FARKLI KAYA TUZU ÖRNEKLERİNDE PROKARYOTİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Ozan SAVAŞAN

Eskişehir, 2017

FARKLI KAYA TUZU ÖRNEKLERİNDE PROKARYOTİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Ozan SAVAŞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Mayıs, 2017

Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1602F073 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ozan Savaşan'ın **"Farklı Kaya Tuzu Örneklerinde Prokaryotik Çeşitliliğin Belirlenmesi"** başlıklı tezi 25/5/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, **Biyoloji** Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Ünvanı-Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Kıymet GÜVEN	
Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇABUK	
Üye : Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU	

Prof. Dr. Nedim DEĞİRMENCİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

FARKLI KAYA TUZU ÖRNEKLERİNDE PROKARYOTİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Ozan SAVAŞAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mayıs, 2017

Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Bu çalışmada, Çankırı, Nevşehir, Kırşehir, Yozgat, Erzurum, Kars illerine ait kaya tuzu maden ocaklarından elde edilen kaya tuzlarındaki, kültüre edilebilir prokaryotik çeşitliliğin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Kaya tuzu örneklerinden, farklı besiyerleri kullanılarak, 16 adet halofilik prokaryotik izolat elde edilmiştir. Bunlardan 11'inin DNA'sı izole edilmiş ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile *Archaea* ve *Bacteria* domain ayrımı yapılmıştır. 3 izolatın *Archaea*, 8 izolatın ise *Bacteria* domain'lerine ait olduğu belirlenmiştir. 16S rDNA analizi ile *Archaea* domain'ine ait izolatların *Halobacterium* cinsine ait olduğu, *Bacteria* domain'ine ait izolatların ise *Oceanobacillus* sp. ve *Oceanobacillus iheyensis* oldukları tespit edilmiştir. Örneklerdeki mikrobiyal komünite, Fluoresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi ve DAPI boyama yöntemleri incelenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Halofilik Archaea/Bacteria, PZR, FISH, DAPI.

ABSTRACT

DETERMINATION OF PROKARYOTIC DIVERSITY IN DIFFERENT SALT DEPOSIT SAMPLES

Ozan SAVAŞAN

Department of Biology

Anadolu University, Graduate School of Sciences, May, 2017

Supervisor: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

In this study, salt deposit samples obtained from salt mines in Çankırı, Nevşehir, Kırşehir, Yozgat, Erzurum, Kars provinces, were analyzed for determination cultivable prokaryotic diversity. 16 halophilic prokaryotic isolates have been collected from these salt deposits, by using different media. DNA have been extracted from 11 of the isolates and by using the Polymerase Chain Reaction (PCR), *Archaea* and *Bacteria* domain were differantiated. 3 of the isolates were determined as *Archaea* while the other 8 isolate were determined as *Bacteria* domain. The 16S rDNA analyses has shown that *Archaea* members were in *Halobacterium* genus, while the *Bacteria* members were belong to *Oceanobacillus* sp. and *Oceanobacillus iheyensis*. Microbial community of the samples have been investigated by fluorescent in situ hybridization (FISH) and DAPI staining techniques.

Keywords: Halophilic Archaea/Bacteria, PCR, FISH, DAPI.

TEŞEKKÜR

Bana gerek akademik, gerek özel hayatımda her zaman yol gösteren, beni halofillerin gizemli dünyasına sürükleyen ve çalışmam sırasında her türlü bilgi ve tecrübesi ile yardımcı olan hocam Prof. Dr. Kıymet Güven'e,

Bana temel mikrobiyoloji pratiğini kazandıran, yeri geldiğinde elimden tutup bana gösteren, ihtiyacım olduğunda da engin bilgisiyle her zaman kendisine ulaşabildiğim hocam Doç. Dr. Mehmet Burçin Mutlu'ya,

Çalışmam sırasında, hem manevi, hem fiziksel destek olan, bazen ne kadar üzgün olursam olayım yüzüme her zaman bir gülümseme koyabilen, laboratuvar partnerim Kübra Erçalışkan'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan tüm laboratuvar arkadaşlarıma, özellikle Ece Albayrak ve Arş. Gör. Nilgün Poyraz'a,

Son olarak; her zaman varlığını yanımda hissettiren anneme, bir insanın sahip olabileceği en iyi baba olan babama, bir anne yarısından daha fazlası olan teyzeme, ve diğer tüm sevgili aileme, yıllar boyu verdikleri; sevgi, maddi-manevi destek ve cesaret için çok teşekkür ederim.

Ozan Savaşan

Mayıs-2017

25/5/2017

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan "bilimsel intihal tespit programı"yla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal içermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Ozan Savaşan

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI ..... **i**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ..... **ii**

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT ..... **iv**

TEŞEKKÜR ..... **v**

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **x**

GÖRSELLER DİZİNİ ..... **xi**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Halofilik Prokaryotlar 2

1.1.1. Halofilik *Archea* 4

1.1.2. Halofilik *Bacteria* 5

1.1.3. Fizyolojileri 7

1.1.3.1. "Salt-in" stratejisi 8

1.1.3.2. "Compatible solute" stratejisi 8

1.1.4. Morfolojileri 9

1.2. Hipersalin Çevreler 9

1.2.1. "Thalassohalin" çevreler 9

1.2.2. "Athalassohalin" çevreler 9

1.3. Kaya Tuzları ve Prokaryotik Yaşam 10

1.3.1. Türkiye'de kaya tuzları ve kaya tuzu yatakları 11

1.3.1.1. Kuzeydoğu Anadolu yatakları 11

1.3.1.2. Orta Anadolu yatakları 12

1.4. Mikrobiyal Çeşitlilik Yöntemleri 12

1.4.1. Klasik yöntemler 12

1.4.1.1. Mikroskobik yöntemler 13

1.4.1.2. Serolojik yöntemler 13

1.4.1.3. Tek enzim testleri 13

1.4.2. Modern (moleküler) yöntemler 14

1.4.2.1. DNA parmak izi (DNA fingerprinting) 14

1.4.2.2. DNA-DNA hibridizasyonu 14

1.4.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction) (PZR/PCR) 15

1.4.2.4. Ribotiplendirme 16

1.5. Filogenetik Marker Olarak rRNA 17

2. MATERYAL VE METOD 18

2.1. Materyal 18

2.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri 18

2.1.1.1. Medyum A 18

2.1.1.2. Medyum B 18

2.1.1.3. Medyum C 19

2.1.1.4. Medyum D 19

2.1.1.5. Medyum E 19

2.1.1.6. %18 MGM (Modifiye Geliştirme Medium) 20

2.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler 20

2.1.2.1. %30'luk tuzlu su çözeltisi 20

2.1.2.2. %20 deniz suyu (SW) 21

2.1.2.3. %25 deniz suyu (SW) 21

2.1.2.4. TAE 50X (1 litre için) 21

2.1.2.5. TBE 5X (1 litre için)..... 22

2.1.2.6. PBS 10X 22

2.2. Metod..... 22

2.2.1. Örneklerin eldesi..... 22

2.2.2. İzolatların eldesi..... 23

2.2.3. DNA izolasyonu..... 24

2.2.4. PCR ile *Archaea/Bacteria* ayrımı..... 24

2.2.5. ARDRA (Amplifiye edilmiş ribozomal DNA'nın restriksiyon analizi) 25

2.2.6. 16S rRNA gen bölgelerinin dizi analizleri..... 25

2.2.7. FISH (Fluoresan in situ hibridizasyon) 26

2.2.7.1. Fiksasyon 26

2.2.7.2. Hibridizasyon 26

2.2.8. DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol, dihidroklorür) ile boyama 27

3. BULGULAR..... 28

3.1. İzolatların Eldesi 28

3.2. DNA izolasyonu ve PCR ile *Archaea/Bacteria* ayrımı..... 29

3.3. ARDRA 33

3.4. DNA Dizilime Analizleri..... 34

3.5. FISH ve DAPI..... 35

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR..... 37

KAYNAKÇA..... 45

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Kuschhner'in sınıflandırması 3

Tablo 1.2. Türkiye'de Kaya Tuzu Rezervleri (Milyon ton olarak) 11

Tablo 2.1. Çalışmada PCR için kullanılan primerler ve özellikleri 25

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan PCR döngüsü için kullanılan basamaklar ve koşulları 25

Tablo 2.3. Çalışmada FISH deneyi için kullanılan problar ve özellikleri..... 27

Tablo 3.1. Besiyerlerine konulan kaya tuzu örneklerine ait üreme gözlenen erlenler... 28

Tablo 3.2. Çalışmada elde edilen izolatlara ait DNA'lar ve PCR reaksiyonunda verdikleri bantlara göre ait oldukları domainler 30

Tablo 3.3. İzolatların gen bankasındaki en yakın karşılığı ve eşleşen baz sayıları..... 35

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 1.1. rDNA gen dizilimlerine göre oluşturulmuş "yaşamın evrimsel ağacı" ve halofilik organizmaların ağaç üzerinde gösterimi..... 2

Görsel 2.1. Çalışmada kullanılan kaya tuzu örnekleri 23

Görsel 3.1. Çalışmada üreme gözlenen erlenlere örnek..... 28

Görsel 3.2. DNA ekstrasyonu sonrası %1'lik agaroz jelde yürütülen prokaryotik genomik parçalar..... 31

Görsel 3.3. DNA template'leri ve bakteriyal primerleriyle amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmüş görüntüsü (16S amplifikasyon ürünleri)..... 32

Görsel 3.4. DNA template'leri ve arkeal primerleriyle amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmüş görüntüsü (16S amplifikasyon ürünleri)..... 32

Görsel 3.5. Amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin *Mbo I* enzimi ile kesildikten sonra %2'lik agaroz jelde yürütülmüş görüntüsü..... 33

Görsel 3.6. Amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin *Hinf I* enzimi ile kesildikten sonra %2'lik agaroz jelde yürütülmüş görüntüsü..... 34

Görsel 3.7. Nevşehir örneğinin DAPI ile boyanmış floresan mikroskop görüntüsü 36

Görsel 3.8. Nevşehir örneğinin DAPI ile boyanmış başka bir görüntüsü..... 36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

% : Yüzde

˚C : Celsius

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre

ALL : Akut Lenfoblastik Lösemi

ARDRA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Amplifiye edilmiş ribozomal DNA'nın restriksiyon analizi)

A-T : Adenin-Timin

bp : Base pair (baz çifti)

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (4',6'-diamidino-2-fenilindol, dihidroklorür)

DDH : DNA-DNA hibridizasyonu

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi)

DNA : Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribo Nükleik Asit)

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid (Etilendiamin tetraasetik asit)

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization (Fluoresan in situ hibridizasyon)

g/l : Gram/litre

g : Gram

g : Gravity (yer çekimi)

kb : Kilobases (Kilobaz)

LAP **:** Lösin aminopeptidaz

M **:** Molarite

MGM **:** Modified Growth Medium (Modifiye Geliştirme Medium)

ml **:** Mililitre

MQ **:** Milli-Q

ng **:** Nanogram

PBS **:** Phosphate Buffered Saline

PCR **:** Polymerase Chain Reaction

pH **:** Power of Hydrogen

PZR **:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

rDNA **:** Ribosomal Deoxyribonucleic acid (Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit)

rpm **:** Revolutions Per Minute (dakikadaki devir sayısı)

rRNA **:** Ribosomal Ribonucleic Acid (Ribo Nükleik Asit)

SW **:** Sea Water (Deniz Suyu)

TAE **:** Tris-acetate-EDTA (Tris Asetik asit EDTA)

TBE **:** Tris-borate-EDTA (Tris Borik asit EDTA)

u **:** Unit (ünite)

UV **:** Ultraviyole

β **:** Beta

1. GİRİŞ

Tuz, dünyadaki tüm yaşam formları için gerekli olup, aşırı tuz; genel bir stres durumu anlamına gelebilir. Halofiller ise yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan organizmalara verilen isimdir. Kelime adını Yunancadan alır ve "tuz sever" anlamını taşır.

Halofiller, ekstromofil organizmalar adı verilen ve ekstrem koşullarda yaşayan canlıların bir alt grubudur. Okyanus suyundan 5 kat daha fazla tuzlu olan ortamlarda bulunabilirler. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Büyük Tuz Gölü (Utah) ve İsrail, Ürdün ve Filistin'e kıyısı olan Lut Gölü bu ortamlara örnek verilebilir.

