardan izole ettikleri 76 gram negatif ve 14 gram pozitif ılımlı halofilik bakteriyi numerik taksonomi yardımı ile sınıflandırmışlardır. Gram negatif bakterilerin *Pseudoalteromonas*, *Flavobacterium*, *Chromohalobacter*, *Halomonas* ve *Salegentibacter* cinslerine ait

olduğunu, Gram pozitif izolatları ise *Halobacillus*, *Salinococcus*, *Staphylococcus* ve *Tetragenococcus* cinslerine ait olduğunu tespit etmişlerdir.

Bardavid ve ark. (2007), İspanya'nın Balearik adasında kriztalize tuz havuzlarından kırmızı pigmente sahip *Salinibacter ruber*'i izole etmişlerdir.

Çin'de çok eski dönemlerden kalan tuz kuyularında yapılan mikrobiyal çeşitlilik araştırmasında 112 aerobik ekstrem halofilik bakteri izole edilmiştir. Bu bakterilerin *Planococcus*, *Halomonas*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus* and *Virgibacillus* genuslarına ait olduğu bildirilmiştir (Xiang ve ark., 2008).

Chen ve ark. (2008), Çin'nin Kuzeybatısında Qaidam havzasından aldıkları tuzlu toprak örneklerinden, *Salinicoccus salitudinis* streininin yeni tür olduğunu tespit ettiler. Grönland'da Yukimura ve ark. (2009), arktik bölgeden *Oceanobacillus*, *Ornithinibacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus* ve *Bacillus* genuslarını izole ettiler ve bu izolatları 16S rRNA sekans analizine göre tür seviyesinde teşhis etmişlerdir.

Lakshmiathy ve Kannabiran (2009), Hindistan'da tuz üretim havuzlarından izole ettikleri 3 *Streptomyces* izolatınının morfolojik, biyokimyasal özelliklerini belirlemişlerdir.

Firmicutes bölümü ve Bacillaceae familyasına ait ılımlı halofilik *Bacillus* genusu içerisinde yer alan *B. chagannoriensis*, *B. coahuilensis*, *B. haloccharis*, *B. isabelia*, *B. marismortui*, *B. oshimensis*, *B. persepolensis*, *B. polygoni*, *B. salexigens* ve *B. sonorensis* türleri çeşitli araştırmacılar tarafından tuzlu habitatlardan izole edilerek tanımlanmıştır (Garabito ve ark., 1997; Arahal ve ark., 1999; Palmisano ve ark., 2001; Echigo ve ark., 2005; Yumoto ve ark., 2005; Carrasco ve ark., 2007; Aino ve ark., 2008; Albuquerque ve ark., 2008; Cerritos ve ark., 2008; Amoozegar ve ark., 2009; Pappa ve ark., 2009; Yukimura ve ark., 2009).

Gram negatif ılımlı halofilik bakterileri türlerinin çoğunluğu Gammaproteobacteria sınıfı içerisinde yer alan Halomonadaceae familyası içerisinde yer alır. Bu familyanın içerisinde *Carnimonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Halomonas* ve *Zymomonas* genusları bulunur (Arahal ve ark., 2002; Arahal ve ark., 2007). Bu familyada tür sayısı en fazla olan *Halomonas* genusudur (Mata ve ark., 2002).

Ülkemizde de halofilik prokaryotlarla ilgili çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır.

Erdoğan ve ark. (2001), Doğal Tuzlu Ortamlarda Bulunan Halofilik Bakterilerin İzolasyon Tekniklerinin Araştırılması konulu araştırmalarında Tuz Gölü'nden 4 adet, gıdalarda salamura yapımında kullanılan tuzlardan 5 adet, Organize Deri Sanayi'nde deri tuzlamada kullanılan tuzlardan 4 adet ve Sivas'taki Cedit Tuzla'sından 1 adet olmak üzere toplam olarak 14 adet tuz örneğini toplanarak kimyasal ve mikrobiyolojik analizini yapmışlardır.

Birbir ve Sesal (2003), Şereflikoçhisar Tuz Gölü'nden aldıkları 6 adet tuz ve 3 adet tuzlu su örneğini fiziksel kimyasal ve mikrobiyolojik yönden incelemiştir. Örneklerden izole ettikleri 18 halofilik bakteri şuşunun kültürel özellikleri, hücre morfolojileri, fizyolojik istekleri, biyokimyasal özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıklarını ortaya koymuşlardır.

Elevi ve ark. (2004), Ayvalık Tuzlası'ndan aldıkları tuzlu su ve tuzların kimyasal analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Örneklerden izole ettikleri gram negatif halofilik suşların kültürel özellikleri, hücre morfolojileri, fizyolojik istekleri, biyokimyasal özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıklarını ortaya koymuşlardır.

Özcan ve ark. (2006), Tuz Gölü (Ankara), Acı Göl (Denizli), Salda Gölü (Burdur), Seyfe Gölü (Kırşehir), Tuzla Gölü (Kayseri) ve Bolluk Gölü (Konya) olmak üzere Türkiye'nin altı farklı tuzlu bölgesinden toplanan toprak, su ve tuz kütlesi örneklerinden %25 (w/v) NaCl içeren kompleks besi yeri kullanılarak 95 adet halofilik arkebakteri izole etmişlerdir.

Birbir ve ark. (2007), İç Anadolu Bölgesi'nde yer alan Tuz Gölü'nün yakınında bulunan; Kaldırım ve Kayacık ve Tuzlarından izole ettikleri 27 koloninin, koloni morfolojisi özellikleri, biyokimyasal özellikleri, polar lipit içeriği, antibiyotiklere duyarlılık testleri ve 16S rRNA dizilişlerine göre Halobacteriaceae içerisinde yer aldığını belirtmişlerdir. Kaldırım Tuzlasından *Halorubrum* şuşlarını ve Kayacık Tuzlasından *Halobacterium* şuşlarını izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bütün şuşların hidrolitik enzimlere sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Yaşa ve ark., (2008), İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan alınan örneklerden ekstrem halofilik archaea izolasyonu gerçekleştirilerek bu mikroorganizmaların biyokimyasal testlerinin yanı sıra moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Hasdemir ve Ögün (2008), Kayseri Tuzla gölünden izole ettikleri suşların; morfolojik, fizyolojik ve bazı biyokimyasal özellikleri tanımlandı. Karakterize edilen 10 izolatın tümünün *Halomonas* genusuna ait olduğu belirlenmiştir.

Mutlu ve ark. (2008), Tuz Gölü Gölün 5 farklı noktasından Ağustos 2003-Ekim 2005 tarihleri arasında örnekleme Farklı besiyerleri kullanılarak 122 adet aerobik halofilik bakterinin izolasyonu gerçekleştirdi ve bu izolatların bazı biyokimyasal ve antibiyotiklere karşı hassasiyet testlerini yaptılar. Bazı izolatların toplam hücre protein profilleri SDS-PAGE ile çıkarılarak buradan oluşturulan benzerlik dendogramları, referans halofillerle ve kendi aralarındaki ilişkinin ortaya konmasında kullandılar. Farklı koloni morfolojisine sahip olan izolatlardan 25 tanesi seçilerek bunların 16S rRNA dizi analizlerine göre identifikasyonları gerçekleştirmişlerdir.

Altınbayrak ve Ögün (2010), Kağızman(Kars) Kayatuzu Tuzlası ve çevresindeki tuzcul alanlardan izole edilen izolatların, halofilik *Bacillus licheniformis* ve *Halomonas* sp. türlerine türlerine ait olduklarını belirlemişlerdir.

Bu araştırmada; Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Batman İli'nin Kozluk ilçesi sınırları içerisinde yer alan Tuzlagözü Tuz İşletmesi'nden alınan tuzlu su ve tuzlu toprak örneklerinden halofilik bakteri izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kristalize tuz, tuzlu toprak ve tuzlu su örnekleri

Bu araştırmanın materyalini; Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Batman İli'nin Kozluk ilçesi sınırları içerisinde yer alan Tuzlagözü Tuzu İşletmesi ve çevresinden 21.05.2012 tarihinde toplanan tuzlu toprak, tuzlu su örnekleri oluşturdu (Şekil 3.1; Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Tuzlagözü tuzlu toprak örneği.



Şekil 3.2. Tuzlagözü tuzlu su örneği.

3.1.2. Halofilik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyerleri

3.1.2.1. Halofil broth

Besiyeri içeriği distile suda çözülerek tüplere dağıtıldı. Otoklavda 121°C'de, 1Atm basınç altında 15dk süre ile sterilize edildi. Bu besiyeri halofilik bakterilerin izolasyonunda kullanılmıştır (Tindal, 1992).

3.1.2.2. Halofil agar

Besiyeri içeriği distile suda çözüldü. Otoklavda 121°C'de, 1Atm basınç altında 15dk süre ile sterilize edildi. Bu besiyeri halofilik bakterilerin izolasyonunda kullanılmıştır (Tindal, 1992).

3.1.2.3. Çeşitli yoğunlukta NaCl içeren halofil broth besiyerleri

Bu ortamlar izolatların; % 2,5, % 5, %10, % 15, % 20 ve %25 gibi farklı NaCl tuz konsantrasyonlarında büyüyüp büyümediğini test etmek için kullanıldı. (Tindal, 1992).

3.1.2.4. Halofil jelatin ortamı

Jelatin halofilik broth içerisinde çözümlenerek tüplere dağıtıldı. Tüpler otoklavda 121°C 1Atm basınçta 15 dk sterilize edildi. Bu besiyeri, izolatların jelatinaz aktivitesini ortaya koymak için kullanıldı (O'Leary, 1989; Tindal, 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.1.2.5. Halofil nişasta agar

Ortam içerikleri 100ml halofil broth içerisinde eritildi. Besiyeri otoklavda 121°C 1Atm basınçta 15 dk sterilize edildi. Bu besiyeri bakterilerin amilaz enzimine sahip olup olmadığının saptanmasında kullanıldı (O'Leary, 1989; Tindal, 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.1.2.6. SIM Medium (Difco: 0271-01-1)

Karışım distile su içerisinde eritilerek besiyerinden tüplere dağıtıldı. Tüpler otoklav cihazında 121°C'de ve 1Atm basınçta 15dk sterilize edildi. Bu besiyeri izolatların; H₂S, İndol üretimi ve hareketli olup olmadıklarının test edilmesinde kullanıldı. (O'Leary, 1989; Tindal, 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.1.2.7. Simmons sitrat agar (Difco:0091-01-9)

Besiyeri distile su içerisinde homojenize edildi. Besiyeri Benmari Cihazı'nda eritildi. Tüplere dağıtıldı ve pH 6.8'e ayarlanıp karışım 15dk süreyle otoklavlanarak sterilize edildi. Sterilizasyondan sonra tüplerdeki besiyerinin yatık bir şekilde katılaşması sağlandı.

3.1.2.8. Üre broth

Besiyeri distile su içerisinde çözüldü. Tüplere dağıtıldı. Tüpler Tindalizasyon yöntemi ile sterilize edildi.

3.1.2.9. Nitrat broth

Halofil broth Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra test tüplerine dağıtılmış ve otoklavda 121°C 1 Atm basınçta 15 dk sterilize edildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006). Bu besiyeri nitratın nitrite indirgenmesinin belirlenmesinde kullanıldı.

3.1.2.10. Karbonhidrat fermentasyon ortamları

Halofil Broth içerisine indikatör boya olarak Brom Timol Mavisini katıldı. Besiyerinden 5'er mililitre tüplere dağıtıldı. Tüpler otoklavda 121°C 1Atm basınçta 15 dk sterilize edildi. Test edilecek şekerler Tindalizasyon ile sterilize edilerek besiyeri içerisindeki konsantrasyonu %1 olacak şekilde katıldı (O'Leary, 1989; Tindal, 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.1.3. Kullanılan çözelti ve boyalar

3.1.3.1. Alfa-naftol çözeltisi

Alfa-Naftol Çözeltisi; Alfa-Naftolün etanolde çözülmesi ile hazırlandı. Bu çözelti nitrat indirgenmesi testinde kullanıldı (Çotuk ve Küçükler, M., 1992; O'Leary, 1989; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.1.3.2. Sülfanilik asit çözeltisi

Nitrat indirgenmesi testinde kullanılmıştır.

3.1.3.3. Lügol çözeltisi

İyot ve Potasyum İyodür porselen havan içerisinde dövülerek iyice ezildi. Üzerine distile su eklenerek homojenize edildi. Gram boyama yönteminde mordan olarak kullanıldı.

3.1.3.4. Kristal Viyole boyası

1g Kristal Viyole Boyası havanda dövüldü. Üzerine 10ml %96lık Fenol kristali ve distile su ilave edildi. 24 saat bekletildi ve filtre kağıdından geçirilerek Gram Boyama yönteminde kullanıldı.

3.1.3.5. Safranin boyası

Safranin etanolde çözülmüştür, distile su ilave edilip iyice karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu çözelti gram boyama yönteminde kullanıldı.

3.1.3.6. % 5'lik Malaşit Yeşili boyası

5g Malaşit Yeşili 100ml distile su içerisinde çözüldü. Malaşit yeşili boyası endospor boyamada kullanılmıştır .

3.1.3.7. Oksidaz ayıracı

% 1'lik Tetrametil-Parafanilendiamindihidroklorid çözeltisi oksidaz ayıracı olarak kullanılır.

3.1.3.8. %10'luk Demir Klorür çözeltisi

Fenilalanin deaminasyon testinde ayıraç olarak kullanıldı.

3.1.3.9. %3'lük H₂O₂ çözeltisi

%3'lük H₂O₂ Çözeltisi katalaz testi için kullanıldı.

3.1.3.10. Karbon kaynakları

Glukoz, Fruktoz, Mannoz ve Sukroz Fruktoz'un %10'luk eriyikleri hazırlandı ve tinalize edildi.

3.1.3.11. Antibiyotik diskler

Bioanalys Firmasından sağlanan; Amikasin(10µg), Ciprofloxacın(5µg), Eritromisin(15µg), Rifamicin (25µg), Streptomisin (10µg), Tobramisin(10µg), antibiyotik diskleri izolatların antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tuzlu su, tuzlu toprak ve tuz örneklerinin toplanması

Tuzlagözü Tuzlası'ndan alınan tuzlu toprak örnekleri 1000ml'lik steril cam kavanozlar içerisinde, tuzlu su örnekleri ise steril 300ml'lik cam şişelerle toplandı ve 12 saat içerisinde laboratuara ulaştırıldı.

3.2.2. Tuzlu su örneklerinin kimyasal analizlerinin yapılması

Tuzlagözü Tuzlası'ndan toplanan tuzlu su ve tuzlu toprak örneklerindeki Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , K^+ , Mn^+ iyonlarının miktarı Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilim Uygulama Merkezi Laboratuvar'ında Atomik absorpsiyon cihazı ile yapıldı.

Tuzlu su örneklerindeki iyonların tespiti için 100ml su alındı. İçerisine 5ml %65'lik HNO_3 ilave edildi. Filtre kağıdı (Whatman No 1) ile süzüldü. Süzüntüden 50ml alınarak, Bilim Uygulama Merkezi Laboratuvar'ında gönderildi.

Toprak örneklerindeki iyonların tespiti için 100gr kadar toprak alındı. Laboratuvar ısısında 1-2 gün serilerek kurutuldu. Kuruyan toprak havanda dövülerek inceltildi. 200 mesh'lik elekten geçirildi. Elekten geçen kısım $105^{\circ}C$ 'de 2 saat kurutuldu. Nem almaması için ağzı sıkıca kapatıldı. Kurutulan topraktan 50ml'lik behere 1gr konuldu. Üzerine 10ml kral suyu (3 hacim HCl + 1 hacim HNO_3) konuldu. Akabinde tam kuruyana kadar $37^{\circ}C$ 'de etüvde bekledildi. Soğuduktan sonra üzerine 5ml 2M HNO_3 çözeltisi eklendi. Hafifçe ısıtılarak süzüldü. Hacim 20ml'ye ayarlandı ve Bilim Uygulama Merkezi Laboratuvar'ında gönderildi (Trussel ve ark.1989; Şekil 3.6).



Şekil 3.6. 200 mesh'lik elekten geçirilmiş toprak örneği

3.2.3. Örneklerin pH'larının Ölçümü

pH ölçümü; Trussel ve ark. (1989), tarafından bildirilen metoda göre yapıldı. İçerisinde 250ml distile su bulunan balon jodelere tuz ve toprak örneklerinden 25g ilave edildi. Balon jodeler elle çalkalanarak iyice homojenize edildi. Çözeltilerin çökmesi

beklenerek İmolab wtw marka dijital pH metre ile ölçüldü. Su örneklerinin pH'sı numune şişelerinden direkt ölçüldü (Trussel ve ark.1989; Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Toprak pH'sının ölçümü

3.2.4. Uçucu Madde (nem) Tayini

Petri kapları içerisine konulan 50g'lık tuz ve toprak örnekleri 105°C'de ağırlığı sabitleninceye kadar Pasteur Fırınında tutuldu. Nem miktarı % cinsinden hesaplandı. (Trussel ve ark., 1989; Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Nem oranı ölçülecek toprak örneği.

3.2.5. Tuzlu su ve tuz örneklerinde bulunan halofilik bakterilerin toplam sayısının belirlenmesi

Halofilik bakterilerin sayımı için, içerisinde %5'lik, 250ml NaCl çözeltisi bulunan balon jöjelere toprak ve tuz örneklerinden 25g kuru ağırlığa karşılık gelen ve su örneklerinden 25 ml su örneği konularak, çalkalamak sureti ile homojen hale getirildi. Ayrıca bu solüsyonlardan içerisinde %20 oranında 9ml NaCl çözeltisi bulunan tüpler içerisinde dilisyonlar hazırlandı. Bu dilisyonların birim hacmindeki halofilik bakteri ve halofilik arkebakterilerin sayısı halofilik agar kullanılarak seyreltme plaka yöntemi ile tespit edildi (O'Leary, 1989; Tindal, 1992; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.6. Tuzlu su ve tuzlu toprak örneklerinden aşırı halofilik bakterilerin izolasyonu

Halofilik bakterilerin izolasyonu için sayım aşamasında hazırlanan ana solüsyonlardan farklı konsantrasyonlarda NaCl (%5, %10, %15, %20 ve %25) içeren halofilik broth tüplerine ekimler yapıldı. Ekim yapılan tüpler 37-40°C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde muhtemel halofilik bakterilerin zenginleştirilmesi sağlandı. Müteakiben farklı konsantrasyonlarda NaCl (%5, %10, %15, %20, %25) içeren halofilik broth tüplerinden halofilik agar içeren petri kutularına seyreltme plaka yöntemi ile ekimler yapıldı. Petri kutuları 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip üreyen koloniler koloni rengine göre muhtemel halofilik bakteri kolonileri olarak değerlendirildi ve bunlardan saf kültür elde edildi. Elde edilen saf kültürlerin morfolojik, fizyolojik, ve biyokimyasal özellikleri tespit edildi (Grant ve Larsen, 1984; Tindall, 1992).

3.2.7. Halofilik bakterilerin saf kültürlerinin elde edilmesi

Halofilik Agar besiyerinde gelişen karışık kültürden steril halofilik agar besiyerlerine öze yardımıyla çizgi plak yöntemi ile ekimler yapılarak saf kültürler elde edildi. İlave olarak saf kültürlerin yatık besiyeri içerisinde stokları hazırlandı (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.8 Numerik taksonomi için uygulanan testler

Toplam 5 test suşu nümerik taksonomi 41 karakter açısından test edildi. Test organizmaları 20°C'de gliserol içerisinde muhafaza edildi. Çizelge 3.2'de test organizmalarının karakterizasyonu için yapılan testler verilmektedir.

3.2.9. Farklı tuz konsantrasyonlarında suşların gelişmelerinin incelenmesi

İzole edilen suşlar, %2,5, %5, %10, %15, %20 ve %25 NaCl içeren steril sıvı besiyerine ekilerek petri kutuları 37°C' de 48 saat inkübe edildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.10. Halofilik Bakteri Suşlarının Koloni ve Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi

İzole edilen suşların koloni morfolojisi özellikleri binoküler mikroskop yardımı ile belirlendi. Hücre morfolojisinin belirlenmesi için modifiye gram boyama yöntemi uygulandı. (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.11. Bakteri suşlarının modifiye gram boyama yöntemi ile boyanması

Gram boyama yapılacak saf kültürlerden fizyolojik tuzlu su ile yayma preparat hazırlandı. Preparat havada kurutulup %2'lik asetik asit ile 5 dakika tespit edildi. Fiksasyon işleminden sonra preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatıldı. İki dakika beklendi. Fazla boya dökülerek Lügol çözeltisi ilave edilip 1 dakika beklendi. Preparat %96'lık Etil Alkol alkol ile 6-10sn dekolorize edildi. Saf su ile yıkandı. Son olarak Safranin boyası ilave edildi. 30 saniye kadar beklenip preparat saf su ile yıkandı. Kurutma kağıdı kullanılarak preparat kurutuldu. Kuruduktan sonra preparatın üzerine 1 damla immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte incelendi mormenekşe görülenler gram pozitif, kırmızı pembe görülenler gram negatif olarak değerlendirildi (Dussault,1955).

3.2.12. Bakteri suşlarının endospor boyama yöntemi ile boyanması

Spor boyama yapılacak saf kültürlerden fizyolojik tuzlu su ile yayma preparat hazırlandı. Preparat havada kurutulup, alevde fiske edildi. Preparatın üzerini kapatacak kadar malaşit yeşili ilave edildi. Ucunda yanmakta olan alkollü pamük bulunan alevle hafifçe 3dk ısıtıldı. Ardından saf su ile dekolorize edildi. Preparat 30 saniye Safranin boyası ile boyandı. Saf su ile yıkandı. Kurutma kağıdı kullanılarak preparat kurutuldu. Preparatın üzerine 1 damla immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte incelendi. Sporların yeşil, vejetatif hücrelerin kırmızı pembe boyandığı gözlemlendi (Çotuk ve Anđ, 1992).

3.2.13. Biyokimyasal testler

Modifiye gram boyama metodu uygulanarak boyanma özellikleri ve morfolojileri belirlenen suşlar klasik biyokimyasal yöntemlere göre cins seviyesinde teşhis edildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.1. Katalaz testi

Lam üzerine 100µl %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatıldı. Halofilik Agar üzerinde geliştirilen kolonilerden öze ile bir miktar alınarak lam üzerindeki hidrojen peroksit ile muamele edildi. Lam üzerinde gaz kabarcıklarının oluşması pozitif katalaz reaksiyonu, gaz kabarcıklarının gözlenmemesi ise negatif katalaz reaksiyonu olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13. 2. Oksidaz testi

Sitokrom oksidaz testi gram negatif aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin ayırt edilmesinde kullanılan önemli bir testtir. Bu amaçla Para-aminodimetilanilin monohidroklorid'in %1'lik eriyiği petri kabı içerisinde filtre kağıdına emdirildi. Bakterinin katı vasatta üretilen kültüründen platin öze ile bir miktar alınıp ayraç

emdirilmiş filtre kağıdı üzerine tatbik edildi. Akabinde 5-10 saniye içinde kırmızı-mor bir renk oluşması oksidaz pozitif olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.3. Sitrat testi

Sitratın karbon kaynağı olarak kullanılıp, kullanılmadığının belirlenmesi için yapılan testtir. 24 saatlik kültürden Yatık Simmons Citrate Agar besiyerine platin iğne ekim yapıldı. Besiyeri renginin koyu maviye dönüşmesi pozitif, orijinal yeşil renkte kalması negatif sonuç olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006)

3.2.13.4. Hidrojen sülfür oluşturma testi

Test edilecek bakteri suşları SIM besiyerine platin iğne ile ekilip 37°C'de 48 saat inkübe edildi. inkübasyon süresi sonunda besiyerinin renginin siyaha dönmesi H₂S pozitif olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.5. Hareket testi

İçerisinde SIM ortamı buluna tüplere batırma yöntemiyle platin iğne yardımı ile ekim yapıldı. Tüpler 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Ekim hattının yanı sıra besiyerinin tamamında bulanıklık görülmesi hareket pozitif olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006)

3.2.13.6. Üreaz testi

Üre broth tüplerine saf kültürden ekim yapıldı. Tüpler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra besiyerinin renginin pembeye dönmesi üreaz pozitif olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.7. Jelatinaz testi

İçerisinde %12 oranında jelatin bulunan halofilik besiyerlerine platin iğne ile dik olarak ekim yapıldı. Tüpler oda sıcaklığında 7 gün inkübe edildi. İnkübasyonu müteakip tüpler yatırıldığında sıvılaşma görülmesi jelatinaz pozitif olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.8. Nişasta hidrolizi

İçerisinde nişasta bulunan halofilik agar besiyerine bakteriler öze yardımı ile ekildi. Petri kapları 37°C'de 48 saat inkübe bırakıldı. İnkübasyonu müteakip besiyerinin üzerine lügol çözeltisi ilave edildi. Nişastanın hiroliz oduğu bölgelerde koloni etrafındaki berrak ve renksiz bölgeler pozitif nişasta sindirimi, mavi bölge ise negatif nişasta sindirimi olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.9. Kazein hidrolizi