Halofillerin modern kullanımları arasında; insan tüketimi için, yeşil alg olan *Dunaliella* türlerinden elde edilen doğal besin takviyeleri, β-karoten, vitaminler ve diğer bileşikler, *Halobacterium* türlerine ait bakteriyorodopsin içeren mor membranlar, biyosensör uygulamalarında kullanılan, 2 boyutlu filmlerin üretiminde kullanılırlar. Halofillerin compatible solute'ları özellikle kozmetik ve gıda endüstrilerinde, nemlendirici ve koruyucu özellikleri ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Sayılır öteki bir çok uygulama alanında da; kimyasal, çevresel, biyoyakıt, farmasötik ve sağlık gibi branşlarda da yakın gelecekte rol oynamaları mümkündür.

Mars'ta tuz bol bir şekilde bulunmaktadır ve bu yüzden, varsa olan mevcut suyun veya geçmişte olan suyun hipersalin olması beklenilmektedir. Eğer Mars'ta yaşam varsa veya olduysa, bu yaşamın temelinin tuza ihtiyaç duyan veya tuza tolere edebilen mikroorganizmalar üzerine kurulduğu tahminini yapmak cazip olmaktadır (Oren, 2014, s. 2).

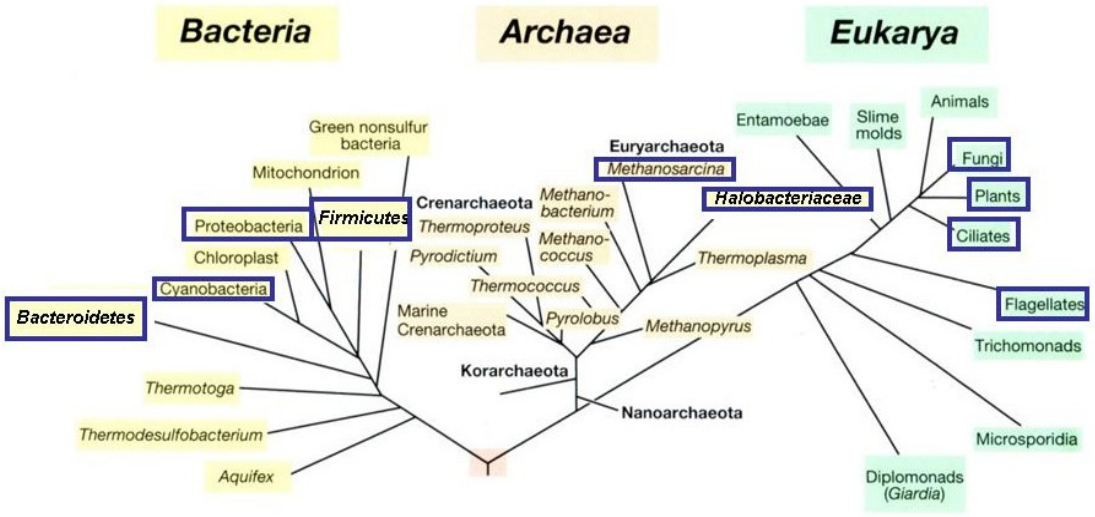
Halofiller çok fazla sayıda çevresel stresse karşı tolerasyon gösterebildikleri için, Mars'ta veya diğer gezegenlerde hayatta kalabilmeleri mümkün olabilir. Gezegenler arası yolculuğu, örneğin; bir tuz kristali ile çevrililerse (böylece zararlı radyasyondan korunarak) atlatmaları da mümkündür. Avrupa Uzay Ajansı (ESA), *Haloarcula* strain G'yi, koruma olmaksızın uzaya göndermiş ve örnek birkaç hafta hayatta kalarak, kendinden önce gönderilen vejetatif örneklerin uzayda hayatta kalma sürelerini geride bırakmıştır (DasSarma, 2006, s. 125-126).

Halofilik mikroorganizmalar; gerek, modern biyoteknolojik kullanımları ve keşfedilmesi gereken diğer potansiyel kullanımları açısından, gerek bilinen yaşamı ve ekstraterrestrial yaşamı daha anlayabilmemiz için önem taşımaktadır. Bu nedenlerle bu organizmaların tanımlanması önemlidir.

Bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden elde edilen kaya tuzu örneklerine ait prokaryotik çeşitliliği ortaya çıkarmak amacıyla, kültür edilebilir prokaryotlar saflaştırılmış, moleküler identifikasyon yöntemleri kullanılmıştır.

1.1. Halofilik Prokaryotlar

Halofilik mikroorganizmalar canlılığın üç domain'i içerisinde bulunabilirler: *Archea, Bacteria* ve *Eucarya* (Ma vd., 2010, s. 6971). Halofiller; tuz konsantrasyonu, ortalama deniz suyundan fazla olan konsantrasyonlarda (0,6M NaCl>) optimal olarak gelişen organizmalardır. Genelde Kushner'in sınıflandırmasına göre sınıflandırırlar. Bu sınıflandırmaya Tablo 1.1.'de gösterilmiştir.



Görsel 1.1. *rDNA gen dizilimlerine göre oluşturulmuş "yaşamın evrimsel ağacı" ve halofilik organizmaların ağaç üzerinde gösterimi (Oren, 2008, s. 3)*

Tablo 1.1. *Kuschhner'in sınıflandırması*

Gruplar	**Tuz Konsantrasyonu**
Halofilik olmayanlar	0-0,2 M NaCl konsantrasyonunda yaşayanlar.
Az halofiller	0,2-0,5 M NaCl konsantrasyonunda yaşayanlar.
Ilımlı halofiller	0,5-2,5 M NaCl konsantrasyonunda yaşayanlar.
Ekstreme yakın halofiller	1,5-4 M NaCl konsantrasyonunda yaşayanlar.
Ekstrem halofiller	2,5-5,2 M NaCl konsantrasyonunda yaşayanlar.
*Halotolerantlar	Halofil olmayıp, tuza tolere edebilenler; eğer büyüme aralığı 2,5 M NaCl konsantrasyonunu geçerse ekstrem halotolerant olarak kabul edilebilirler.

Kaynak: The Prokaryotes: Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry, 2006, s. 265

Halofiller genel olarak, tuz konsantrasyonu 1 ile 2,6 M arasında değişebilen, tuz göllerinden, deniz tuzlalarından, evaporit gölcüklerden izole edilmektedirler. Tuzlu topraklar bunlara kıyasla daha az incelenmiştir, genel olarak total tuzluluk oranları 1,7 ile 3,4 M arasında belirlenmiştir (Bertoldo ve Antranikian, 2009, s. 191).

Halofiller çevrelerindeki osmotik basınçla denge kurabilme ve tuzun denatüre edici etkisine karşın korunma yeteneklerine sahiptirler. Bu prokaryotik organizmaların, evrimsel ağaçtaki temel bir grup değil de, daha geleneksel bakteri formlarının evrimsel adaptasyonları sonucu ortaya çıktıkları düşünülmektedir (Kanekar vd., 2012, s. 2).

Tipik olarak 2 adaptif strateji edinmişlerdir; çevre ile osmotik basıncın dengelenmesi için yüksek hücre içi tuz konsantrasyonun biriktirilmesi (genelde K^+), ve yüksek konsantrasyonda çeşitli organik osmotik solütlerin biriktirilmesi (halofilik ve halotolerant organizmalar) (Kunte, 2007, s. 155).

Günümüzde hipersalin çevrelerde kabul edilen komünite model yapısı, çok yüksek tuz konsantrasyonlarında; kare şekilli arkea *Haloquadratum walsybi*, Bacteroidetes filumundan *Salinobacter ruber* ve nanohaloarchea dominant iken, orta dereceli tuz konsantrasyonlu habitatlarda daha fazla arkeal ve bakteriyel taksa gözlenmektedir (Ventosa vd., 2015, s. 80).

1.1.1. Halofilik *Archea*

Halofilik *archeabacteria* (*haloarchea*), doğal tuzlu sular, Lut gölü, alkali tuz gölleri ve solar tuzlalar gibi, tuzun neredeyse doyma noktasına ulaştığı ortamlarda gelişirler. Hücre içleri, ozmotik dengenin korunması için, molar konsantrasyonlarda K^+ ve Cl^- bulundururlar. Enzimleri ve diğer proteinlerin işlev görebilmesi ve/veya yapılarının korunabilmesi için yüksek tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyarlar (Oren, 2002a, s. 81). Doymuş tuz konsantrasyonlarında (5 M ve üstü) ortamlarda yaşayabilirler ve uzun süre tuz kristalleri içerisinde hayatta kalabilirler (McGenity vd., 2000, s. 248).

Archaea domain'inde halofilik mikroorganizmalar 3 familyaya ayrılırlar: *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* ve *Methanosarcinaceae*. Bu tüm gruplar *Euryarchaeota* filumunun altındadırlar. *Halobacteriaceae* familyası içerisindeki cinsler: *Natrialba*, *Natronorubrum*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Halococcus*, *Halobacterium*, *Natromonas*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halobaculum*, *Halorubrum* türlerinden oluşmaktadır (Oren, 2002c, s. 25).

Halofilik arkeler, en uygun 2-5 M arası hipersalin çevrelerde, genelde aerobik şartlar altında, normal atmosfer basıncı ve sıcaklığında ürerler. Özel ekipman gerektiren diğer arkelerin aksine, herhangi bir mikrobiyoloji laboratuvarında, standart besiyerlerinin tuz ile desteklenmesiyle, çoğaltılabilirler (Berquist, Müller ve DasSarma, 2006, s. 649).

Düşük tuzluluk oranı; hücre duvarının stabil durumunu, protein stabil durumunu ve fonksiyonunu etkiler ve hücre lizisine neden olabilir. Tuz dilüsyonu özellikle basil ve pleomorfik forma sahip olan ve aynı zamanda hücre duvarı glikoprotein yapıda olan hücreleri çok etkilerken, kok forumda ve polisakkarit hücre duvarı yapısına sahip olanlar, tuz dilüsyonundan sonra yapılarını tekrar eski haline düzeltebilirler (Juez, 2004, s. 244).

Günümüze kadar incelenmiş olan haloarkelerde ester bağlı fosfogliseritler; fosfatidil gliserol ve fosfatidil gliserol fosfat metil ester her zaman mevcut olup, çoğu strain fosfatidil gliserol sülfat ve bir veya daha fazla sülfat veya sülfatlı glikolipit içerir; çoğu gliserol eter lipitleri C20C20 (difitanil) izoprenoit içerirken, bazı strainlerde; özellikle haloalkalifillerde C20C25 (fitanil-sesterterpanil) veya C25C25 (di-sesterterpanil) izoprenoit zincirler içerir. Polar lipit kompozisyonuna bağlı olarak yapılan

halobakteriyel sınıflandırma ile, 16S rRNA gen dizilimine bağlı yapılan sınıflandırmanın olağanüstü bir şekilde tutarlılık gösterdiği kanıtlanmıştır. *Halobacteria* (Haloarkeler) monofiletik bir grup olup, kendisine en yakın olan uzak akrabası ile 16S rRNA açısından %83,2'lik bir benzerlik göstermektedir. En yakın akrabaları olan başka bir arkeal grup olan Metanojenler ile, 16S rRNA açısından %80'den az benzerlik göstermektedirler (Aljohny, 2015, s. 2063).

'Ekstrem halofiller gerçekten "bakteri" mi?' sorusunun cevabı Magrum ve diğerleri tarafından (1978) negatif olarak yanıtlanmış ve 1970'lerin sonuna doğru *Halobacterium salinarum* ve yakın halofil akrabaları, yeni tanımlanan *Archea* domain'ine taşınmıştır (Oren, 2002c, s. 26). Halofilik arke familyası *Halobacteriaceae* 47 genera ve 165 tür içermektedir. (Oren, 2014, s. 825).

Arkeler içerisinde en çok tuza ihtiyacı bulunan organizmalar *Halobacteria* sınıfında bulunur; *Halobacterium* ve yakın akrabaları, büyümek ve yapısal stabiliteyi sağlayabilmek için litrede 100-150 gramdan fazla tuza ihtiyaç duyar (Oren, 2008, s. 1).

Halofilik Arke (*Haloarchaea)* üyeleri dünya çapında, çok eski jeolojik kaya tuzları içerisinde bulunmuştur. Bu kaya tuzları içinde Pliyosen'den (5,3-1,8 milyon yıl) Silüryen'e (419 milyon yıl) örnekler bulunmuştur (Stan-Lotter ve Fendrihan, 2015, s. 1488).

Hipersalin çevrelerde *Halobacteriales* üyelerinin oluşturduğu yoğun komüniteler, çıplak gözle bakıldığında, parlak kırmızı, turuncu veya mor renklenmelerini fark ettirebilir, çünkü grubun çoğu temsilcisi bu şekilde gelişebilir. Büyük Tuz Gölü (Utah), Lut Gölü (İsrail) ve hipersalin bir alkali göl olan Magadi Gölü'nde (Kenya) kırmızı renk tonlarının gözlemlendiği bildirilmiştir (Oren, 2006, s. 148).

1.1.2. Halofilik *Bacteria*

Eski yıllarda, hipersalin mikrobiyolojik çalışmalarında, halofilik bakteriler çok geniş yelpazeye sahip çevrelerde bulunabilmelerine rağmen (tuz gölleri, çöl ve hipersalin topraklar, tuzlu gıdalar gibi) çoğu zaman halofilik arkelerin gölgesinde kalmışlardır (Ventosa, Nieto ve Oren, 1998, s. 505). Gene önceki yıllarda litresinde 200-250 g tuz bulunduran hipersalin çevrelerin halofilik arkelerin habitatları olduğu

düşünülmekteyken, bu çevrelerde çok çeşitli halofilik veya halotolerant bakterilerin de bulunduğu ortaya konulmuştur (Oren, 2011, s. 313).

İlk tanımlanan halofilik fermantatif bakteriyal tür *Halanaerobium praevalens,* Büyük Tuz Gölü'ndeki tortulardan 1983'te izole edilmiş ve *Bacteroidaceae* familyasına belli bir cinse ait olmadan yerleştirilmiştir. Daha sonra 1984'te Lut Gölü'nün tortularından izole eden *Halobacteroides halobius* ile birlikte, iki tür arasındaki 16S rRNA dizilim benzerlikleri bu iki halofilik fermantatif bakteriyi yeni bir familyaya taşımış ve familyaya da *Haloanaerobiaceae* denilmiştir. Daha önceden 1983'te Lut Gölü tortularından izole edilip karakterize edilmiş *Clostridium lortetii,* 1987'de *Haloanaerobiaceae* familyasına 3. cins olarak eklenmiş ve ismi *Sporohalobacter lortetii* olarak değiştirilmiştir (Aljohny, 2015, s. 2062).

İlk pigmentsiz halotolerant bakterinin referansı LeFevre ve Round tarafından 1919'da fermente salatalık salamurası çalışmaları sırasında yapılmıştır. İzole edilen bir bakteri grubu 0 ile %15 arasında tuzlulukta ürerken, çalışılan diğer bakteriler %5 ile %25 tuzluluk oranı arasında üremişlerdir (Ventosa, Nieto ve Oren, 1998, s. 505).

50-100 g/l'de gelişebilen çoğu ılımlı halofil aynı zamanda daha yüksek konsantrasyonlarda, hatta daha düşük konsantrasyonlarda bulunabilmektedirler. Bu halofilik bakterilerin arasında Cyanobacteria üyeleri, Proteobacteria'nın değişik kollarından; Gammaproteobacteria'ya ait aerobik heterotroflar ve anoksijenik fototroflar, Deltaproteobacteria'ya ait sülfat redükte eden anaeroblar, çeşitli Firmicutes türleri, Actinobacteria türleri, Spirochaetes'ler ve Bacteroidetes üyeleri bulunmaktadır (Oren, 2008, s. 1).

Ilımlı halofiller heterojenik mikroorganizmalardan oluşmuş bir grup olup, *Halomonas, Salinivibrio, Chromohalobacter* gibi farklı cinsten türler içerirler. Bu türler ekolojileri, fizyolojileri, biyokimyaları ve genetiklerinden ötürü çok çalışılmıştır. Ancak biyoteknolojik potansiyelleri geniş bir yelpazede ortaya konulmamıştır (Sánchez-Porro vd., 2003, s. 295-296).

2010 yılında yeni keşfedilmiş bir bakteri olan *Halomonas stenophila* strain B100'ün ürettiği bir heteropolisakkarit sülfatlanarak, akut lenfoblastik lösemi'den (ALL) türemiş T hücreleri üzerine uygulanmış ve antitümöral aktivite gözlemlenmiştir. Sülfatlanmış

ekzopolisakkarite karşı birincil T hücreleri apoptosise karşı direnç gösterirken, tümör hücreler apoptosise karşı duyarlılık göstermiştir. Ancak ALL hastalarından yeni izole edilmiş tüm birincil T hücreleri de sülfatlanmış ekzopolisakkarite duyarlılık göstermişlerdir (Ruiz-Ruiz vd., 2011, s. 345).

2002'de Antón ve diğerleri tarafından, İspanya'dan izole edilen *Salinibacter ruber*, kırmızı pigmentli ekstrem halofilik bir bakteri olup, %15 tuzluluktan aşağı konsantrasyonlarda üreyemeyen ve genel olarak %20-30 arası üreyebilen bir türdür. Türü ilginç kılan durum bu gibi ekstrem koşullarda yaşam süren bireylerin aslında *Bacteria* domain'inden çok *Archea* domain'ine ait bireylerine ait olmasıdır. Fizyolojilerine bakıldığında ise *Archea* familyasına ait *Halobacteriacea* üyelerinin fizyolojilerine benzemesi dikkat çekmiştir. Hem bu gruba ait bireyler, hem de *Salinibacter ruber* yüksek hücre içi K^+ konsantrasyonuna sahiptir. Türün o tarihe kadar, daha önce izole edildiğini ancak koloni morfolojileri ve yavaş büyüme hızlarından ötürü *Archea* üyeleri olduğu düşünülerek, izole edilmekten kurtulduğu düşünülmüştür.

1.1.3. Fizyolojileri

Bakterinin, tuzluluğa dayanıklık derecesi, hem besiyerinin içeriğine hem de büyüme sıcaklığına bağlıdır (Ventosa, Nieto ve Oren, 1998, s. 505). Ozmotik stres de aynı zamanda bir kısıtlayıcı bir çevresel faktör olup, tuzlar veya iyonik olmayan solüsyonların (şekerli bitki özsuları, bal gibi) neden olduğu, medyum içersinde su kaybına neden olan bileşiklerdir (Galinski, 1995, s. 274).

Tüm *Haloarchea* üyeleri ya aerob ya da fakültatif anaerobturlar ve laboratuvar medyumlarında üremeleri uzun süreler gerektirmektedir (Dyall-Smith, 2009, s. 7).

Biyolojik membranlar suya geçirgen olduğu için, yüksek tuzlulukta yaşayan tüm mikroorganizmalar kendi sitoplazmalarını en azından ortamla izoozmotik şekilde tutmak zorundadırlar. Hatta turgor basıncı da söz konusu sitoplazma hiperosmotik olmalıdır. Optimal büyümesi için 0,5 M'dan fazla tuza ihtiyaç duyan halofillerin, yüksek ozmotik stresle başa çıkabilmeleri için iki farklı basit mekanizma geliştirmişlerdir (Oren, 2002a, s. 81).

1.1.3.1. "Salt-in" stratejisi

Salt-in stratejisi ilk defa *Halobacteria*'da bulunmuştur ve tipik arkeal ozmoadaptasyon mekanizması olarak kabul edilmektedir. Bulundukları haloarkeal çevrenin, tipik olarak ortamda yüksek derecede NaCl bulunmasına rağmen, halofilik arkeler, ortama kıyasla sitoplazmalarını sodyumdan arındırılmış tutarlar. Bunun yerine hücre içinde potasyum (K^+) depolanır ve bununla beraber karşıt iyon olarak klor (Cl^-) hücre içinde sitoplazmada molar konsantrasyonlarda bulunabilir. Hücre içi K^+ konsantrasyonu hücre dışından 100 kat fazla olduğu için, proton hareket gücü, iyon gradiyentini korumak için, harcanmak zorundadır (Kunte, Trüper ve Stan-Lotter, 2002, s. 186).

İyonik sitoplazmaya uyum sağlayabilmek adına enzimatik mekanizmaları adaptasyon geçirmiştir ve halofilik anaerobik bakteri ve halofilik arkelerin proteinleri, temel amino asitlere kıyasla yüksek derecede asidiktirler. Bu da yüklü amino asitlerin enzimlerin ve ribozomların yüzeyinde birikmesine neden olmuştur. Bunun sebebinin de yüksek iyonik çevrelerde, molekülün hidrasyon kabuğunu stabilize bir şekilde tutması olduğu düşünülmektedir. Düşük tuzlu çevrelerde, çok fazla miktardaki negatif yüklü iyonlar, itme kuvvetinin etkisi ile molekülün yapısını destabilize edecektir. Bu mekanizma göstermektedir ki, salt-in mekanizmasına sahip organizmalar çok dar bir adaptasyon aralığına sahiptirler ve büyümeleri sadece yüksek tuzlu ortamlarla sınırlıdır (Kunte, Trüper ve Stan-Lotter, 2002, s. 186-187).

Salt-in stratejisi halofilik arkeler ve ekstrem halofiller tarafından kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonlarına adapte olmuşlardır ve ortamın tuzluluğu düşürülürse hayatta kalamazlar. Bu organizmalar genel olarak osmatik dengeyi korumak için organik solüt salgılamazlar (Shivanand ve Mugeraya, 2011, s. 1517).

1.1.3.2. "Compatible solute" stratejisi

Osmotik stresse bir cevap olarak, şeker, polioller, amino asitler ve/veya amino asit türevlerinin ya yeni bir şekilde sentezlenip biriktirilmesi ya da ortamdan alınıp hücre içi biriktirilmesi ile gerçekleşen bir stratejidir. Bu iyonik olmayan ve kolay suda çözünebilen solütler, yüksek konsantrasyonlarda bile, metabolizmayı rahatsız etmez. "Compatible solute" stratejisini kullanan halofilik hücreler, ufak hücre içi protein

değişiklikleriyle halofilik olmayan hücrelerle aynı enzimatik mekanizmayı kullanabilirler. Örneğin, *Escherichia coli*'ye kıyasla birazcık daha asidik hücresel proteinlere sahiptirler (Kunte, 2009, s. 266).

1.1.4. Morfolojileri

Haloarkelerin temel morfolojik tipleri; rod veya kok olmasına rağmen üçgen ve kare şekilli türler de vardır, bunların dışında "irregular pleomorfik" tiplerde bulunmaktadır ki bunlar da genelde düz formlardır (DasSarma ve Arora, 2001, s. 6). *Haloarcula japonica* normal üreme koşulları altında tipik üçgen şeklindedir (Takashina vd., 1990, s. 177). Halofilik arkelerin bir turgor basıncına sahip olmaması nedeniyle bu hücresel şekillerin oluştuğu düşünülmektedir (Oren, 2002, s. 70).

1.2. Hipersalin Çevreler

Yüksek tuz oranına sahip çevrelere tüm kıtalarda rastlanabilir, bunlara; çok farklı kimyasal içeriklere sahip olabilen doğal tuz gölleri, deniz suyundan tuz üretimi için yapılan solar tuzlalar, yer altı tuz kayaları, tuzlu gıdalar, yüksek tuzlu topraklar ve diğer öteki örnekler verilebilir (Oren, 2007, s. 223). Hipersalin çevreler, iyonik kompozisyon, total tuz konsantrasyonu ve pH açısından çeşitli farklılıklar gösterir.

1.2.1. "Thalassohalin" çevreler

Deniz suyunun buharlaşması sonucu oluşan, Na^{+} ve Cl^{-}'un baskın olduğu, nötr pH'ye yakın çevrelerdir (Oren, 2016, s. 4.3.2-1). Thalassohalin çevreler, deniz orijinli olup, Na^{+} ve Cl^{-} iyonları dışında; Mg^{+2}, SO_4^{-2}, K^{+}, Ca^{+2}, Br^{-}, HCO_3^{-}, ve F^{-} gibi diğer önemli iyonlar içerir. Deniz suyunun ortalama tuzluluğu %.3.5 kadardır, yoğunlaşma gerçekleştiğinde ise, seri çökelmelere bağlı olarak kompozisyonu değişir (Ventosa ve Arahal, 2009, s. 249).

1.2.2. "Athalassohalin" çevreler

Lut gölü (the Dead Sea) bir athalassohalin göl olup, diğer hipersalin çevrelere kontrastla, ana katyonu Na yerine Mg^{+2}, baskın anyonu Cl^{-} (%99) ve diğer thalassohalin sulara kıyasla bolca Br^{-} (%1) bulunduran bir ortamdır (Ventosa ve Arahal, 1999). Athalassohalin çevrelerdeki prokaryotik çeşitlilik hakkında bilgi azdır ve sadece dünyanın belli bölgelerinde bu çevrelere ait mikrobiyal çeşitlilik çalışmaları yapılmıştır.