Kazeinli besiyeri 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve petri kutularına döküldü. Kültürler öze yardımı ile besiyerinin yüzeyine küçük dairesel halkalar halinde ekildi. Petri kablaları 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra siyah bir zemin üzerinde incelendi. Üreme bölgelerinin etrafındaki şeffaf bölgeler kazein pozitif olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.10. Tween 80 hidrolizi

Tween 80 içerikli besiyerleri 121°C'de 15 dakika steril edildi ve petri kutularına doküldü. Kültürler öze yardımı ile besiyerinin yüzeyine küçük dairesel halkalar halinde ekildi. Petri kapları 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra koloniler etrafındaki şeffaf zonlar incelendi. Üreme bölgelerinin etrafındaki şeffaf bölgeler Tween 80 pozitif olarak

değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.11. Eskulin hidrolizi

İçerisinde %1 oranında eskulin bulunan besiyerine yoğun çizgiler halinde izolatlardan ekim yapıldı. Petri kapları Petri kapları 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra yoğun üreme bölgesinin etrafındaki zonlar incelendi. Kahverengi-siyah zonlar eskulin hidrolizi pozitif olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.12. Fenilalanin deaminasyon testi

İçerisinde %1 oranında fenilalanin bulunan besiyerine yoğun çizgiler halinde izolatlardan ekim yapıldı. Petri kapları Petri kapları 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonu müteakip kültürün üzerini kaplayacak şekilde %10'luk demir klorür çözeltisinden ilave edildi. Koloniler etrafında yeşil rengin oluşması fenilalanin deaminasyonu yönünden pozitif olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.13. Nitrat indirgenmesi testi

İçerisinde %1 oranında KNO_3 ve Durham tüpü bulunan halofilik broth tüplerine test edilecek kültürlerden ekim yapıldı. Tüpler 37°C'de bir hafta süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip tüplere %1'lik sulfanilik asit ve %0.6'lık Alfa-naftilamin ayraçlarından birer mililitre ilave edildi. Kalıcı kiremit kırmızısı rengin oluşması nitrat indirgenmesi pozitif olarak değerlendirildi (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.14. Karbon kaynaklarının kullanımı testi

Bu test bakterilerin karbonhidratları fermantatif veya oksidatif olarak kullandığını anlamak için yapıldı. İçerisinde %1 oranında test edilecek Karbonhidrat bulunan oksidasyon fermantasyon besiyerine ekimler yapıldı. Fermantatif mekanizmanın anlaşılması için kültürün üzeri steril sıvı parafin ile kaplandı. Tüpler 37°C'de 24+24 saat inkübasyona bırakıldı. Bakterinin şekeri kullanıp kullanmadığı inkübasyon sonucunda besiyeri içerisinde bulunan indikatör boyanın renk değiştirmesi ile anlaşıldı (O'Leary, 1989; Tindal , 1992; MacFaddin, 2000; Gunasekaran, 2002; Atlas, 2006).

3.2.13.15. Antibiyotiklere duyarlılık testi

Halofilik broth içerisinde üretilen 6 saatlik kültürlerden, halofilik agar yüzeyine 100µl kültür steril eğri çam çubuk yardımı ile iyice yayıldı. Petri kapları 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra koloniler etrafında oluşan inhibisyon zonları incelendi. (Bauer ve Kirby, 1966).

3.2.14. Nümerik taksonomik analiz

5 test suşuna 41 birim karakterin uygulanması sonucu, bütün test sonuçları ikili formata uygun olarak pozitif sonuçlar için “+” ve negatif sonuçlar için “-” kullanılarak kodlandı. Yapılan tüm testler pozitif ve negatif kontrol plağındaki gelişmeler ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Test plağındaki gelişme, pozitif kontrol plağındaki gelişmeye eşit veya daha yakın ise pozitif (+), negatif kontrol plağındaki gelişmeye eşit veya daha zayıf ise negatif (-) olarak kaydedildi.

Toplam 5 test suşunun veri analizleri için benzerlik hesaplanmasında değerlendiren S_{SM} (Simple matching coefficients; Sokal ve Michener, 1958) katsayısı analizi kullanıldı.

3.2.15. Genomik DNA izolasyonu

DNA ekstraksiyonu Neumann ve ark. (1992), tarafından geliştirilen standart fenol/kloroform yöntemine göre yapıldı. Halofil Agar içerisinde geliştirilen suşlar steril spatula ile besiyerinin yüzeyinden alınarak STE tamponu içerisinde vortekslenerek homojenize edildi. DNA'nın ekstraksiyonu için 1ml hücre süspansiyonu 8000rpm'de 2dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 400µl STE tamponu (100mM NaCl, 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) ile iki defa yıkandı. Sonra hücreler 8000g'de 2dk santrafütüj edildi. Pellet 200µl TE tamponu (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) içerisinde tekrar süspansiyon edildi. Sonra bu tüplere 100µl Tris-doyurulmuş fenol (pH 8.0) eklendi. Ardından vortekslendi. Sonradan örnekler 4°C'de 13.000rpm'de 5dk sanrifütüj edilerek sıvı faz organik fazdan ayrıldı. Sıvı fazın üst kısmından 160µl 1.5ml hacimli tüplere transfer edildi. 40µl TE buffer eklenerek karışımın hacmi 200µl'ye tamamlandı ve üzerine 100µl kloroform eklenerek 4°C'de 13.000rpm'de 5dk santrafütüj edildi. Lizatın rengi açılıncaya kadar kloroformla ekstrakte edildi. Bu işlem iki veya üç kez tekrarlandı. Sıvı fazın üst kısmından 160µl 1.5ml hacimli tüplere transfer edildi. Tüplerin üzerine 40µl TE ve 5µl RNaz (10mg/ml) ilave edildi ve RNA'nın parçalanması için 37 °C'de 10dk inkübasyona bırakıldı. Sonra tüplere 100µl kloroform eklenerek 4°C'de 13.000rpm'de 5dk santrafütüj edildi. Sıvı fazın üst kısmından 150µl 1.5ml hacimli tüplere transfer edildi. Saf DNA içeren sulu faz sonraki aşamalar için -20°C'de stoklandı

DNA numuneleri, izolasyon işleminin sonunda agaroz jel elektroforeze koşturularak kontrol edildi. İzole edilen DNA numunelerinin agaroz jelde görünür hale gelmesi için jel içerisine floresans özellik gösteren etidyum bromid boyası ilave edildi. Etidyum bromid çift zincirli DNA'nın baz çiftlerine bağlanarak 254 veya 312nm dalga boyunda UV transillüminatörde kırmızı floresans yayma özelliği gösterir. Bu özellik DNA izole edilmiş ise UV translillüminatör üzerinde agaroz jelde bantların görünmesini sağlar. Bunun için 1,2 gr (%1) agaroz 120 ml 1X TBE tamponu bulunan 250 ml'lik erlene ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra mikro dalga fırın yardımıyla tamamen agarozun erimesi sağlandı ve ortalama 60°C'ye soğuyunca içerisine 6µl etidyum bromid (10mg/ml) ilave edildi. Erlen hava kabarcığı oluşmayacak şekilde hafifçe karıştırıldı. Elektroforez tablası düz bir zemine yerleştirildikten sonra jel solüsyonu hava kabarcığı oluşturulmadan döküldü. Taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Agarozun

donmasından sonra tarak çıkarıldı(15-20 dk) ve içinde 1X TBE pH 8 tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Tarağın oluşturduğu boşluklara her bir DNA numunesinden 5 µl ve 2 µl yükleme boyası(Brom Fenol Mavisini) ile birlikte toplam 7 µl olarak yüklendi. Agaroz jel 80 voltta ortalama 20 dk elektroforez edildi ve UV transillüminatör’ de gözlemlendi. Jel görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflandı (Özdemir, 2008).

3.2.16. Test organizmalarının RAPD-PCR ile karakterizasyonu

DNA ekstraksiyonu yapılan test organizmalarına RAPD-PCR tekniği uygulandı ve elde edilen DNA bandlarına göre dendogram oluşturuldu.

PCR kokteylinden tüplere 30µl dağıtıldı ve 2µl DNA eklendi. PCR amplifikasyonu “**Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480**”cihazı ile yapıldı.

RAPD-PCR’da çoğaltılmış DNA’ları % 1’lik 0.5 µg/ml ethidium bromid içeren agaroz jelde (0.5 X TBE tampon) koşturuldu. Yaklaşık 5µl PCR ürünü jel yükleme boyası ile birlikte karıştırılarak jele yüklendi ve 100V, 1 saat boyunca koşturuldu. Çoğaltılan DNA segmentleri moleküler marker ile (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas) kıyaslandı.

4. BULGULAR

4.1. Su Örneklerinin Fiziko-Kimyasal Özellikleri

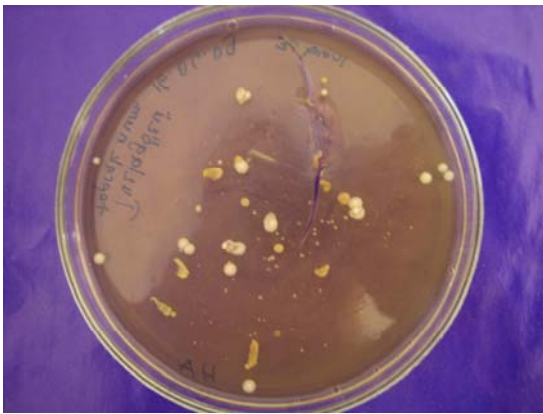
Tuzlagözü tuzlası ve çevresinden toplanan tuzlu toprak örneklerinin pH'sı 8.63, nem oranı %17.96, Ca⁺⁺ 13.01mg/L, Mg⁺⁺ 18.38mg/L, Fe⁺⁺ 1.00mg/L, K⁺ 3.96mg/L ve Mn⁺ 1.07mg/L olarak belirlendi. Tuzlu su örneğinin ise pH'sı 8.48, Ca⁺⁺ 30.45mg/L, Mg⁺⁺ 17.83mg/L, Fe⁺⁺ 0.26mg/L, K⁺ 20.42mg/L ve Mn⁺ 0.36mg/L olarak tespit edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Tuzlu toprak ve tuzlu su örneklerinin fiziko-kimyasal özellikleri

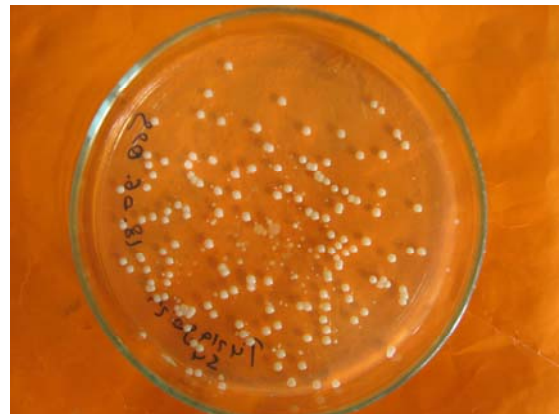
Özellik	Toprak	Su
pH	8.63	8.48
Nem Oranı	%17.96	-
Ca ⁺⁺	13.01mg/L	30.45mg/L
Mg ⁺⁺	18.38mg/L	17.83mg/L
Fe ⁺⁺	1.00mg/L	0.26mg/L
K ⁺	3.96 mg/L	20.42mg/L
Mn ⁺⁺	1.07mg/L	0.36mg/L

4.2. Su ve Toprak Örneklerindeki Bakteri Sayısı

Seyreltme plaka yöntemi ile yapılan sayımlarda su örneklerindeki halofilik bakteri sayısı $5 \times 10^{-2}/\text{ml}$ ve toprak örneklerindeki halofilik bakteri sayısı 2×10^{-4} kob kob/gr olarak belirlendi (Şekil 4.1; Şekil 4.2).



Şekil 4.1. HA'da 0.1ml su örneğindeki ılımlı halofil bakteriler.



Şekil 4.2. HA'da 0.1ml toprak çözeltisindeki ılımlı halofil bakteriler.

4.3. Halofilik İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Tuzlagözü ve çevresinden toplanan tuzlu toprak, tuzlu su örneklerinden, yapılan izolasyon çalışmalarında beş farklı, koloni morfolojisine sahip izolat gözlendi. Seçilen bu izolatlardan dördü; gram negatif, diğeri endopor'a sahip gram pozitif bakteri olduğu belirlendi.