Atacama çölündeki athalassohalin göllerde yapılan kültür bağımsız bir çalışmada *Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides* ve az da olsa *Proteobacteria* filumlarına ait bakteriyel örnekler, birkaç kültüre edilebilmiş akrabalarına yakın arkeal örnek, ve çok sayıda genbankasında yakın akrabası bulunmayan ve eşleşmeyen arkeal örnek bulunmuştur (Demergasso vd., 2004, s. 57).

1.3. Kaya Tuzları ve Prokaryotik Yaşam

Kaya tuzu, tuzlu suların buharlaşması sonucu oluşmuş evaporitik bir kayaçtır. Dünya'da doğal jeolojik katı tuz yatakları arasında en yaygın olanı kaya tuzu olup ana bileşeni NaCl'dir (Özşen, 2009, s. 13). Kaya tuzunun ortalama olarak % 90-98'ini oluşturan Na ve Cl elementlerinin haricinde, oluşum süreçlerindeki çökelme şartlarına bağlı olarak NaCl ile birlikte çöken ve kaya tuzunun geri kalan % 2-10'luk kısmının önemli bir miktarını teşkil eden Ca, Mg, K, S ve C (SO_4^{-2} ve CO_3^{-2} anyonlarından dolayı) gibi elementler de bulunur. Bunlara "başlıca safsızlık elementleri" de denir (Aksel, 2014, s. 9).

1960'lardan beri mikrobiyologlar ve jeologlar, arke ve bakterilerin kaya tuzlarının içinde akışkan bir şekilde var olduklarının bilincindedirler (Conner ve Benison, 2013, s. 851). Yaklaşık 35 sene sonra, çok eski kaya tuzlarından yapılan başarılı bakteriyal ve arkeal izolasyonlar, detaylı taksonomik tanımlamalar yayınlanmaya başlandı. Örneğin Mormile ve diğerleri (2003) Ölüm Vadisi, Kaliforniya'dan 97.000 yıllık bir kaya tuzundan bir arke (*Halobacterium salinarum*) izole etmişlerdir. Bir başka örnek ise; Vreeland ve diğerleri (2000) New Mexico'dan elde edilen 250 milyon yıllık bir kaya tuzundan iki ayrı halotolerant bakteri straini izole etmişlerdir. Jaakkola ve diğerleri (2014) Yunying tuz madeninin 800 metre derinliğinden çıkarılan Eosen dönemine ait bir kaya tuzundan 8 farklı izolat elde etmiş ve bunların *Halobacterium* ve *Halolamina* cinslerine ait türler olduklarını bulmuşlardır.

Arkelerin, tuz tortuları içerisinde, bu uzun dönemli hayatta kalma mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Fendrihan, 2012, s. 424). Kist oluşumu gibi diğer uyku formları üzerisinde durulmuştur ancak bunlar daha açıkça kanıtlanamamıştır (Norton ve Grant, 1988). Genom dizilimleri spor üretmediklerini göstermektedir (Onyenwoke vd., 2004, s. 185-186). Atacama çölünden permiyen dönemine ait 2000 metre derinlikten

çıkarılan kaya tuzlarında yaşayan mikroorganizmalar bulunmuştur (Jaakkola vd., 2016, s. 148). Kaya tuzları jeolojik açıdan stabil durumdadırlar ve yeraltı sularını geçirmediği için, bu mikroorganizmaların yer yüzündeki en yaşlı canlılar olduğu düşünülmektedir.

1.3.1. Türkiye'de kaya tuzları ve kaya tuzu yatakları

Türkiye jeolojik yapısından ötürü geniş kaya tuzu kaynaklarına sahiptir. Türkiye'deki kaya tuzuna ait rezervler Tablo 1.2.'de verilmiştir.

Tablo 1.2. *Türkiye'de Kaya Tuzu Rezervleri (Milyon ton olarak)*

Tesis adı	Şehir	Görünür	Muhtemel	Mümkün
Sekili	Yozgat	107	359	300
Çankırı	Çankırı	821	358	-
Gülşehir	Nevşehir	75	96	959
Tepesidelik	Kırşehir			20
Tuzluca	Kars			100
Kağızman	Kars			60
Oltu	Erzurum			30

Kaynak: *Özşen, 2009, s. 87.*

Tuz, kömür gibi, tabakalı yapıda bulunabilir. Tabakalı hali kaya tuzu yataklarının orijinal halidir. Tuz, dom hali şeklinde de bulunabilir. Tuz domları, yeryüzü tuza basınç uygulayıp, çatlaklardan yukarıya zorlayarak 9-12 km arası derinliklere erişmesiyle oluşur (Ertem vd., 2001, s. 637).

Ülkemiz kaya tuzu yataklarının ayrı ayrı ve toplu olarak incelenmesi sonucu, Anadolu'daki jipsli ve tuzlu formasyonun Oligosen ve Miyosene ait olduğu görülmüştür (Barutoğlu, tarihsiz, s. 74).

Kaya tuzu yataklarımız; Kuzeydoğu Anadolu ve Ortadoğu Anadolu bölgelerinde bulunmaktadır.

1.3.1.1. Kuzeydoğu Anadolu yatakları

Kars'ın güneyinde "Kağızman" , güneydoğusunda "Tuzluca", Erzurum'un kuzeydoğusunda "Oltu", kuzey-kuzeydoğusunda "Sağırkaya" olmak üzere 4 ayrı

yataktan oluşur. Bölgenin en büyük yatakları Tuzluca ve Kağızman yataklarıdır. Sağırkaya ve Oltu yatakları bu ikisine kıyasla ufak yataktırlar ve yaygın değillerdir. Bölge yataklarının en yüksekleri 1750 metrede bulunan Sağırkaya ve 1200 metrede bulunan Oltu yataklarıdır (Barutoğlu, tarihsiz, s. 73).

1.3.1.2. Orta Anadolu yatakları

Bu bölge yataklarının daha çok Çankırı ile Kırşehir arasında çizilecek Kuzey-Güney istikametindeki hattın üzerinde veya bu hattın yakın çevresine dağılmış oldukları görülür. Bunlar "Çankırı" yatağı ile bunun güney doğusuna denk gelen "Cayan", Kırşehirin kuzey-kuzeybatısındaki "Sekili", güneyindeki "Tepesidelik" ve daha güneyindeki "Hacıbektaş - Tuzköy - Gülşehir" kaya tuzu yataklarından oluşmaktadırlar. Bu bölgedeki yataklar 800 ile 1000 metre arasında bir yükseklikte bulunmaktadırlar. (Barutoğlu, tarihsiz, s. 74).

1.4. Mikrobiyal Çeşitlilik Yöntemleri

Günümüzde, daha hızlı ve etkili sonuç veren diagnostik yöntemler için çok fazla araştırma yapılmaktadır. Yeni modern yöntemler daha hızlı ve kesin sonuçlar verdiği için daha benimsenmiş olsa da, bu yöntemlerin pahalı olması nedeniyle, bazı laboratuvarlar hala geleneksel testleri kullanmaktadırlar (Bunn ve Sikarwar, 2016, s. 1).

1.4.1. Klasik yöntemler

Geleneksel mikrobiyal yöntemler genelde; mikroskopi, antijen testleri, seroloji ve kültür çalışmalarını içermektedir. Bu yöntemlerin çoğunun kökeni Lister, Koch ve Pasteur'e dayanmakta olup, 100 seneyi aşkın süredir kullanılmaktadırlar (Moldenhauer, 2008, s. 49). Mikroskobun kullanımı, mikrobiyolojinin ortaya çıktığı zamanlarda, bakteriyal, fungal ve protozoal hastalıkların tanımlanmasında çok önemli rol oynamıştır. Mikroskop çoğu durumda, "altın standart" olarak rol oynasa da (örneğin malaria ve gaita parazitlerinde), daha sonra ek testlere gereksinim duyan varsayımsal bir diagnostik sonuç verir (Laupland ve Valiquette, 2013, s. 125).

Çoğu senaryoda, koloni morfolojisi, örneğin; -çoğu seçici veya diferansiyal besiyerinde- renk, şekil, büyüklük, hemolitik reaksiyon ve büyüme karakteristikleri, bir organizmayı

familya, cins veya hatta tür seviyesinde tanımlamaya izin verebilir (Aslanzadeh, 2006, s. 84).

Zahmetli ve zaman gerektiren klasik yöntemler, mikroorganizmaların izolasyonu, saflaştırılması, saklanması ve alt tür analizleri için gereklidir.

1.4.1.1. Mikroskobik yöntemler

Hücre morfolojileri; bakteriyolojide genel olarak bir öneme sahip olması ile birlikte, tomurcuklanan bakteri türlerinin, kılıflı bakteri türlerinin ve "stalked" bakteri türlerinin identifikasyonunda önemli rol oynar. Özellikle klinik mikrobiyolojide fusiform bakterilerin, korineform bakterilerin, spirtoketlerin, spirillum cinsine ait türlerin ve vibrio cinsine ait türlerin identifikasyonu açısından önemlidir (Trüper ve Schleifer, 2006, s. 63).

Hücre çapı (ya da hücre kalınlığı); *Chromatium* ve *Beggiatoa* cinslerinin kendi türleri arasında farklılıklar göstermektedirler ve bakterilerin üreme modellerinden ötürü, çoğu durumda hücre çapı, hücre uzunluğuna göre daha stabil bir özelliktir (Trüper ve Schleifer, 2006, s. 63).

1.4.1.2. Serolojik yöntemler

İmmünolojik teknikler, örneklerdeki organizmayı saptama, identifikasyon, kantitatif antijenleri belirlemek için kullanılmaktadırlar. Antijen ve antibadilerin birbirlerine özgün olmaları, immünolojik teknikleri güçlü laboratuvar araçlarından biri yapmaktadır (Murray vd., 2009, s. 7). Fakat serolojik yöntemlerin olumsuz bir yanı; farklı antijenlerin çapraz reaksiyon vermesidir (Ağaçfidan ve Badur, 2002, s. 285). Antijen testleri; kültüre edilmesi zor, yavaş veya tehlikeli olan enfeksiyon ajanlarını tanımlamak için kullanılmaktadır. Özellikle hızlı tanımlama imkanı sağlaması nedeniyle, kliniklerde, acil servislerde ve merkezi laboratuvarlarda kullanılmaktadırlar (Campbell ve Landry, 2006, s. 23).

1.4.1.3. Tek enzim testleri

Tek enzim testleri, bir grup seri testler olup; bir enzimin varlığını veya yokluğunu veya bir biyokimyasal reaksiyonun, saniyeler ile dakikalar arasında sonuç vermesini sağlarlar. Bu testler ucuz, uygulaması kolay ve genelde identifikasyon aşamalarında

önemli bilgi sağlayan testlerdir. Bazı senaryolarda belli organizmaları tür seviyesinde tanımlamaya bile yardımcı olabilir (Aslanzadeh, 2006, s. 84). Tek enzim testlerine örnek olarak, katalaz testi, oksidaz testi, indol testi, lösin aminopeptidaz (LAP) testi örnek verilebilir.

1.4.2. Modern (moleküler) yöntemler

Modern yöntemlerin en büyük avantajı, geleneksel yöntemlerin kullanılamadığı veya geleneksel yöntemlerden sonuç alınamadığı durumlarda kullanılabilmeleridir (Bunn ve Sikarwar, 2016, s. 3-4). Çevresel örneklerden direkt olarak çıkartılan DNA ve DNA'yı kullanan genetik parmak izi teknikleri gibi yöntemler, çalışılacak çevrenin mikrobiyal komünitesinin filogenetik çeşitliliğini ortaya koyabilir. Bu yaklaşım geleneksel kültüre bağlı yöntemlerin gerekliliğini ortadan kaldırmasıyla birlikte kültüre bağlı yöntem sırasında karşılaşılacak sorunları da iptal etmiş olur (Albano vd., 2008, s. 2188).

1.4.2.1. DNA parmak izi (DNA fingerprinting)

Geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerin eksik olduğu yerler, genotipik yöntemlerin gelişmesine neden oldu. DNA dizilemesi hariç, tüm bu methodlarda DNA bantlarının; restriksiyon enzimleri ile, hibridizasyon ile veya PCR ile görünebilir hale getirilmesi prensibi bulunmaktadır. Bu bantlaşma modelleri veya "DNA parmak izi" bir izolatı diğeri ile karşılaştırma imkanı sunar (Fakruddin vd., 2013, s. 397).

1.4.2.2. DNA-DNA hibridizasyonu

Tüm genom dizilemesi 21. yüzyılın başları ile birlikte mümkün olmaya başlamadan önce, identifikasyon için farklı yöntemler izlenmekteydi. 1960'lardan itibaren DNA-DNA hibridizasyonu (DDH) organizmalar arasındaki ilişkiyi incelemek için kullanılmaktaydı. Bu teknik evrensel olarak kabul edilmiş sınırlı sayıdaki uygulanabilir tekniklerden biri olup, karşılaştırmalı genom kıyaslamasına dayalıdır (Goris vd., 2007, s. 81).

DNA-DNA hibridizasyonu, tüm genom içerisindeki ortalama nükleotid benzerliğini ölçen, moleküler methodlar içerisindeki hızlı ve ucuz yöntemlerden biridir; ancak hangi genlerin benzerliğe veya farklılığa neden olduğu konusunda bir bulgu vermez (Stackebrandt, 2006, s. 34).

DNA-DNA hibridizasyonu, küçük farklılıkları ortaya çıkarma prensibine dayanarak, yakın akraba türler arasındaki ayırt etmek için kullanılır (Madigan ve Martinko, 2010, s. 321).

1.4.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction) (PZR/PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), belli bir DNA bölgesini hedefleyen, nükleik asit amplifikasyonudur. Hedeflenen bölge; spesifik bir gen bölgesi, sekans içerisindeki tekrarlayan bölgeler veya isteğe bağlı bir bölge olabilir (Saiki vd., 1985, s. 1354). Genelde tercih edilen bölgeler arasında; toksinlerden sorumlu gen bölgeleri, hücresel metabolitlerden sorumlu gen bölgeleri ve ribosomal RNA (rRNA) bulunmaktadır (Olsen vd., 1995, s. 2-6; Scheu vd., 1998, s. 13-14)

Polimeraz zincir reaksiyonu 3 aşamadan oluşmaktadır: denatürasyon, annealing ve uzama. Bu üç aşamanın bir tur atmasına, PCR döngüsü denilmektedir (Loeffelholz ve Deng, 2006, s. 168).

Denatürasyon

93-94 ˚C'de DNA'nın çift sarmal yapısı ayrılır veya denatüre olur. Bu sıcaklıkta tüm enzimatik reaksiyonlar, -bir önceki uzama aşaması da dahil olmak üzere- durur.

Annealing

Denatürasyon aşamasını takiben, sıcaklığın düşmesi ile birlikte DNA'nın komplomenter bölgesi ile bağlanması tekrar mümkün hale gelir. Bağlanma sıcaklığı, DNA sekansına bağlı olarak değişir, ama genelde 50-60 ˚C arasındadır. Annealing sıcaklığında primerler hareket halindedir. Tek primer ile DNA ziniciri arasında iyonik bağlar devamlı olarak oluşup kırılmaktadır. Primerler kusursuz bir şekilde komplementer hedef sekans ile etkileşim haline girince, bağ etkili bir biçimde stabil hale gelir ve DNA polimerazın yerine oturmasına ve DNA sentezini her primerin 3' ucundan başlamasına izin verir.

Uzama

Primerlerin uzaması genelde 72 ˚C'de gerçekleşir. *Taq* DNA polimeraz bu sıcaklıkta maksimum aktiviteye sahiptir. Primerin 3' ucuna bazlar eklendikçe, çift zincirli yapı uzar, iyonik bağ güçlü hale gelir.

PCR'ın standartizasyonu laboratuvarlar arası örneklerin tutarlı olabilmesi açısından önemlidir. Ancak bu problematiktir çünkü; DNA örneğinin kalitesi, çevresel faktörler (nemlilik, kimyasal ve mikrobiyal kirlilik, sıcaklık), cihazlar, bireyin tecrübesi, reaksiyon koşulları ve reaksiyon materyalleri gibi durumlar standartizasyonu güç kılar (Malorny vd., 2003, s. 45).

1.4.2.4. Ribotiplendirme

Tipik olarak her ribozomal operon, yapısal rRNA moleküllerini kodlayan 3 gen bölgesini içerir; 16S, 23S ve 5S. Bu gen bölgelerinin ortalama büyüklükleri sırası ile 1,522 bp, 2,971 bp ve 120 bp'dir. Polipeptit sentezindeki temel görevlerinden dolayı bu gen bölgeleri bakteriyel türler arasında çok iyi korunmuş bölgelerdir. Bu üç bölge içerisinde en çok korunmuş olan ise 16S rRNA gen bölgesi olduğu için, 16S rRNA dizilimi, bakteriyel türlerin identifikasyonunda ve taksonomik sınıflandırılmada altın standart olarak kabul edilmiştir (Bouchet vd., 2008, s. 262-263).

Geleneksel ribotiplendirmede; uygun bir restriksiyon enzimi (ideal olarak bir kez 16S rRNA bölgesini, bir kez de 23S rRNA bölgesini kesecek) ve örneğe ait alınan tek bir koloni, genomu çıkartıldıktan sonra restriksiyon enzimi ile kesilir. Kesilmiş bölge daha sonra boyutu bilinen referans bir izolat ile %0,8'lik agaroz jelde yürütülür daha sonra da southern blot ile vakum transferlenerek bir naylon membrana geçirilir. Tüm 16S-23S-5S ribozomal operonu primerler aracılığı ile amplifiye edilir. Boyut büyüklüğünün teyiti için, amplifiye ürün, düşük erime noktalı agaroz ile hazırlanmış jelde yürütülür ve direkt olarak agaroz jelden kesilerek alınır. DNA parçalarının alınması için jel, kaynatılır. 20 ile 50 nanogram arasındaki ribozomal template alınarak, DNA polimeraz I ile ve rastgele seçilmiş primerler ile radiolabeled probe'a dönüştürülür. Genomik DNA parçalarının bulunduğu membran ile radiolabeled probe hibridize edilerek otoradyografik bir filme çıkarılır. Elde edilen ribotip RFLP bantları manuel olarak veya

bir uygun yazılım ile analiz edilir. Elde edilen rRNA bant şablonlarındaki benzerlik veya farklılıklara göre identifikasyona gidilir (Bouchet vd., 2008, s. 263).

1.5. Filogenetik Marker Olarak rRNA

Ribozomal RNA yaklaşımı tekniği, Carl Woese'un 1977'de *Archea* domainini dünya ile tanıştırması sonrasında, sistematikte yeni bir çağ başlatmıştır. Taksonlar her geçen gün yeniden tanımlanmakta, transfer edilmekte, düzeltilmektedir (Ludwig, 2010, s. 65). Ribozomal RNA'nın evrensel marker olarak kullanılmasının bir kaç nedeni vardır, bunlar; (i) genellikle multigen ailesi olarak veya operon şeklinde, neredeyse tüm bakterilerde mevcuttur, (ii) 16S rRNA'nın işlevi zamanla değişmemiştir (yani zamanla gerçekleşen rastgele baz değişimleri evrimsel değişimin ölçülmesinde daha doğrudur), ve son olarak (iii) 16S rRNA informatik amaçlar için yeterli uzunluktadır (1500 bp) (Janda ve Abbott, 2007, s. 2761).

16S rRNA gen dizilimlerinden, tüm genoma ait dizilimlere ilişkin bilgiler, günbegün artmakta ve bu bilgiler kamuya açık internet databanklara konulmaktadır. Örneğin; "Ribosomal Data Base Project" (http://rdp.cme.msu.edu/) ve "National Center for Biotechnology Information Blast Library (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) gibi. Bu kütüphaneler, çevresel, klinik ve gıda kaynaklı gibi ortamlardan elde edilmiş, kültür bağımlı veya bağımsız organizmaların 16S rRNA gen bölgeleri ile karşılaştırma yapılarak, identifikasyona gidilmesine izin vermektedir (Drancourt vd., 2000, s. 3623). Ancak 16S rRNA gen sekans analizleri, bakteri strainleri arasında sınırlı miktarda farklılık göstermektedir (Janda ve Abbott, 2002, s. 1889). Bu, özellikle aynı cinse ait gruplarda ortaya konulmuştur. Örneğin; Apetroaie ve diğerleri (2005) "cereulide" toksini üreten 13 *Bacillus cereus* strainin birbiriyle ve *Bacillus anthracis* strainleri Ames, Sterne ve NC-08234-02 ile özdeş olduklarını göstermiştir. Bu yüzden 16S rRNA gen sekans analizi, bilinmeyen organizmalar arasındaki homolojiyi incelerken her zaman güvenilir değildir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri

2.1.1.1. Medyum A

NaCl.....250 g

KCl.....5 g

$MgCl_2.6H_2O$.....5 g

NH_4Cl.....5 g

Yeast extract.....10 g

Tüm hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanarak, pH 7'ye 1M Tris-base ile ayarlanarak 121 ˚C'de 15 dakika steril edilmiştir (Oren ve Litchfield, 1999, s. 354).

2.1.1.2. Medyum B

NaCl.....200 g

KCl.....1 g

$MgSO_4.7H_2O$.....20 g

$FeSO_4.7H_2O$.....0,02 g

Tri-Na-Citrate.....3 g

Casamino acid.....7,5 g

Yeast extreact.....0,5 g

Tüm hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanarak, pH 7'ye 1M Tris-base ile ayarlanarak 121 ˚C'de 15 dakika steril edilmiştir (Oren ve Litchfield, 1999, s. 354).

2.1.1.3. Medyum C

NaCl.....175 g

$MgCl_2.6H_2O$.....20 g

K_2SO_4.....5 g

$CaCl_2.2H_2O$.....0,1 g

Yeast extract.....5 g

Tüm hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanarak, pH 7'ye 1M Tris-base ile ayarlanarak 121 ˚C'de 15 dakika steril edilmiştir (Oren ve Litchfield, 1999, s. 354).

2.1.1.4. Medyum D

NaCl.....206 g

KCl..... 0,37 g

$MgSO_4.7H_2O$..... 36 g

$CaCl_2.2H_2O$.....0,5 g

$MnCl_2$.....0,013 g

Yeast extract.....5 g

Tüm hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanarak, pH 7'ye 1M Tris-base ile ayarlanarak 121 ˚C'de 15 dakika steril edilmiştir (Oren ve Litchfield, 1999, s. 354).

2.1.1.5. Medyum E

NaCl.....125 g

$MgCl_2.6H_2O$.....160 g

K_2SO_4.....5 g

$CaCl_2.2H_2O$.....0,1 g

Yeast extract.....1 g

Casamino acid.....1 g

Starch.....2 g

Tüm hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanarak, pH 7'ye 1M Tris-base ile ayarlanarak 121 ˚C'de 15 dakika steril edilmiştir (Oren ve Litchfield, 1999, s. 354).

2.1.1.6. %18 MGM (Modifiye Geliştirme Medium)

%30'luk tuzlu su çözeltisi.....600 ml

Distile su.....367 ml

Pepton.....5 g

Yeast extract.....1 g

Tüm içerik çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-base ile pH 7,5'e ayarlanarak, tüm hacim distile su ile 1 litreye tamamlanarak 121 ˚C'de 15 dakika steril edilmiştir (Dyall-Smith, 2009, s. 14).

2.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler

2.1.2.1. %30'luk tuzlu su çözeltisi

$MgSO_4.7H_2O$.....35 g

$MgCl_2.6H_2O$.....30 g

NaBr.....0,8 g

$HNaCO_3$..... 0,2 g

KCl.....7 g

$CaCl_2$.....0,5 g

NaCl.....240 g

Tüm içerik çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra 1M Tris-base ile pH 7,5'e ayarlanarak, tüm hacim distile su ile 1 litreye tamamlanarak 121 ˚C'de 15 dakika steril edilmiştir (Dyall-Smith, 2009, s. 12).

2.1.2.2. %20 deniz suyu (SW)

NaBr.....0,52 g

$HNaCO_3$.....0,134 g

KCl.....4,0 g

$CaCl_2$.....0,578 g

$MgSO_4.7H_2O$.....39,594 g

$MgCl_2.6H_2O$.....27,654 g

NaCl.....156 g

Tüm hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanarak, pH 7'ye 1M Tris-base ile ayarlanarak 121 ˚C'de 15 dakika steril edilmiştir (Rodríguez-Valera, 1985).