İzole edilen suşlarda R1(Reyhan 1), R2 (Reyhan 2) , R3 (Reyhan 3) , R4 (Reyhan 4) ve R5(Reyhan 5) olarak numaralandırıldı. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal, antibiyotiklere duyarlılık ve moleküler özellikleri belirlendi. Koloni morfolojisi ve hücre morfolojisi ile ilgili olarak Koloni çapı, pigmentasyon ve hücre şekli belirlendi. Fizyolojik özelliklerden ise farklı farklı NaCl konsantrasyonlarında üreme, farklı pH'larda üreme, anaerobik Üreme özellikleri test edildi. Ayrıca oksidaz, katalaz, jelatinaz aktivitesi, tween80 hidrolizi, nişasta hidrolizi, üre hidrolizi, kazein hidrolizi, nitrat redüksiyonu, sitrat kullanımı, hidrojen sülfür oluşumu ve bazı şekerlerin kullanımı ile ilgili biyokimyasal özellikleri tespit edildi (Çizelge 4. 2).

Çizelge 4.2. İzole edilen suşların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve antibiyotiklere duyarlılık özellikleri

Özellikler	R1	R2	R3	R4	R5
Koloni çapı	2mm	2mm	2mm	2mm	2mm
Pigmentasyon	Krem	Krem	Turuncu	Krem	Krem
Hücre şekli	Çomak	çomak	Basil	Çomak	çomak
Gram reaksiyonu	-	-	+	-	-
Endopor	-	-	+	-	-
Hareket	-	-	-	-	-
Anaerobik Üreme	+	+	+	+	+
Oksidaz	+	-	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+
Nutrient Broth'da üreme	Zayıf	-	-	-	-
%2,5 NaCl	+	+	+	+	+
%5 NaCl	+	+	+	+	+
%10 NaCl	+	+	+	+	+
%15 NaCl	+	+	+	+	+
%20 NaCl	+	+	+	+	+
%25 NaCl	+	+	+	+	+
pH 5.0	+	+	+	+	+
pH 6.0	+	+	+	+	+
pH 7.0	+	+	+	+	+
pH 8	+	+	+	+	+
pH 9	+	+	+	+	+
Jelatinaz aktivitesi	-	-	-	-	-
Tween80 hidrolizi	-	-	-	-	-
Nişasta hidrolizi	-	-	-	-	-
Üre hidrolizi	+	+	+	+	+

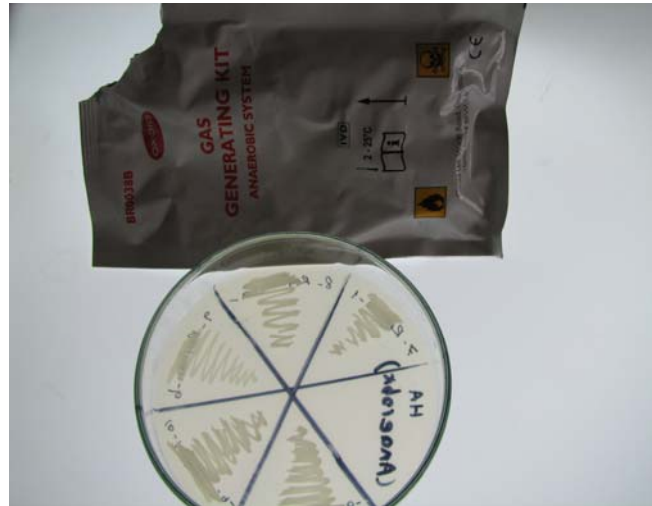
Çizelge 4.2. İzole edilen suşların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve antibiyotiklere duyarlılık özellikleri (devam)

Kazein hidrolizi	-	-	+	-	-
Nitrat redüksiyonu	+	-	-	-	+
Sitrat Kullanımı	+	+	+	+	+
Hidrojen sülfür üretimi	-	-	-	-	-
Glukoz	-	-	+	-	-
Fruktoz	-	-	+	+	-
Sukroz	+	+	+	+	-
Mannoz	-	-	+	-	-
Gliserol	+	-	+	-	+
Esculin	+	+	-	+	+
Phenilalanin	-	-	-	-	-
Amikasin	+	+	-	-	-
Ciprofloxacın	+	+	+	+	+
Eitromisin	+	+	+	+	+
Rifamisin	+	+	+	+	+
Sreptomisin	-	-	-	-	-
Tobramisin	-	-	-	-	-

R1, R2, R4 ve R5 izolatlarının tümünün fakültatif anaerob özellikte olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3; Şekil 4.4).

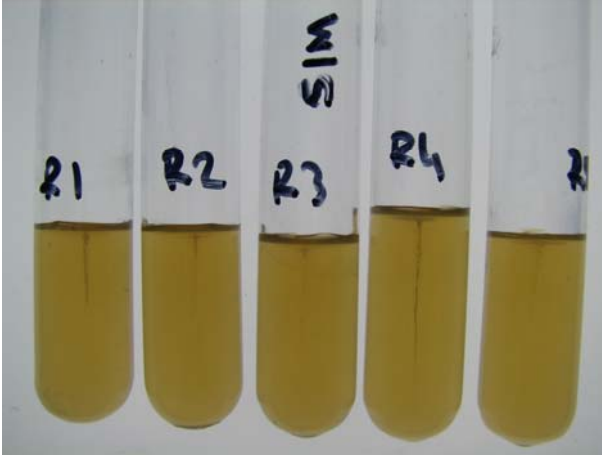


Şekil 4.3. Anaerobik jar.

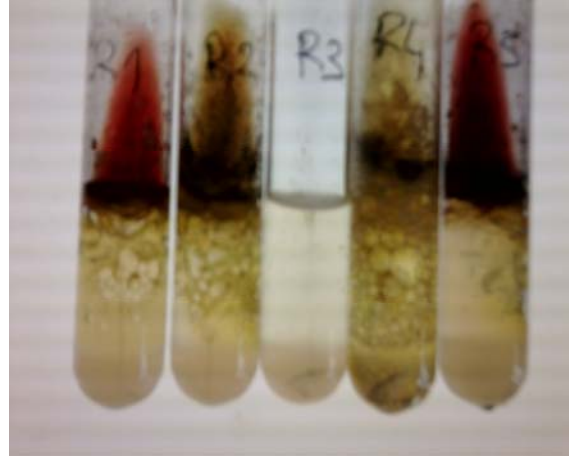


Şekil 4.4. Anaerobik ortamda üreme testi.

Bütün izolatların hareket negatif R1 ve R5 izolatlarının nitrat indirgemesi yönünden pozitif, R2, R3 ve R4 izolatlarının nitrat indirgenmesi yönünden negatif olduğu görüldü (Şekil 4.5; Şekil 4.6).

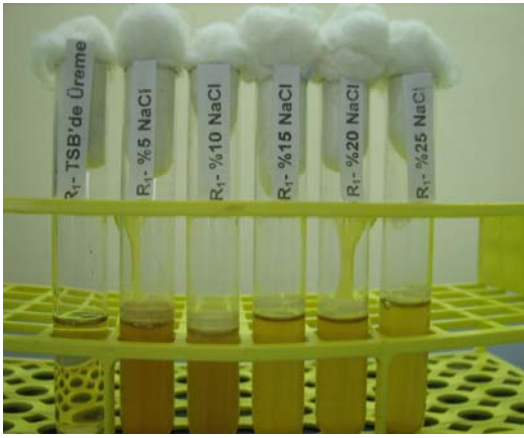


Şekil 4.5. Hareket testi.



Şekil 4.6. Nitrat redüksiyonu testi.

R1, R2, R3, R4 ve R5 izolatlarının tümünün de, Tryptic Soy Broth besiyerlerinde üremediği gözlemlendi. Suşların %2,5, %5, %10, %15, %20 ve %25 oranında NaCl içeren halofilik broth besiyerlerinde canlılıklarını muhafaza ettiği ve %25 oranında NaCl içeren halofil agarda bakterilerin yoğun bir şekilde üreyebildikleri gözlemlendi (Şekil 4.7a; Şekil 4.7b).



Şekil 4.7a. Farklı tuz yoğunluklarında üreme.



Şekil 4.7b. Farklı tuz yoğunluklarında üreme.

İzolatlarının tümünün Nutrient Broth besiyerlerinde üremediği ve pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 ve pH 9'da %20 oranında NaCl içeren halofil broth'da üredikleri gözlemlendi (Şekil 4.8a; Şekil 4.8b).



Şekil 4.8a. Farklı pH değerlerinde üreme.



Şekil 4.8b. Farklı pH değerlerinde üreme.

R1, R3, R4 ve R5 izolatlarında oksidaz ve katalaz pozitif iken R2 izolatında ise oksidaz negatif katalaz pozitif olduğu belirlendi (Şekil 4.9; Şekil 4.10).



Şekil 4.9. Oksidaz testi.



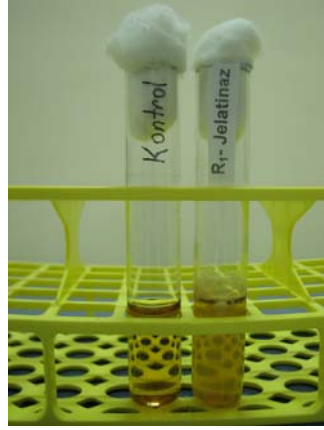
Şekil 4.10. Katalaz testi.

R1 ve R2 izolatlarının Glikoz, Fruktoz ve Mannoz şekerlerini karbon kaynağı olarak kullanamadıkları bunun yanında Sukrozu karbon kaynağı olarak kullanabildikleri belirlendi. R3 izolatının Glikoz, Fruktoz, Sukroz ve Mannoz şekerlerinin tümünü karbon kaynağı olarak kullanabildikleri belirlendi. R4 izolatının Glikoz ve Mannoz şekerlerini karbon kaynağı olarak kullanamadıklarının yanı sıra, Fruktoz ve sukroz şekerlerini karbon kaynağı olarak kullanabildikleri belirlendi. R5 izolatının Glikoz, Fruktoz, Sukroz ve Mannoz şekerlerini karbon kaynağı olarak kullanamadığı belirlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Karbonhidrat kullanımı testi.

R1, R2, R3, R4 ve R5 suşlarının tümünün de jelatinaz negatif ve tüm suşların üreaz pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12; Şekil 4.13).



Şekil 4.12 Jelatin hidroliz testi.



Şekil 4.13. Üre hidrolizi testi.

Bütün izolatların tümünün sitrat pozitif olduğu görüldü (Şekil 4.14.)

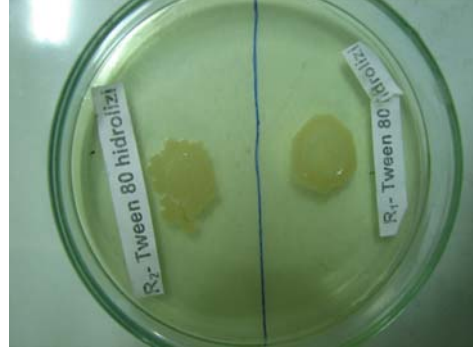


Şekil 4.14. Sitrat testi.

Bütün izolatların, nişasta hidrolizi ve Twen 80 hidrolizi yönünden negatif olduğu görüldü. (Şekil 4.15; Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Nişasta hidrolizi testi.



Şekil 4.16. Tween 80 hidrolizi testi

R1, R2, R4 ve R5 suşlarında kazein hidrolizi negatif özellikte olduğu, R3 suşunda ise kazein hidrolizi pozitif özellikte olduğu görüldü (Şekil 4.17). R1, R2, R4 ve R5 izolatların eskulin pozitif özellikte olduğu, R3 izolatının ise eskulin negatif özellikte olduğu belirlendi (Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Kazein hidrolizi testi.



Şekil 4.18. Eskulin hidroliz testi.