2.1.2.3. %25 deniz suyu (SW)

NaBr.....0,65 g

$HNaCO_3$..... 0,167 g

KCl.....5 g

$CaCl_2$.....0,723 g

$MgSO_4.7H_2O$.....49,492 g

$MgCl_2.6H_2O$.....34,567 g

NaCl.....195 g

Tüm hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanarak, pH 7'ye 1M Tris-base ile ayarlanarak 121 ˚C'de 15 dakika steril edilmiştir (Rodríguez-Valera, 1985).

2.1.2.4. TAE 50X (1 litre için)

Tris Base.....242 g

Asetik asit.....57,1 g

EDTA (0.5M pH 8).....100 ml

Tüm hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanarak, pH 8'e 1M Tris-base ile ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır (Sambrook vd., 1989).

2.1.2.5. TBE 5X (1 litre için)

Tris Base.....54 g

Borik asit.....27,5 g

EDTA (0.5M pH 8).....20 ml

Tüm hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanarak, pH 8'e 1M Tris-base ile ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır (Sambrook vd., 1989).

2.1.2.6. PBS 10X

NaCl.....80 g

$Na_2HPO_4.7H_2O$.....11,5 g

KCl.....2 g

KH_2PO_4.....2 g

Tüm hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanarak, pH 7,2'ye 1M Tris-base ile ayarlanarak 121 ˚C'de 15 dakika steril edilmiştir (Sambrook vd., 1989).

2.2. Metod

2.2.1. Örneklerin eldesi

Çalışmada kullanılan her bir örnek (Çankırı hariç olmak üzere) ait olduğu ilin kaya tuzu maden ocağından, ziraat teknikeri Heybet Erçin tarafından gönderilmiştir. Çankırı örneği ise Çankaya Kaya Tuzu Tesisleri tarafından gönderilmiştir. Çalışma boyunca kaya tuzları kuru şartlar altında saklanmıştır.



Görsel 2.1. *Çalışmada kullanılan kaya tuzu örnekleri*

2.2.2. İzolatların eldesi

Her bir kaya tuzu örneğinden 1'er gram alınarak, içlerinde 6 farklı besiyeri bulunan 6 erlene örnekler bırakılmıştır. Erlenler daha sonra 3-4 hafta boyunca 120 rpm'de 37 ˚C'ye ayarlı çalkalamalı etüve konulmuştur. Üreme gözlenen örneklerden daha sonra 100 µl alınarak her biri gene ürediği özgün katı besiyerine bir daha ekilmiştir. 3-4 hafta 37 ˚C'de etüvde tekrardan bekletilmiştir. Petrilerde gözlenen farklı renk ve tipteki koloniler tek tek alınarak saflaştırmaya gidilmiştir.

2.2.3. DNA izolasyonu

Çalışmada DNA izolasyonu için 2 protokol izlenmiştir.

1) Saf kültürden alınan bir miktar izolat, 1,5 ml'lik tüpler içerisinde 200 µl steril distile su içerisinde karıştırılıp, 10 dakika bekletilmiştir. Bekleme işlemi sonrasında tüpler 95 ˚C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşamasından sonra tüpler 10,000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası pelete dikkat edilerek, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet de 50 µl suda çözdürülerek -20 ˚C'de saklanmıştır.

2) 1,5 ml'lik tüplere 200 µl distile su konulmuştur, daha sonra katı besiyerinde bulunan saf kültürden bir miktar örnek alınarak tüp vorteks ile çalkalanmıştır. Sonra tüplere 200 µl fenol-kloroform eklenerek tüp içerisindeki materyal el yardımı ile karıştırılmıştır. Karıştırılan örnek 65 ˚C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşamasından sonra 5 dakika 10,000 g'de santrifüj edilmiştir. En üstte kalan sulu faz, yeni bir tübe aktarılarak üzerine 400 µl %100'lük soğuk etanol eklenmiştir. Daha sonra tüpler, DNA'nın çökmesi için 10 dakika boyunca buz üzerinde bırakılmıştır. Bir sonraki adımda tüpler 10,000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası etanol dökerek uzaklaştırılmış, ve tüpler içerisine 1 ml %70'lik etanol ilave edilmiş arkasından da tekrardan 10,000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası etanol tekrardan uzaklaştırılmış ve pelet kurumaya bırakılmıştır. Pelet tamamen kurumadan üzerine 50 µl su eklenerek, tüp içerisindeki DNA'lar -20 ˚C'de saklanmıştır.

Elde edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

2.2.4. PCR ile Archaea/Bacteria ayrımı

Saf kültürlerden elde edilen DNA'ların 16S rRNA bölgesi hedeflenerek, istenilen bölge polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Ayrı ayrı hem bakteriyal hem de arkeal primerler (sırası ile 27F ve 21F), ve her iki durum için de 1492R primerleri kullanılmıştır. Kullanılan primerlerle ilgili baz dizileri Tablo 2.1.'de, PCR döngüsünde kullanılan koşullar ise Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. *Çalışmada PCR için kullanılan primerler ve özellikleri*

Primerler	Baz Dizilimi (5'-3')	Spesifitesi	Referans
21F	TTC CGG TTG A TC CTG CCG GA	*Archea*	(DeLong, E.F., 1992)
27F	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	*Bacteria*	(Lane, D.J., 1991)
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Universal	(Lane, D.J., 1991)

Tablo 2.2. *Çalışmada kullanılan PCR döngüsü için kullanılan basamaklar ve koşulları*

Basamak	Sıcaklık	Süre
1	94 ˚C	3 dk
2	94 ˚C	30 sn
3	50 ˚C	1 dk
4	72 ˚C	2 dk
Basamak 2'ye geri dönüş (X 35)		
5	72 ˚C	10 dk
6	4 ˚C	∞

2.2.5. ARDRA (Amplifiye edilmiş ribozomal DNA'nın restriksiyon analizi)

PCR sonucu örneklerin çoğaltılan DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesilmesi işlemi için *Hinf* I (Promega Cat no R6201) ve *Mbo* I (Promega Cat no R6711) enzimleri kullanılmıştır.

Her bir örnek için; 10u enzim, 10 µl PCR ürünü, 2µl enzime uygun buffer ve 7µl steril distile su (total hacim 20µl olmak üzere) bir reaksiyon tüpünde toplanılmıştır. Örnekler bir 16 saat 37 ˚C'de bekletilmiş ve daha sonra bantların gözlenmesi için 0,5X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu içerisindeki %2'lik agaroz jele yüklenmiştir.

2.2.6. 16S rRNA gen bölgelerinin dizi analizleri

16S rRNA gen bölgelerinin dizi analizleri için "BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Sti."den (Çankaya/ANKARA) hizmet alımı yapılmıştır. Hizmet alımından elde edilen veriler "National Center for Biotechnology Information Blast Library" (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) adresinden karşılaştırılarak, identifikasyona gidilmiştir.

2.2.7. FISH (Fluoresan in situ hibridizasyon)

Kaya tuzu örneklerinin mikrobiyal kompozisyonunun belirlenmesi için FISH tekniği uygulanmıştır (Antón vd., 1999).

2.2.7.1. Fiksasyon

Fiksasyon işlemi için; 100 ml distile suda 10 gr kaya tuzu örneği çözdürülmüştür. Elde edilen tuzlu su karışımından 1ml örnek şırınga yardımı ile çekilerek 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Aynı şekilde 2 tüp elde edilmiştir. Tüpler 2000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant mümkün olduğunca çökelti kısmı alınmadan yeni bir tüpe aktarılmıştır. Elde edilen ~1.5ml'lik örnek üzerine 330 µl formaldehit eklenerek 16 saat boyunca +4 ˚C'de bekletilmiştir. Bekleme aşamasından sonra son hacim 10ml olacak şekilde üzerine 1X steril PBS eklenilmiştir. Tüm karışım 0,2 µm por çapına sahip GGTP Isopore (Millipore) filtreden geçirilmiştir. Filtre kuruduktan sonra hibridizasyon aşaması gerçekleştirilinceye kadar -20 ˚C'de saklanmıştır (Amann vd., 1995; Antón vd., 1999).

2.2.7.2. Hibridizasyon

18 µl hibridizasyon bufferı ve 2 µl uygulanacak olan prob (50 ng/µl) karıştırılarak, lam üzerinde bulunan, kesilmiş bir parça filtre üzerine damlatılmıştır. 50 ml'lik tüplere birer parça hibridizasyon buffer ile ıslatılmış kağıt yatay biçimde konulduktan sonra, lamlar yatay bir şekilde tüplerin içerisine yerleştirilmiştir. 2 saat boyunca 46 ˚C'de etüvde inkübasyona bırakılmışlardır.

Bekleme aşaması sırasında su banyosunda 48 ˚C'de tutulan "washing buffer" içerisine, inkübasyon sonrası çıkan filtreler bırakılır ve 15 dakika bekletilir. Bufferdan arındırılan filtreler hava ile kurumak üzere dışarıda bekletilmişlerdir. Bu işlem sonrası DAPI ile boyamaya hazır hale gelmişlerdir (Amann vd., 1995; Antón vd., 1999).

Çalışmada kullanılan problar ile ilgili bilgiler Tablo 2.3.'te verilmiştir.

Tablo 2.3. *Çalışmada FISH deneyi için kullanılan problar ve özellikleri*

Probun adı	Probun dizisi	Formadid %'si	Probun spesifitesi	Referans
EUB 338	**GCTGCCTCCCGTAGGAGT**	35	Bakteri	(Amann vd., 1990)
ARC 915	**GTGCTCCCCCGCCAATTCCT**	20	Arkea	(Amann vd., 1995)
EHB 412	**TACGCCCCATAGGGGTGT**	35	EHB1 ve EHB2	(Antón vd., 2000)

2.2.8. DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol, dihidroklorür) ile boyama

Örneklerdeki asıl mikroorganizma sayısını gözlemleyebilmek için DAPI boyası uygulanmıştır. Bunun için stok DAPI'den 10 µl alınarak üzerine 90 µl MQ su eklenerek, çalışma solüsyonu hazırlanır. Kurumuş filtrelerin üzerine 20 µl çalışma solüsyonu damlatılarak, yayılır. Kuruması için 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Kuruyan filtreler ilk önce saf alkol içerisinde yaklaşık 10 saniye gezdirilir, sonra da gene yaklaşık 10 saniye MQ su içerisinde gezdirilir ve tekrar kurumaya bırakılır. Sonraki aşamada filtreler lam üzerine konularak üzerine bir damla Citifluor (Citifluor Ltd.) damlatılır ve lamel yardımı ile kapatılır. Hazırlanan preparat 100X'lik objektifte epifluorasan mikroskopta incelenmiştir (Amann vd., 1995; Antón vd., 1999; Amann vd., 2000).

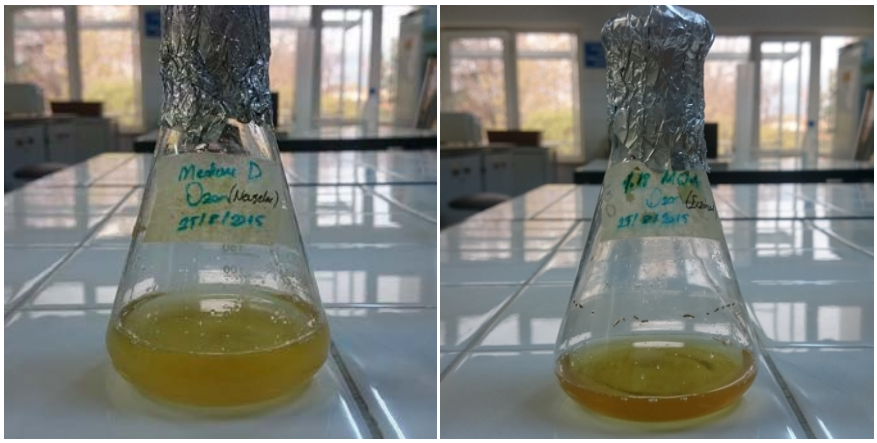
3. BULGULAR

3.1. İzolatların Eldesi

3-4 haftalık inkübasyondan sonra erlenlerde görülen üremeler Tablo 3.1.'de gösterilmiştir. Çalışmada üreme gözlenen erlenlere örnek olarak 2 örnek Görsel 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. *Besiyerlerine konulan kaya tuzu örneklerine ait üreme gözlenen erlenler*

	Çankırı	Kırşehir	Nevşehir	Yozgat	Kars	Erzurum
Medium A					+	
Medium B			+	+		
Medium C			+	+		
Medium D				+	+	
Medium E			+			
%18 MGM		+	+	+	+	



Görsel 3.1. *Çalışmada üreme gözlenen erlenlere örnek (solda; Medium D'de Nevşehir örneği, sağda; %18 MGM'de Erzurum örneği)*

Üreme sonrası erlenlerdeki sıvıdan 100 µl alınmış ve her biri kendine ait özgün katı besiyerine tekrardan ekilmiştir. Farklı renk ve tiptekiler, tek tek koloniler şeklinde alınarak saflaştırılmışlardır. Toplamda 16 farklı saf izolat elde edilmiştir.

Yozgat örneğinin, kendine özgün katı besiyerlerine yapılan inokulasyon sonrasında, petrilerde üreme gözlenememiştir. Katı besiyeri üzerinde üreme elde edebilmek için

çeşitli metotlar denenmiştir. Bunlardan ilki olarak, petrilere 100 µl yerine 200 µl eklenmiş ve petri üzerindeki besiyerine spatül yardımı ile emdirerek inkübasyona konulmuştur. İkinci olarak sıvı kültürden bir miktar örnek pipet yardımı ile 1,5 ml'lik tüplere konulmuş ve 3000 rpm'de 2-3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve oluşan pelet steril bir kürdan yardımı ile katı besiyerine ekim yapılmış ve inkübe edilmiştir. Üçüncü olarak, sıvı besi yerinden alınan örnek kendi özgün besiyeri dışında, diğer katı besiyerlerine ekilmiştir ve inkübe edilmiştir. Ancak bu yöntemlere rağmen sıvı besiyerinde gelişmiş organizmalar, katı besiyerinde gözle görülebilir hale gelmemiştir veya hiç gelişmemiştir.

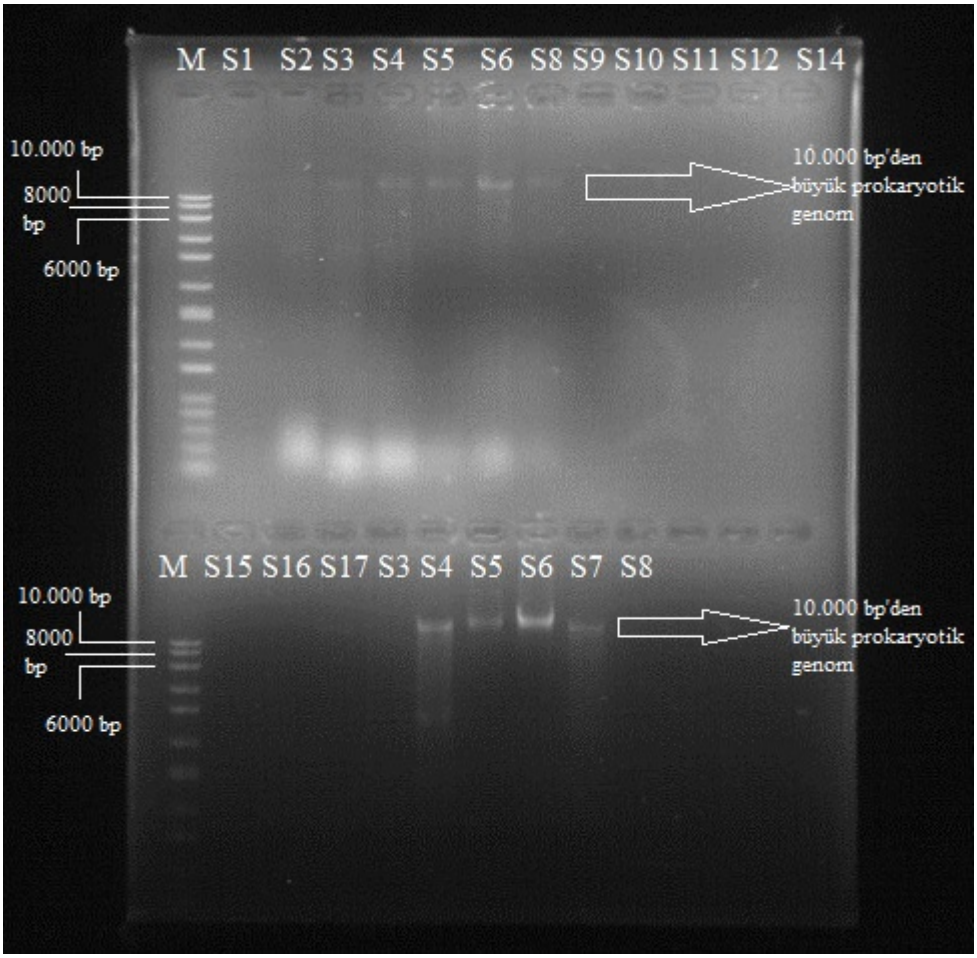
3.2. DNA izolasyonu ve PCR ile Archaea/Bacteria ayrımı

2.2.3.'de verilen protokollere göre DNA'ları elde edilen örnekler Tablo 3.2.'de gösterilmiştir. Elde edilen DNA'dan domain bazında ayrım için spesifik bakteri ve arke primerleri ile PCR reaksiyonuna tabii tutularak ve reaksiyon sonrası elde edilen ürünler %1'lik agaroz jele yüklenmiş, UV ışığı altında bantlar gözlenmiştir. Gözlenen bantlara göre bakteri ve arkea domainine ait türler ayrılmıştır (Antón vd., 1999).

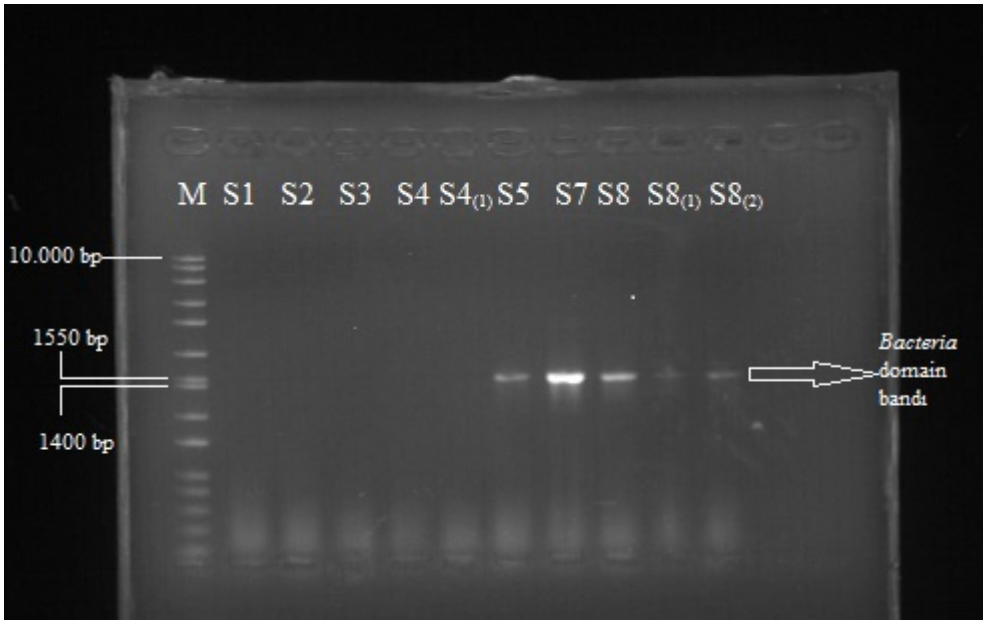
Elde edilen ve edilemeyen DNA'lar ve DNA'sı ekstrakte edilebilen örneklere ait PCR reaksiyonlarında verdikleri bantlara göre domain'lerine ait bilgi Tablo 3.2.'de verilmiştir. DNA'ların agaroz jelde yürütülmüş görüntüleri Görsel 3.2'de PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmüş görüntüleri ise Görsel 3.3 ve Görsel 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.2. *Çalışmada elde edilen izolatlara ait DNA'lar ve PCR reaksiyonunda verdikleri bantlata göre ait oldukları domain'ler*

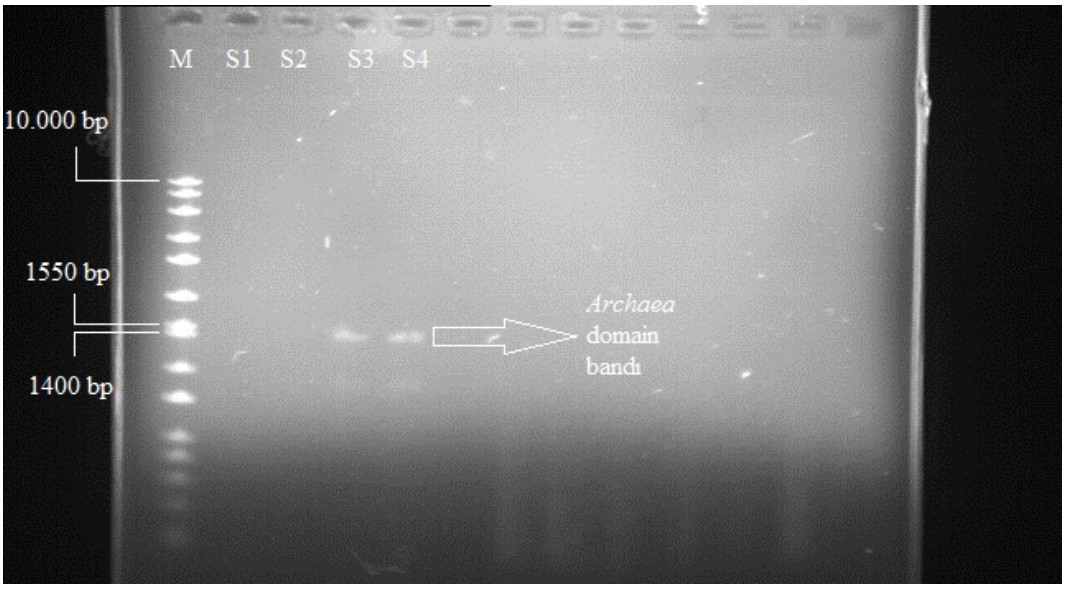
İzolatlar	DNA	PCR
S1	+	*Bacteria*
S2	+	*Archaea*
S3	+	*Archaea*
S4	+	*Archaea*
S5	+	*Bacteria*
S6	+	*Bacteria*
S7	+	*Bacteria*
S8	+	*Bacteria*
S9	-	-
S10	-	-
S11	-	-
S12	-	-
S14	+	*Bacteria*
S15	-	-
S16	+	*Bacteria*
S17	+	*Bacteria*



Görsel 3.2. *DNA ekstrasyonu sonrası %1'lik agaroz jelde yürütülen prokaryotik genomik parçalar - Sırası ile izolatlar: Marker, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S8, S9, S10, S11, S12, S14*
alt sıra: Marker, S15, S16, S17, S3, S4, S5, S6, S7, S8



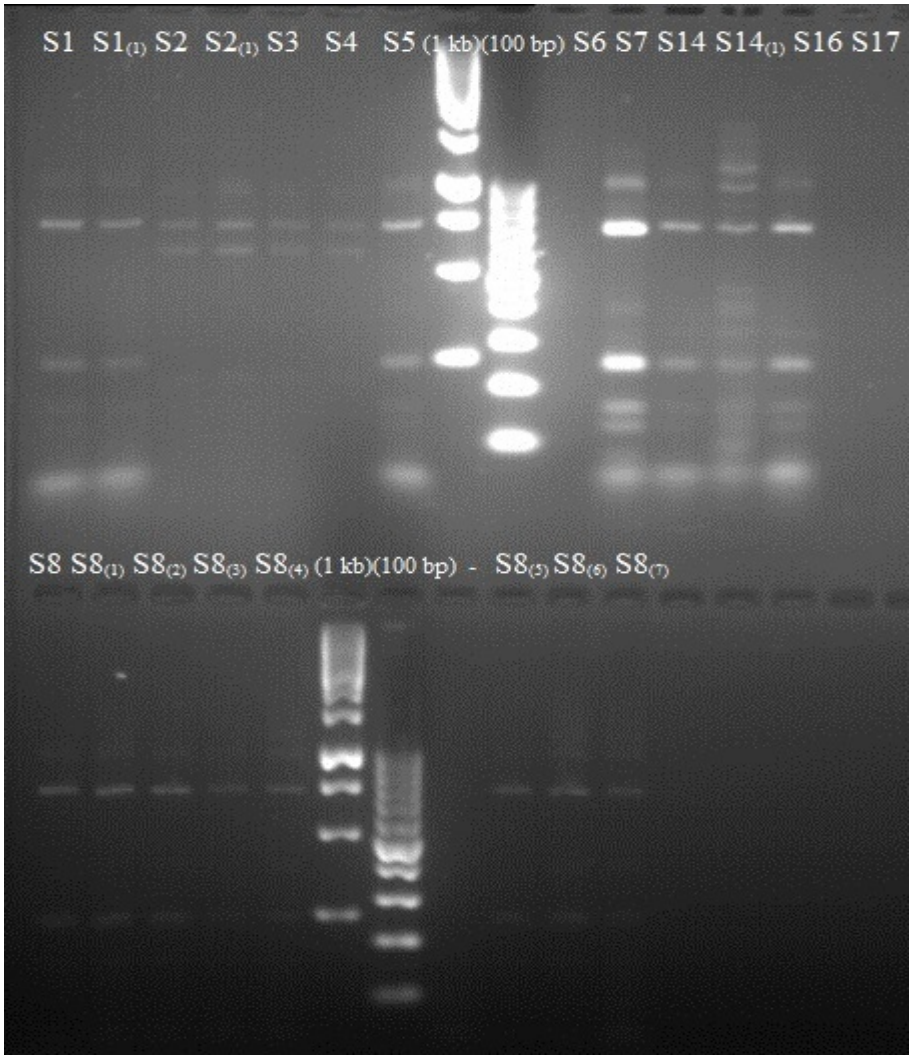
Görsel 3.3. *DNA template'leri ve bakteriyal primerleriyle amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmüş görüntüsü (16S amplifikasyon ürünleri) sırası ile izolatlar: Marker, S1, S2, S3, S4, $S4_{(1)}$ S5, S7, S8, $S8_{(1)}$, $S8_{(2)}$*