4.4. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Halofil Agarda Disk Difüzyon Yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda R1 ve R2 suşlarının Rifamicin (25µg), Amikasin (10µ), Eritromisin(5µ) ve Ciprofloxacın (5µg) antibiyotik disklerine karşı dirençlilik gösterdikleri ve Streptomisin (10µ), Tobramisin(10µ) antibiyotik disklerine karşı duyarlılık gösterdikleri gözlemlendi. R3, R4 ve R5 suşlarının Ciprofloxacın (5µg), Eritromisin(5µ) ve Rifamicin (25µg) antibiyotik disklerine dirençlilik özelliği gösterdikleri fakat Streptomisin (10µ) ve

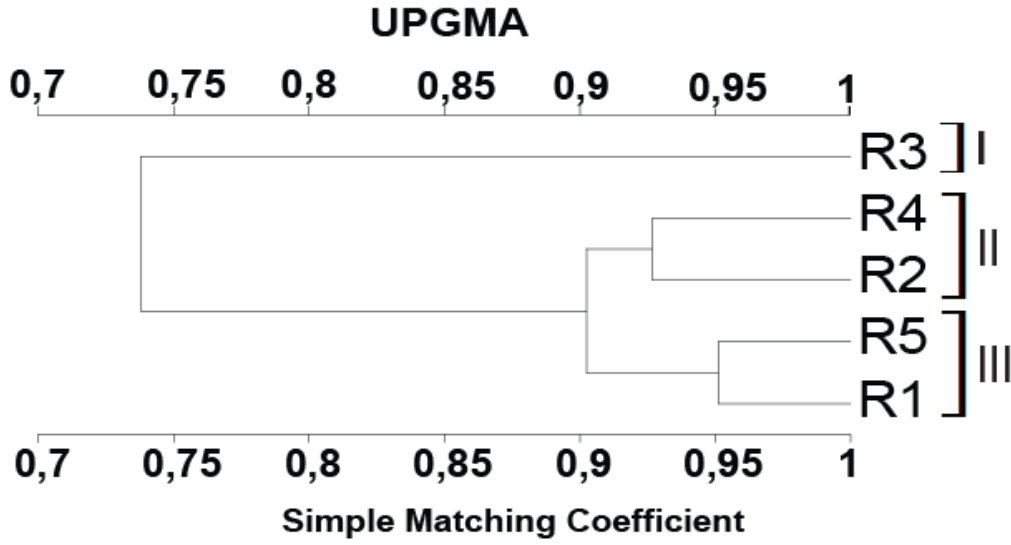
Tobramisin(10 μ) antibiyotik disklerine karşı duyarlılık gösterdikleri gözlemlendi (Şekil 4.19.).



Şekil 4.19. Antibiyotik duyarlılık testi.

4.5. Nümerik analiz sonuçları

5 test suşu için yapılan 42 farklı testin sonuçları MVSP 3.2 (Multi-Variate Statistical Package;) programında S_{SM} konfisiyentlerine göre UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average Cluster) analizleri yapıldı. S_{SM} -UPGMA (Simple Matching Coefficient) konfisiyent analizlerine göre seçilen mikroorganizmaların oluşturduğu dendogram Şekil 4.20’de gösterildi. Oluşan dendogramda iki ana grup oluştu. Toplam 3 küme oluştu ve bu kümelerden I’inci hariç, ikisi iki izolat içerdi. Dendogram %90 benzerlik oranına göre 2 minor küme ve 1 tane tek üyeli küme oluştu. Tekli üye olan R3 tuzlu su örneklerinden izole edilmiştir. R3 nolu izolat diğer izolatlarla yaklaşık %75 oranında benzerlik göstermiştir. II. Gupta yer alan R2 ve R4 nolu izolatlar %93 benzerlik gösterirken III. Grupta yer alan R1 ve R5 nolu izolatlar %95 benzerlik gösterdi. İzole edilen bakterilerin habitatları R1, R2, R4 ve R5 için aynı olup yapılan testler sonucu oluşan dendogramda %90 üzerinde benzerlik gösterdi. Lokalite bakımından paralellik gösterdiği tespit edildi.

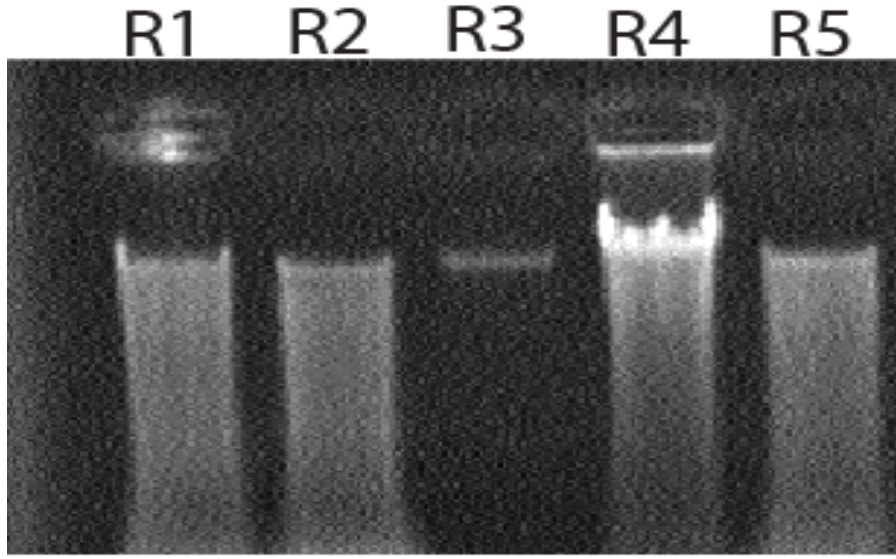


Şekil 4.20. Beş test izolatu için 42 farklı karakter bakımından uygulanan test sonuçlarını 9MVSP 3.2 (Multi-Variate Statistical Package) programı Simple Matching Coefficient ile oluşturulan dendogram .

4.6. RAPD-PCR analizi

Genomik DNA izolasyonu için 5 test izolatu Ausubel ve ark. (1994), tarafından bildirilen metoda göre yapılmıştır.

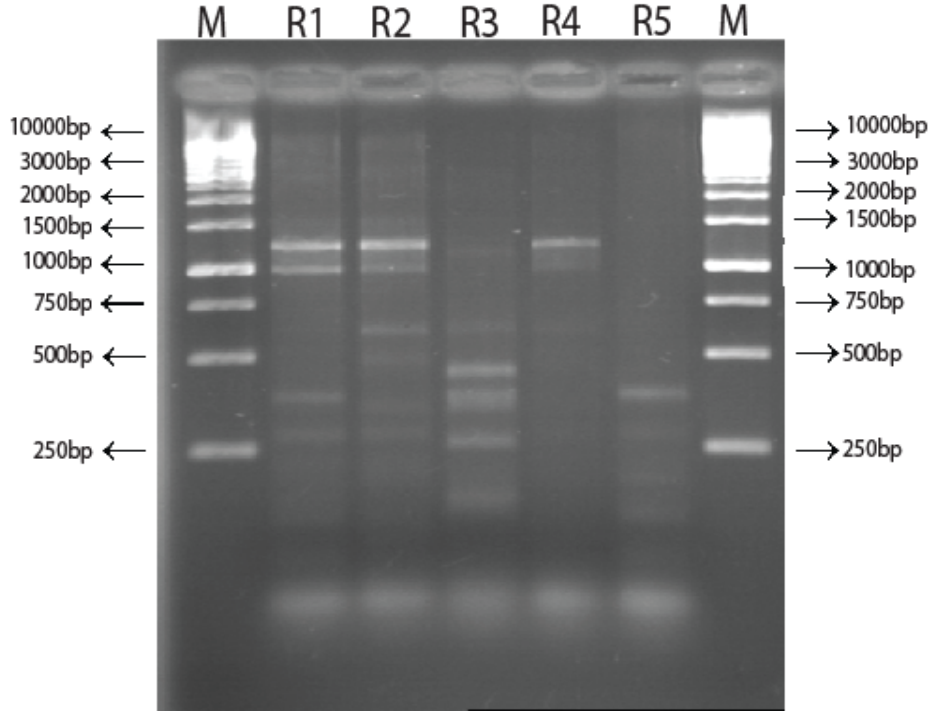
Ekstraksiyonu yapılan DNA'lar agaroz jelde (%1) koşturuldu ve görüntüleri UV transliminatör jel görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı (Şekil 4.20.). DNA miktarları UV spektrofotometrede 260 nm dalga boyundaki absorban değerleri belirlenerek ölçüldü.



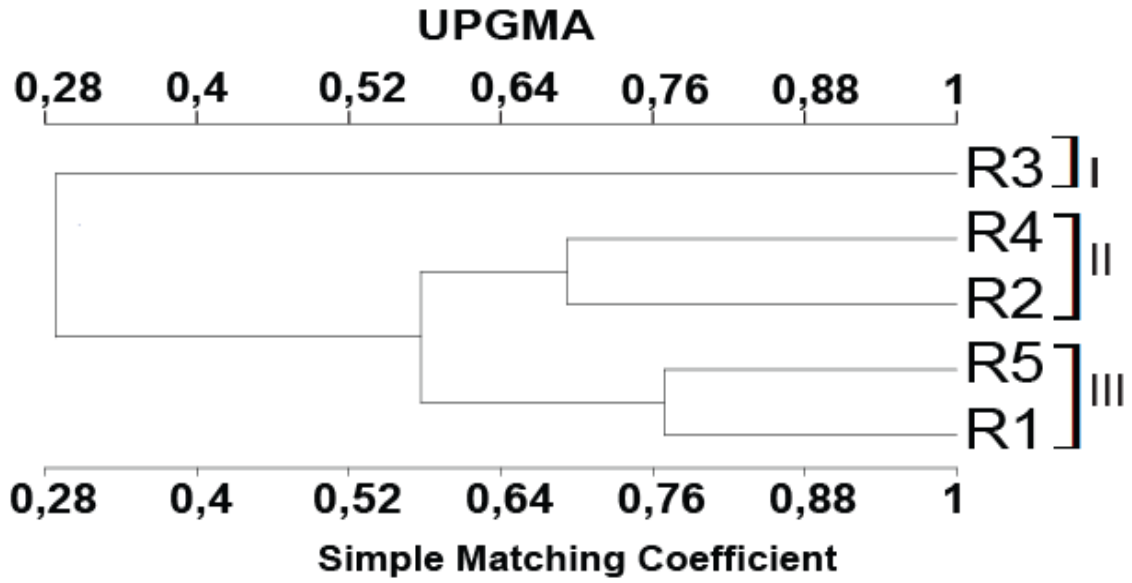
Şekil 4.21. Test izolatlarından ekstrakte edilen genomik DNA izolasyonu görüntüsü.

DNA izolasyonu yapılan 5 test izolatları DAF4 ve M13 primerleri kullanılarak Elmer DNA Thermal Cycler 480'da çoğaltıldı. Primerler DNA üzerinde uyum sağladıkları baz nükleotid aralıklarının çoğaltılmasını sağlarlar (Monciardini ve ark., 2002). Bu nedenle test izolatlarının DNA'larının kısmi amplifikasyonu PCR ile 6 primer ile yapıldı. Primerlerin sayısı arttıkça sonuçlar daha güvenilir olmaktadır. PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde 100 voltta 30 dk yürütüldü. Agaroz jel UV-Translimünatör jel görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı (Şekil 4.22.) PCR ürünleri, %1,5'lik agaroz jele yüklendi ve DNA marker ile 80 voltta 1 saat elektroforez edildi. Agaroz jel görüntüleme sisteminde fotoğraflandı ve kaydedildi.

RAPD-PCR için oluşturulan SSM-UPGMA dendogramının analizi sonucunda iki ana grup oluşmaktadır. 1. Küme tek üyeli diğer iki küme iki test izolatu içermiştir. %70 benzerlik oranına göre test izolatlarını RAPD-PCR sonuçlarının oluşturduğu dendogram analizinde 3 küme oluştu. RAPD-PCR sonuçları Şekil 4.22.'te ve buna ait dendogram Şekil 4.23.'te gösterilmektedir. III. Kümede yer alan R1 ve R5 nolu izolatlar %75 üzerinde benzerlik gösterirken II. Kümede yer alan R2 ve R4 nolu izolatlar % 70 oranında benzerlik göstermiştir. R3 nolu izolat ise diğer gruplarla yaklaşık % 30 benzerlik göstermiştir. Sonuçlar nümerik taksonomik analizlerin oluşturduğu dendogramlarla paralellik göstermiştir.



Şekil:4.22. Test izolatlarının Simple Matching Coefficient ile oluşturulan RAPD- PCR sonuçlarının oluşturduğu jel görüntüsü.



Şekil 4.23. Test izolatlarının Simple Matching Coefficient ile oluşturulan RAPD-PCR sonuçlarının oluşturduğu dendrogram görüntüsü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemizde doğal tuzlu habitatlardan birisi de Tuzlagözü Tuzlası'dır. Tuzlagözü Tuzlası Batman İli'nin, Kozluk İlçesi'nin doğusunda ve Kozluk Merkeze 7Km uzaklıkta bulunmaktadır. Tuzla, Tuzlagözü Köyü sınırları içerisinde. Yörenin tuz ihtiyacının büyük bir bölümü bu tuzladan karşılanmaktadır. Tuz üretimi, tuzlu yeraltı sularının havuzlarda evaporasyonu ile elde edilmektedir (Anonim, 2012).

Halofilik ve halotolerant prokaryotlar doğal ve yapay tuzlu ortamlarda yayılış gösterirler. Tuz gölleri, tuzlalar (güneş tuzu ve kaya tuzu), tuzlu topraklar, denizlere ait lagünler, tuzlanmış deriler, tuzlanmış gıdalar bu mikroorganizmalar için uygun habitatlardır. Canlılar aleminin tümü üzerinde düşünülecek olursa; omurgasız hayvanlar, bitkiler ve funguslar gibi ökaryotik canlılarında içerisinde halofilik veya halotolerant organizmaları temsil eden türler mevcuttur. Halofilik veya halotolerant prokaryotlar bakteriler ve arkebakteriler içerisinde yer alırlar. Ancak Arkebakteriler aşırı halofilik grubu teşkil eder ve Halobacteriaceae familyası içerisinde yer alırlar. Hafif derecede halofil olanlar veya ılımlı halofiller ise bakterilerin çeşitli grupları içerisinde yer alırlar (DasSarma ve Aora, 2001; Javor, 2002; Grant, 2004).

Ülkemizde yerli bilim adamları aşırı miktarda tuz içeren ortamlardan aşırı halofilik mikroorganizmaların izolasyonu ile ilgili çeşitli araştırmalar yapmışlardır. Bu araştırmaların çoğunda aşırı halofilik arkebakteriler çalışılmıştır (Erdoğan ve ark. ,2001; Elevi ve ark. , 2004; Özcan ve ark. , 2006; Birbir ve ark. , 2007; Yaşa ve ark. , 2008).

Doğal tuzlu ortamlardan halofilik bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgili ülkemizdeki araştırmalar oldukça sınırlıdır. Aksöz ve Kolonkaya (1984), Tuz Gölü'nden ılımlı halofilik gruba ait bir bakteriyi izole ettiklerini bildirmişlerdir. Birbir ve Sesal (2003), yine Tuz Gölü'nden izole ettikleri 32 bakteri izolatının tür tanısına gidilmeksizin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini belirlemişlerdir. Hasdemir ve Ögün (2008), Kayseri Tuzla Gölü'nden izole ettikleri izolatların Bacteria içerisinde yer alan *Halomonas* genusuna ait olduğu belirlediler. Altınbayrak ve Ögün (2010), Kağızman tuzlasından *Bacillus licheniformis* ve *Halomonas* sp. İzole ettiklerini bildirmişlerdir. Benzer şekilde; Mutlu ve ark. (2008), Tuz Gölü'nün farklı noktalarından aldıkları örneklerden Archaea türleri ile birlikte, Bacteria içerisinde yer alan

Chromohalobacter, *Cytophaga* sp., *Salinibacter ruber* türlerini izole ettiklerini bildirmişler. Diğer bir araştırma da ise; Poli ve ark. (2009), tarafından İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan toplanan toprak örneklerinden izole edilen *Halomonas* türünün Levan üretimi ile ilgilidir.

Yabancı araştırmacılar tarafından tuzlalardan farklı tarihlerde halofilik *Halomonas* türleri izole edilmiştir. *H. ilicicola*, *H. indalinina*, *H. koreensis*, *H. kribbensis*, *H. taeanensis* türleri farklı araştırmalarda izole edilen türlerdir (Lim ve ark. , 2004. Lee ve ark. , 2005; Cabrera ve ark. , 2007; Jeon ve ark. , 2007; Arenas ve ark. , 2009). Arahal ve ark. (2002), tarafından bildirildiğine göre 2002 yılına kadar tanımlanan *Halomonas* türlerinin sayısı 19 olarak bildirildi. Ancak her yıl bu genusa ait yeni türler bilim dünyasına tanıtılmaktadır. Hatta International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology dergisinde 2010 tarihli; *Halomonas xinjiangensis* yeni tür olarak yayınlandı (Guan ve ark. , 2010).

Bu araştırmada Batman İli, Kozluk İlçesi Tuzlagözü Tuzlasından toplanan tuzlu su ve tuzlu toprak örneklerinden halofilik bakterilerin izolasyonu amaçlandı.

Tuzlagözü Tuzlası ve çevresinden toplanan, tuzlu toprak ve tuzlu su örneklerinin belirlenen pH, Nem Oranı, Toplam Tuz, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, K⁺ ve Mn⁺ iyonu gibi fiziko-kimyasal özellikleri diğer araştırmalarla kıyaslandığında herhangi bir benzerlik görülmedi. Bu farkın habitat farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir (Kalli ve ark. , 2000; Erdoğan ve ark. , 2001; Eleli ve ark. 2004; Hasdemir ve Ögün 2008; Altınbayrak ve Ögün, 2010).

İzolatların iki farklı pigmentasyon gösterdiği belirlendi. Hücre morfolojilerine ve gram boyama özelliklerine göre gram negatif çomak ve gram pozitif basil morfolojiye sahip olduğu belirlendi. Basil morfolojiye sahip izolatın endospora sahip olduğu gözlemlendi.

Seyreltme plaka yöntemi ile yapılan sayımlarda su örneklerindeki halofilik bakteri sayısı 2.6×10^4 kob/ml ve toprak örneklerindeki halofilik bakteri sayısı $3,4 \times 10^3$ kob/gr olarak belirlendi.

İzolatların Nutrient Broth'da üremediği, %2.5-%25Nacl tuzu içeren ortamlarda ürediği belirlendi. Bu izolatların antibiyotiklere duyarlılıkları benzerlik oluşturdu. İzolatların bazılarının üre ve kazeini hidrolize etmesi endüstriyel açıdan önemli olduğu belirlendi. Yine R1 ve R5 izolatının nitratı indirgemesi pozitif olması yönüyle önemli

bulundu. Bu durum tuzlu habitatlarda azot döngüsünün gerçekleştiğinin göstergesidir.

İzolatların toplam 42 fenotipik özelliğine numerik taksonomik analiz sonuçlarına göre üç farklı grup oluşturduğu belirlendi. Genomik DNA izolasyonları yapıldıktan sonra, farklı primerler kullanarak RAPD-PCR ile çoğaltılarak filogenetik dendogramlar oluşturuldu.

RAPD-PCR analizi bakteriler arasındaki ilişkilerin ortaya konulmasında kullanılan PCR-temelli tiplendirme metotlarından birisidir. Bu metot, bakteriler aleminde tür içi ve türler arası benzerliklerin tanımlanmasını kolaylaştıran DNA tipleme metodu olarak birçok çalışmada yer almıştır (Roberts ve Crawford, 2000; Martin ve ark., 2000; Coenye ve ark., 2005). Bizim çalışmamızda kullanılan 5 suş örneği arasındaki benzerlik DAF4 ve M13 evrensel primerleri kullanılarak RAPD-PCR ile incelenmiştir. Yaklaşık 12 farklı DNA bandı mevcut olup çoğunluğunun 200-1500 arası baz çifti içerdikleri belirlenmiştir. DNA bant profilleri analizi sonucu oluşan dendogramda yer alan beş izolat, iki üyeli iki ayrı grup ve tek üyeli bir ayrı grup olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Ayrıca bazı bantların izolatların hepsinde bulunduğu gözlenirken, bazı bantların ise suşa spesifik oldukları tespit edilmiştir. Beklendiği üzere morfolojik ve biyokimyasal karakterler açısından birbirlerine benzeyen test organizmaları aynı DNA bantlarını verirken ortaya çıkan en anlamlı sonuç farklı testlerin analizi sonucu oluşturulan nümerik analiz dendogramı ile RAPD-PCR analizi sonucu ortaya çıkan dendogramın tamamen uygunluk göstermesidir.

Halomonas türlerinin endüstriyel fermentasyon ile polihidroksibütirat olarak bilinen bakteri plastiği, biyoaktif hidrosifenilpirle-dikarboksilik asit, eksopolisakkarit, Levan ve alkalın fosfataz enzimi ürettiği bildirilmiştir. Ayrıca bu genusun üyelerinin Fenol, Katekol ve Technetium bileşiklerini biyolojik olarak parçaladıkları tespit edilmiştir. İlave olarak *Halomonas* türlerinin seralarda patojen mantarlara karşı biyokontrol amaçlı kullanılabileceği tespit edilmiştir. Bizim izole ettiğimiz *Halomonas* türünün de bahsedilen bahsedilen metabolitleri ve keşfedilmeyi bekleyen benzeri metabolitleri sentezleyebilmesi elbette mümkündür (Alva ve ark., 2003; Ishibashi ve ark., 2005; Fujimoto ve Morita, 2006; Mata ve ark., 2006; Wang ve ark., 2006; Kazak ve ark. 2007 Sadfi-Zouaoui ve ark. , 2007; Quillaguaman ve ark., 2008; Poli ve ark., 2009).

Halofilik bakterilerden; saflaştırılan ürünler, mikrobiyal teknoloji çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu yüzden; tuz içeren doğal ortamların korunması için gayret sarf edilmelidir. Bu konunun biyoçeşitlilik açısından oldukça önemli olduğu kanaatindeyiz. Daha sonra yapılacak ayrıntılı çalışmaların amacı araştırılmamış bölgelerdeki birçok yeni türün keşfi biyoteknolojide kullanılabilircek metabolitlerin belirlenmesi olmalıdır.

KAYNAKLAR

- Aino, K., Toshihide, H., Naoki, M., Yoshinobu, M., Taketomo, N., Hidetoshi, F., Yoshimune, K., And Yumoto, I. 2008. *Bacillus Polygoni* Sp. Nov., a moderately halophilic, non-motile obligate alkaliphile isolated from Indigo Balls. *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**: 120-124.
- Aksöz, N., Kolonkaya, N. 1984. Ilımlı tuzcul karakterli bir bakterinin Tuz Gölü'nden (Türkiye) izolasyonu. *Mikrobiyol Bült.*, 18(2): 107-113.
- Alba, I., Torreblance, M., Sanchez, M., Colom, M.F., Mesequer, I., 2001. Isolation of fibrocrystalline body, a structure present in haloarchaeal species, from *Halobacterium salinarum*. *Extremophiles*, (5): 169-175.
- Albuquerque, L., Tiago, I., Taborda, M., Nobre, M. F., Veríssimo, A., Costa, M. S. 2008. *Bacillus isabeliae* Sp. Nov., a halophilic bacterium isolated from a sea salt evaporation pond. *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**: 226–230.
- Altınbayrak, N., Ögün, E., 2010. Kağızman (Kars) Kayatuzu Tuzlası ve Çevresindeki Tuzlu Ortamlardan *Halofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Teşhisi* (yüksek lisans tezi, basılmamış). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Alva, V. A., Peyton, B. M., 2003. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkalophile *Halomonas campisalis*: Influence of ph And Salinity. *Environ Sci Technol Page*, **37**(19): 4397–4402.
- Amoozegar, M. A. , Porro, S. C., Rohban, R., Hajighasemi, M., And Ventosa, A., 2009. *Bacillus persepolensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol*, **59**: 2352 – 2358.
- Anonim, 2007. <http://www.turkcografya.com/modules/AMS/article.php?storyid=12>
- Anonim, 2008a. Tuzun Tanıtılması http://www.maden.org.tr/resimler/ekler/9141aff1412dc76_ek.pdf. Madencilik Cilt: XIII Sayı: 5, Erişim Tarihi: 14.03.2008

- Anonim, 2008b. International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP), Erişim Tarihi: 14.03.2008.
- Anonim, 2010. **Tuz (NaCl) Üretim Yöntemleri** http://www.maden.org.tr/resimler/ekler/019c8091693ef5c_ek.pdf. Erişim Tarihi: 14.05.2010
- Anonim, 2011. http://www.netkayit.com/adres_arabul.php?adres=BATMAN-KOZLUK-KOYLER- Erişim Tarihi: 15.09.2011
- Anton, J. R., Mora, R., Rodriguez -Valera, F., Aman, R., 2000. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3025–3057.
- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R.; Rosselló-Mora, R. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**:485–491.
- Arahal, D. R., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Volcani, B.E., Ventosa, A., 1996. Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from dead sea, determined on the basis of their 16s rRNA squances. *Applied and Environmental Microbiology*, **(62)**10: 3779-3786.
- Arahal, D. R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Ventosa, A., 2002. Phylogeny of the family Halomonadaceae based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 241–249.
- Arahal, D. R., Gutiérrez, M.C., Volcani, B.E., Ventosa, A., 2000. Taxonomic analysis of extremely halophilic archaea isolated from 56-years-old Dead Sea brine samples. *System. Appl. Microbiol*, **23**: 376-385.
- Arahal, D. R., Marquez, M.C., Volcani, B.E., Schleifer, K.H. and Antonio Ventosa, A., 1999 *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**: 521–530
- Aravalli, R. N., She, Q., Garrett, R.A., 1998. Archaea and the new age of microorganisms. *Tree*, **(13)** 5: 190-194.

- Arenas, M., Patricia, I., Bañón, J. L., Patiño, C., Cristina, S. P., Ventosa, A., Soliveri, J., 2009. *Halomonas ilicicola* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol*, **59**: 578-582.
- Argandona, M., Fernandez-Carazo, R., Llamas, I., Martı́nez-Checa, F., Caba, J.M., Quesada, E., Moral A., 2005. The moderately halophilic bacterium *Halomonas maura* is a free-living diazotroph. *FEMS Microbiology Letters*, **244**: 69–74
- Asad, S., Amoozegar, M.A. Pourbabaee, A.A. Sarbolouki, M.N. Dastgheib, S.M.M. 2007. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria . *Bioresource Technology* **98**: 2082–2088
- Asker D., Ohta, Y. 1999 Production of Canthaxanthin by Extremely Halophilic Bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88** (6): 617-621
- Atlas, R. M. 2006. *Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food*. second edition, CRC press, London, 464.
- Avcı, S., 2003. Ekonomik coğrafya açısından önemli bir maden tuz. *Coğrafya Dergisi*, **11**: 21-45.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., and Sherris, J. C. 1966. Antibiotic testing method by standardizing disc method. *AMJ Clin Pathol*, **45**: 493-496.
- Beja O, Aravind L, Koonin E. V, Suzuki M. T, Hadd A, Nguyen L. P, Jovanovich S. B, Gates C. M, Feldman R. A, Spudich J. L, Spudich E. N, DeLong E. F 2000. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, **(289)**15 September: 1092-1906.
- Birbir, M., Cali, B., Mertoglu, B., Bardavid R.E., Oren, A., Ogmen, M. R., Ayeşe Ogan, A., 2007. Extremely halophilic archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldırım and Kayacık Salterns. *World J Microbiol Biotechnol*, **23**: 309–316.
- Birbir, M., Sesal, C., 2003. Extremely halophilic bacterial communities in şerflikoçhisar salt lake in Turkey. *Turk J Biol*, **(27)**: 7-22.
- Bowman, J.P., McCammon, S.A., Rea, S.M., McMeekin, T.A., 2000. The microbial composition of three limnologically disparate hypersaline Antarctic lakes. *FEMS Microbiology Letters*, **(183)**: 81-88.

- Cabrera, A., Aguilera, M., Fuentes, S., Incerti, C., Russell, N. C., Cormenzana, A. R., And Sánchez, M. M., 2007. *Halomonas indalinina* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo De Gata, Almería, Southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**: 376-380.
- Carrasco, I. J, Márquez, M. C, Xue, Y, Ma, Y, Cowan, D. A, Jones, B. E, Grant, W. D, Ventosa, A. (2007) *Bacillus chagannorensis* sp. nov., a moderate halophile from a soda lake in Inner Mongolia, China. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* **57**: 2084-2088.
- Cerritos, R., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Estrella, L. H., Luis, D., Peraza, A., Jackeline, L., Gómez, A., Olmedo, G., Ramirez, E., Janet, L., Siefert, And Valeria, Souza., 2008. *Bacillus coahuilensis* sp. nov. a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in The Cuatro Ciénegas Valley In Coahuila, Mexico. *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**: 919-923.
- Chen, Y. G., Cui, X. L., Li, W. J., Xu, L. H., Wen, M. L., Peng, Q., Jiang, C. L. 2008. *Salinicoccus salitudinis* sp. nov., a new moderately halophilic bacterium isolated from a saline soil sample. *Extremophiles*, **12**: 197-203.
- Chen, Y. G., Zhang, Y. Q., Wang, Y. X., Liu, Z. X., Klenk, H. P., Xiao, H. D., Tang, S. K., Cui, X. L., And Li, W. J., 2009. *Bacillus neizhouensis* sp. nov., a halophilic marine bacterium isolated from a Sea Anemone. *Int J Syst Evol Microbiol*, **59**: 3035-3039.
- Chun, J., Bae, K.S., Moon, E.Y., Jung, S., Lee, H. K., Kim, S., 2000. *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**: 1909–1913.
- Çaklı, Ş., Kışla, D., 2003. Su Ürünlerinde Mikrobiyal Kökenli Bozulmalar ve Önleme Yöntemleri. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, **20** (1-2): 239 – 245.
- Çotuk, A., Anđ Küçüker, M., 1992. *Biyologlar için Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 129 sayfa.
- DasSarma, S. , Arora, P. , 2001. Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9.
- Demirjian, D.C., Moris-Varas, F., Cassidy, C.S., 2001 Enzymes from extremophiles *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**:144–151.

- Demirtaş, M. Osmanlı Devletinde Tuz Üretimi ve Dağıtımı. <http://e-dergi.atauni.edu.tr/index.php/SBED/article/viewFile/73/66>, Erişim Tarihi: 15.09.2011
- Dussault, H.P. 1955. An improved technique for staining red halophilic bacteria, *J. Bacteriol*, **70**: 484–485.
- Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M. & Usami, R. (2005). Endospores of halophilic bacteria of the family Bacillaceae isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline Systems* **1**(8): 1-13.
- Elevi R., Assa, P., Birbir, M., Ogan, A., Oren, A., 2004. Charracterization of Extremely halophilic Archaea Isolated from The Ayvalik Saltern, Turkey. *World Journal of Microbiology & Biotechnolog.*, (20): 719-725
- Erdoğan, H., 2001. *Doğal tuzlu ortamlarda bulunan halofilik bakterilerin izolasyon tekniklerinin araştırılması* (yüksek lisans tezi, basılmamış). Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Ergin, Ö., 1999. Mikro dünya makro dünyayı cüceleştiriyor Arkebakteriler, *Bilim Teknik*, Şubat Sayısı: 72-74.
- Fujimoto, K., Morita, T., 2006. Aerobic removal of technetium by a marine *Halomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol*, **72**: 7922-7924.
- Garabito M. J, Arahall D. R, Mellado E, Marquez M. C, Ventosa A., 1997. *Bacillus Salexigens* Sp. Nov., a new moderately halophilic *Bacillus* species *Int. J. Syst. Bacteriol*, **47**: 735-741.
- Garcia, M.T., Ventosa, A., Mellado, E., 2005. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **54**: 97–109.
- Ghozlan, H., Deif, H., Kandil, R.A, Sabry, S., 2006. Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **52**: 63–72.
- Grant W. D., 2004. Life at low water activity. *Phil Trans R Soc Lond B*, 359:1249-1267.
- Grant, W.D. and Larsen, H., 1984. Extremely halophilic archaeobacteria, order Halobacteriales ord. nov. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*,

- Vol. 3 (Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. and Holt, J.G., Eds.), pp. 2216-2233. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Grant, W.D., Ross, H.N.M., 1986. The ecology and taxonomy of halobacteria, *FEMS Microbiology Letters*, (39)1-2: 9-15.
- Guan T. W, Xiao J, Zhao K, Luo X. X, Zhang X. P, Zhang L. L. *Halomonas Xinjiangensis* sp. nov., 2010. a halotolerant bacterium isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol*, 349 – 352.
- Gunasekaran, P., 2002. *Laboratory Manual in Microbiology*. New Age International Ltd, Ist, 135.
- Guo J, Zhou J, Wang D, Tian C, Wang P, Uddin MS. 2008. A novel moderately halophilic bacterium for decolorizing azo dye under high salt condition. *Biodegradation* 19(1): 15–19.
- Hasdemir, A. Öğün, E., 2008. *Kayseri Tuzla Gölü'nden Halofilik Bakterilerin İzolasyonu ve Teşhisi* (yüksek lisans tezi, basılmamış). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Ihara, K., Watanabe, S., Tamura, T., 1997. *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov. , two new extremely halophilic archaea collected in Argentina. *International Journal of Systematic Bacteriology*, (47)1 : 73-77.
- Ireland, C. M., Aalbersberg, W., Andersen, R. J., Ayril-Kaloustian, S., Berlinck, R. G. S., Bernan, V., Carter, G., Churchill, A. C. L., Clardy, J., **Concepcion, G. P.**, de Silva, E. D., Discafani, C., Fojo, T., Frost, P., Gibson, D., Greenberger, L. M., Greenstein, M., Harper, M. K., Mallon, R., Loganzo, F., Nunes, M., Poruchynsky, M. S., and Zask, A. 2003. Anticancer Agents from Unique Natural Products Sources. *Pharmaceutical Biology*, 41: 15–38
- Ishibashi, M., Yamashita, S., Tokunaga, M., 2005. Characterization Of Halophilic Alkaline Phosphatase From Halomonas Sp. 593, A Moderately Halophilic Bacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1213-1216.
- Jeon, C. O., Lim, J. M., Lee, J. R., Lee, G. S., Park, D. J., Lee, J. C., Oh, H. W., And Kim, J. C., 2007. *Halomonas Kribbensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57: 2194 – 2198.

- Kallı, N., 2000), *Tuz Gölü'nden izole edilen aşırı halofilik bakterilerin izolasyon ve identifikasyon yöntemlerinin geliştirilmesi* (yüksek lisans tezi, basılmamış). Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kamekura, M., Dyall-Smith, 1995. Taxonomy of the family Halobacteriaceae and the description of two new genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* (41): 333–350.
- Karakterizasyonu.** Doktora tezi. YYÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü
- Kazak, H, Gürleyendağ, B, Poli, A, Toksoy Oner, E., Nicolaus B. 2007. Exopolysaccharide production by *Halomonas* strains isolated from Turkey. *13th European Congress on Biotechnology (ECB13)*, 16-19 September 2007, Barcelona, Spain, Journal of Biotechnology 131-163.
- Kokare, C.R., Mahadik, K. R. Kadam, S. S., Chopade, B. A. 2004. Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India Current Science, **86**(4): 593-597.
- Lakshmipathy, D. T., Kannabiran, K. 2009. A morphological, biochemical and biological studies of halophilic *Streptomyces* Sp. isolated from saltpan. Environment *American Journal of Infectious Diseases*, **53**: 200-206.
- Lee, J. C., Jeon, C. O., Lim, J. M., Lee, S. M., Lee, J. M., Song, S. M., Park, D. J., Li, W. J., And Kim, C. J., 2005. *Halomonas taeanensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**: 2027-2032.
- Lim, J. M., Yoon, J. H., Lee, J. C., Jeon, C. O., Park, D. J., Sung, C., Kim, C. J., 2004. *Halomonas koreensis* Sp. nov. a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**: 2037 – 2042.
- Lim, J. M., Jeon, C. O., Song, S.M., Kim, C. J., 2005. *Pontibacillus chungwhensis* gen. Nov., sp. Nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**: 165–170.
- Lizama, C.; Monteoliva-Sanchez, M.; Prado, B.; Ramos-Cormenzana, A.; Weckesser, J.; Campos, V. 2001. Taxonomic Study of Extreme Halophilic Archaea

- Isolated from the “Salar de Atacama”, Chile System. *Appl. Microbiol.* **24**(3): 464-474.
- MacFaddin J. F. 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical bacteria*. 3rd edition. Williams & Wilkins.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology, *Extremophiles*, **(5)**: 73-83.
- Martínez-Cánovas MJ, Béjar V, Martínez-Checa F, Quesada E. 2004. *Halomonas anticariensis* sp. nov., from Fuente de Piedra, a saline-wetland wildfowl reserve in Malaga, southern Spain *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 1329–1332
- Mata JA, Martínez-Cánovas J, Quesada E, Béjar V.2002. A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *Syst. Appl. Microbiol.*, **25**(3):360–375.
- Mata, J. A., Bejar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, Emilia,1997. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Research In Microbiology*, **157**: 827-835.
- Mata, J. A., Bejar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M. C. & Quesada, E. 2006. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis* *Research in Microbiology*, **157**: 827–835.
- McGenity, T.J., Grant, W.D., 1995. Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the Genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov., *System. Appl. Microbiol.* **(18)**: 237-243.
- Mevarech, M., Eisenberg, H., Neumann, E., 2000. Malate Dehydrogenase Isolated from Extremely Halophilic Bacteria of the Dead Sea. 1. Purification and Molecular Characterization. *Biochemistry*, **16** (17): 1977.

- Mudryk, Z., Donderski, W., 1991. Effect of Sodium Chloride on the Metabolic Activity of Halophilic Bacteria Isolated From the Lake. *Gardno Estuary Estuaries* **14**(4): 495-496.
- Mutlu, M. B., García, M. M., Santos F., Peña, A., Guven, K., Antón, J., 2008. Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in inland Turkey. *Ecology*, **65**(3): 3474-483 .
- O’connor E. M., Shand, R. F. 2002. Halocin and sulfobollicins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics, *Journal of Industrial Microbiology***
- O’Leary W. M., 1989. *Practical Handbook of Microbiology*. first edition CRC Press, London, 688 pages
- Oren A, Rodríguez-Valera F., 2001. The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds *FEMS Microbiology Ecology* 36(2-3):123-130.
- Oren, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environment, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **28**: 56-63.
- Oren, A., 2001. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria, *FEMS Microbiology Ecology*, (1313): 1-7.
- Oren, A., 2002 *Halophilic Microorganisms and their Environments (Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology)* Springer; 1 edition, August 31, 600 pages
- Özcan 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):739–746.
- Özdemir, K., 2008. *Lens orientalis (Boiss.) Hand & Mazz. ve Cicer anatolicum Alef. rizosferinden Streptomyces türlerinin izolasyonu, teşhisi ve karakterizasyonu.* (doktora tezi, basılmamış). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Palmisano, M. M., Nakamura, L. K., Duncan, K. E., Istock, C. A. & Cohan, F. M. (2001). *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*,

- isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1671–1679.
- Pappa, A., Porro, C. S., Lazoura, P., Kallimanis, A., Perisynakis, A., Ventosa, A., Drainas, C., Koukkou, A. I., 2009. *Bacillus Halochares* sp. Nov., A Halophilic Bacterium Isolated From Solar Salterns. *Int J Syst Evol Microbiol*, **60**: 1432-1436
- Pasić L, Bartual SG, Ulrich NP, Grabnar M, Velikonja BH., 2005. Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern *FEMS Microbiology Ecology*, **54**: 491–498.
- Poli, A., Kazak, H., Gürleyendağ, B., Tommonaro, G., Pieretti, G., Öner, E, T., Nicolaus B., 2009. High Level Synthesis Of Levan By A Novel *Halomonas* Species Growing On Defined Media. *Carbohydrate Polymers* **78**(4): 651-657.
- Quillaguamán, J., Thuoc, V., Guzmán, H., Guzmán, D., Martín, J., Everest A., And Kaul, R. H., 2008. Poly3-Hydroxybutyrate Production By *Halomonas Boliviana* In Fed-Batch Culture. *Applied Microbiology And Biotechnology* **78**: 227-232.
- Ren P.G, Zhou P.J. 2005. *Tenuibacillus multivorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil in Xin-Jiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 95-99.
- Rodriguez, R.M., Acevedo, A.R., Garriga, J.L., 1997. New isolates extremely halophilic archaeobacteria (Halobacteria) from Puerto Rico and the Caribbean. *Caribbean Journal of Science* **33**(1-2): 98-104.
- Rothschild, L.J. , Mancinelli, R.L. , 2001. Life in extreme environments. *Nature*, (409): 1092-1101.
- Sadfi-Zouaoui, N., Essghaier, B., Hannachi, I., Hajlaoui, M.R. and Boudabous, A., 2007. First Report On The Use Of Moderately Halophilic Bacteria Against Stem Canker Of Greenhouse Tomatoes Caused By *Botrytis Cinerea*. *Annals of Microbiology*, **57**: 337-339.
- Sánchez-Porro C, Martín S, Mellado E, Ventosa A. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, **94**: 295–300.

- Satyanarayana, T., Raghukumar, C., and Shivaji S., 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science* **89**: 78–90.
- Saum, S. H., Müller, V. 2008. Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. *Saline Systems*, **4**(4): 1-15.
- Sokal, R. R. & Michener, C. D., 1958. A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. *Kansas University Science Bulletin*, **38**, 1409-1438.
- Taşman, C. E., 1945. Tuzlarımız. http://www.mta.gov.tr/mta_web/kutuphane/mtadergi/33_5.pdf, Erişim Tarihi: 14.03.2008.
- Tindall B. J. 1992. *The family Halobacteriaceae*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M et al. (eds) *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2nd edn, pp. 768–808. New York: Springer-Verlag.
- Trussell, R., Lenore, S., Clesceri, A., Greenberg, E., 1989. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th edn. APHA-AWWA-WPCF. Baltimore, Maryland: American Public Health Association, Port City Press, ISBN 0–87553161-X.
- Tsu I I, Huang C, Garcia J, Patel BKC, Cayol JL, Baresi L, Mah RA. 1998. Isolation and characterization of *Desulfovibrio senezii* sp. nov., a halotolerant sulfate reducer from a solar saltern and phylogenetic confirmation of *Desulfovibrio fructosovorans* as a new species. *Arch Microbiol*, **170** : 313–317.
- Vargas, C., Jebbar, M., Carrasco, R., C. Blanco, C., Caldero' n, M. I., Iglesias-Guerra, F., Nieto, J. J. 2006. Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 98-107.
- Ventosa A, Nieto J. J., Oren A. 1998. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**(2): 504-544.
- Ventosa, A., 2003. *Halophilic Microorganisms*. Springer; 1 edition, November 13, 349 pages
- Ventosa, A., Márquez, M.C., Garabito, M.J., and Arahal, D.R. 1998. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles*, **2**: 297–304.

- Wang, L., Grobe, T., Stevens. H., Brinkhoff, T., Simon, M., Liang, L., Bitzer, J., Bach, G., Zeeck, A., Tokuda, H., Lang, S., 2006. Bioactive hydroxyphenylpyrrole-dicarboxylic acids from a new marine *Halomonas* Sp. : Production and structure elucidation. *Appl Microbiol Biotechnol*, **72**: 816-822.
- Xiang, W., Guo, J., Feng, W., Huang, M., Chen, H., Zhao, J., Zhang, J., Yang, Z. Sun, Q., 2008. Community of extremely halophilic bacteria in historic Dagong Brine Well in southwestern China. *World J Microbiol Biotechnol*, **24**: 2297-2305
- Yaşa, I., Kahraman, Ö., Tekin, E., Koçyiğit, A., 2008. Çamaltı tuzlasından ekstrem halofilik archaea izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. *E. Ü. Su Ürünleri Dergisi* **252**: 117-121.
- Yoon J. H, Kang K. H, Oh T. K, Park Y. H., 2004. *Halobacillus locisalis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a marine solar saltern of the Yellow Sea in Korea *Extremophiles*, **8**(1): 23–28.
- Yukimura, K., Nakai, R., Shiro Kohshima, S., Jun Uetake, J., Kanda, H., Naganuma, T. 2009. Spore forming halophilic bacteria isolated From Arctic Terrains: implications For Long-Range Transportation of Microorganisms. *Polar Science* **3**: 163-169.
- Yumoto, I., Hirota, K., Goto, T., Nodasaka, Y., And Nakajima, K., 2005. *Bacillus oshimensis* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile alkaliphile. *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**: 907-911.
- Zahran, H. H. 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol Fertil Soils* **25**: 211–223.
- Zhu, D. , Niu, L. , Wang, C., Nagata, S. 2007. Isolation and characterisation of moderately halophilic bacterium *Halomonas ventosae* DL7 synthesizing ectoine as compatible solute. *Annals of Microbiology*, **57**(3): 401-406.
- Zusman T, Rosenshine I, Boehm G, Jaenicke R, Leskiw B, Mevarech M. 1989. Dihydrofolate reductase of the extremely halophilic archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *J Biol Chem*, **264**(32): 18878-18883.

EK 1. BESİYERLERİ

Ek.1.1 Halofil broth

Kullanılan maddeler	Miktarlar
NaCl	200.0gr
KCl	2.0 gr
MgSO ₄ . 7H ₂ O	20.0 gr
tri-Na sitat	3.0 gr
Yeast eksrat	10.0 gr
Kazein hidrolizati	7.5 gr
FeCl ₂ . 4H ₂ O	36.0 mgr
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.36 mgr
Distile su	1000ml
pH	7.2 - 7.4

Ek.1.2. Halofil agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
NaCl	200.0gr
KCl	2.0 gr
MgSO ₄ . 7H ₂ O	20.0 gr
tri-Na sitat	3.0 gr
Yeast Eksrat	10.0 gr
Kazein hidrolizati	7.5 gr
FeCl ₂ . 4H ₂ O	36.0 mgr
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.36 mgr
Distile su	1000ml
Agar	20.0gr
pH	7.2 - 7.4

Ek.1. 3. Halofil jelatin ortamı

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Halofil broth	100ml
Nutrient Jelatin	12gr
pH	6.8

Ek 1. 4. Halofil nişasta agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Nişasta	2gr
Agar	2gr
Halofil Broth	100ml
pH	6.8

Ek 1. 5. SIM Agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Et ekstrati	0.3gr
Pepton	3.0gr
Demir amonyum sülfat	0.02g r
Sodyum Tiyosülfat	0.0025gr
Agar	0.3gr
NaCl	10.8gr
Distile su	100ml

Ek 1. 6. Simmons sitrat agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Magnezyum Sülfat	0.2gr
Amonyum Dihidrojen Fosfat	1.gr
Dipotasyum fosfat	1.gr
Sodyum Sitrat	2gr
Agar	15gr
Brom Timol Mavisı	10.8gr
Distile su	1000ml

Ek 1. 7. Üre broth

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Halofil broth	100ml
Üre	2gr
KH ₂ PO ₄	0.2gr
Fenol red	1.2 mg

Ek 1. 8. Nitrat broth

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
KNO ₃	1gr
Halofil broth	100ml

Ek 1. 9. Karbonhidrat Fermentasyon Ortamı

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Bromtimol mavisı	0.03gr
Halofil Broth	100 ml

EK 2. KULLANILAN ÇÖZELTİ VE BOYALAR

Ek 2. 1. Alfa-naftol çözeltisi

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Alfa-Naftol	0.5gr
%95'lik Etanol	100ml

Ek 2.2. Sülfanilik asit çözeltisi

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Sulfanilik asit	0.8gr
HCl(5N) (%30'luk)	100ml

Ek 2. 3. Lügol çözeltisi

Kullanılan maddeler	Miktarlar
İyot kristalleri	1gr
Potasyum iyodür	2gr
Distile su	300 ml

Ek. 2.4. Kristal viyole boyası

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Kristal Viyole	1gr
Distile su	100ml

Ek. 2.5. Safranin boyası

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Safranin	1gr
Distile su	100ml

Ek. 2.6. Oksidaz ayırıcı

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Oksidaz Ayırıcı	1gr
Distile su	100ml

Ek 2.7.H₂O₂ çözeltisi

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Hidrojen Peroksit	1gr
Distile su	100ml

EK 3. DNA İZOLASYONU İÇİN KULLANILAN TAMPONLAR

Ek 3. 1. Agaroz jel hazırlama

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Agaroz	0.4gr
TBE	40ml
Ethidium Bromid	4µl
1.5 dalga firm	

Ek 3.2 SDS çözeltisi

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
SDS	10gr
Distile su	100ml

Ek 3.3. CTAB+0.7 M NaCl

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

Ek 3.4.Kloroform-izoamilalkol çözeltisi

Kullanılan Maddeler	Oranlar
Kloroform-izoamilalkol	24:1

Ek 3.5. Fenol-kloroform-izoamilalkol

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

Ek 3.6. Loading dye Hazırlama

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

Ek 3.7. TBE Hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Tris HCl	10.78 gr
Borik asit	5,503 gr
EDTA	0,5845 gr
Saf su	1000ml

Ek 3.8. T.E. (Tris-Edta) çözeltisi

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Tris	1,211gr
0.5 M EDTA	4ml

Ek 3.9. 0.5M EDTA

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
EDTA	18,62gr
Saf su	100ml

Ek 3.10.TAE(tris-asetat) çözeltisi

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Tris HCl	4,84 gr
Asetik asit	1, 142 gr
EDTA	2ml

Ek 3.11.Ethidium bromit

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Ethidium Bromid	0,01 gr
Distile su	1ml

Ek 3.12. Elektroforez tankı temizleme solusyonu

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
EDTA	0,372gr
NaOH	0,4 NaOH
Saf su	1000ml

Ek 3.13. RNAaz hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
RNAase	25µl
Stril saf su	1ml

Çizelge 3.1. PCR kokteylinin her bir örnek için gerekli olan madde miktarları

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Deionize su	33,25µl
MgCl ₂	3µl
Dntp	1µl
Sm6F	1µl
Sm5R	1µl
Taq Tamponu	5µl
Taq polimeraz	0,25µl
DNA örneği	5 µl
Toplam	50 µl

ÖZ GEÇMİŞ

1985 yılında Bismil’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Batman’da tamamladı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2007 yılında mezun oldu. Ardından 2008 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2011 yılında itibaren, Batman’da bir özel öğretim kurumunda, biyoloji öğretmeni olarak görev yapmaktadır.