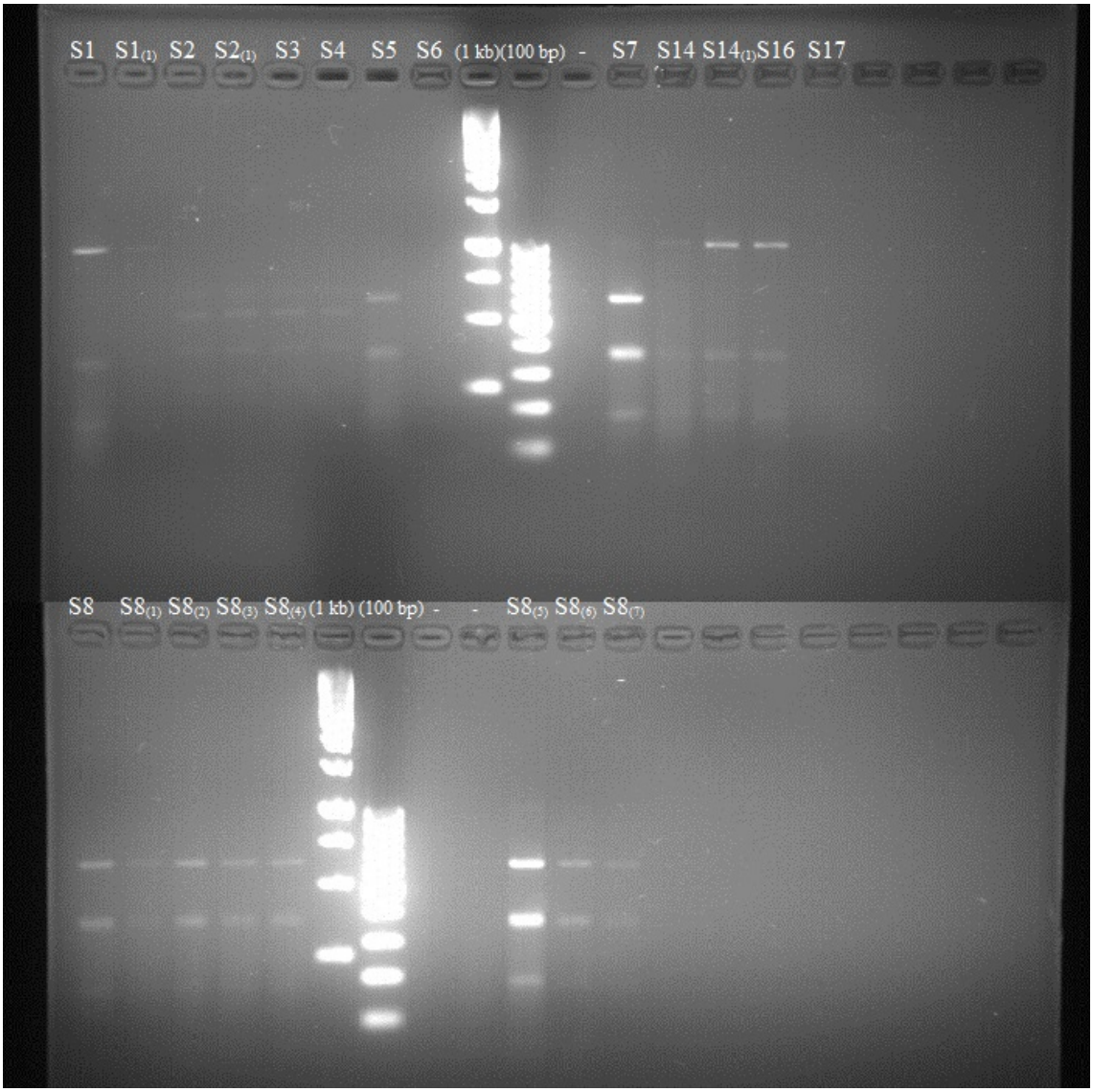
Görsel 3.4. *DNA template'leri ve arkeal primeleriyle amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmüş görüntüsü (16S amplifikasyon ürünleri) sırası ile izolatlar: Marker, S1, S1, S2, S3, S4*

3.3. ARDRA

16S PCR reaksiyonundan elde edilen ürünler *Hinf* I ve *Mbo* I restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Kesim işlemi sonrası ürünler %2'lik agoroz jele yüklenmiş ve elektroforez sonrası oluşan bantlar UV ışığı altında gözlenmiştir. Aynı profili veren örnekler aynı tür kabul edilmiş, oluşan profillerden farklı tipteki örnekler seçilerek çalışılacak örnek sayısı azaltılmıştır. Amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin ilgili enzim ile kesildikten sonra %2'lik agaroz jelde yürütülmüş görüntüleri Görsel 3.5. ve Görsel 3.6.'da verilmiştir.



Görsel 3.5. *Amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin Mbo I ile kesildikten sonra %2'lik agaroz jelde yürütülmüş görüntüsü - Sırası ile izolatlar: S1, $S1_{(1)}$, S2, $S2_{(1)}$, S3, S4, S5, 1 kb marker, 100 bp marker, S6, S7, S14, $S14_{(1)}$,S16, S17*
alt sıra: S8, $S8_{(1)}$, $S8_{(2)}$, $S8_{(3)}$, $S8_{(4)}$, 1 kb marker, 100 bp marker , - , $S8_{(5)}$, $S8_{(6)}$, $S8_{(7)}$



Görsel 3.6. *Amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin Hinf I ile kesildikten sonra %2'lik agaroz jelde yürütülmüş görüntüsü*
Sırası ile kesilmiş izolatlar: S1, S1(1), S2, S2(1), S3, S4, S5, S6, 1 kb marker, 100 bp marker, - , S7, S14, S14(1), S16, S17
alt sıra: S8, S8(1), S8(2), S8(3), S8(4), 1 kb marker, 100 bp marker , - , -, S8(5), S8(6), S8(7)

3.4. DNA Dizilime Analizleri

ARDRA sonucu azaltılmış örnek sayısı sonrasında, farklı profillere sahip olan izolatlar hizmet alımı yapılarak dizi analizine gönderilmiştir. Dizi analizinden gelen sonuçlar NCBI ("National Center for Biotechnology Information", (www.ncbi.nlm.nih.gov) genbankasındaki verilerle BLAST programı üzerinden karşılaştırılıp izolatların %'lik

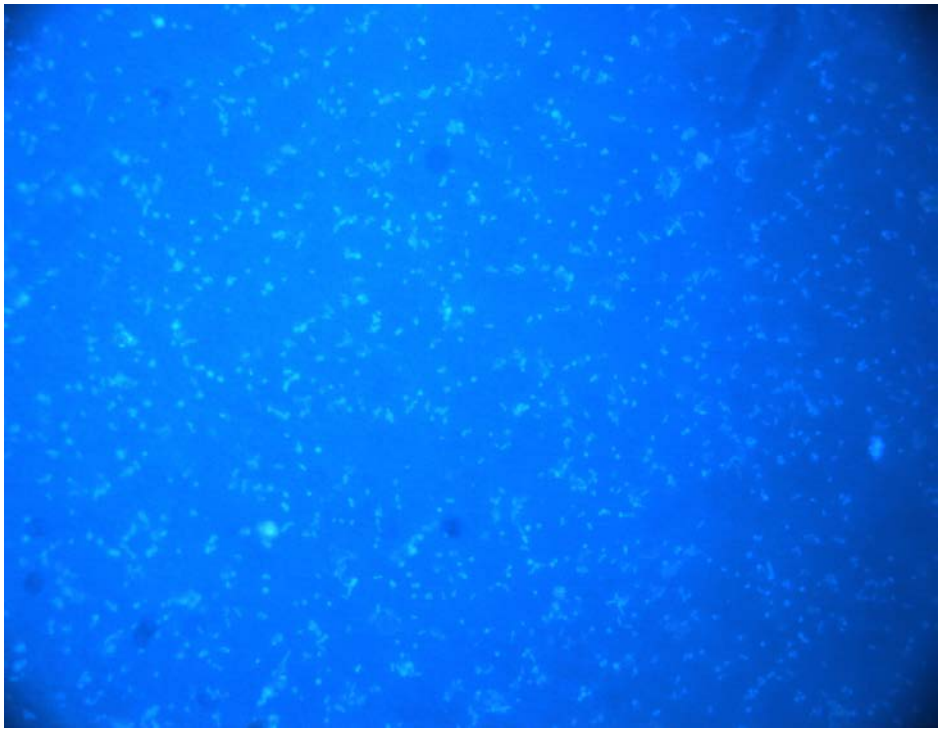
benzerlikleri ile identifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.3.'te verilmiştir.

Tablo 3.3. *İzolatların gen bankasındaki en yakın karşılığı ve eşleşen baz sayıları*

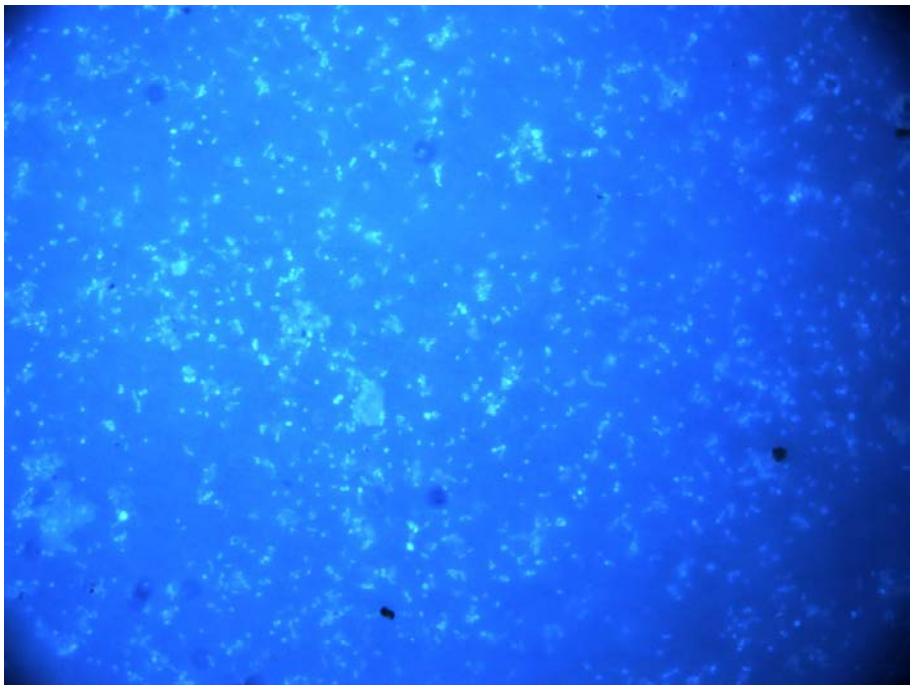
Dizi analizi için seçilen izolat	**Dizi analizi için kullanılan primerler**	**Eşleşen baz sayısı**	**%benzerlik gen bankasındaki en yakın karşılığı**
S2	21F-1492R	1236/1303	%95 *Halobacterium* sp. Q37
S6	27F-1492R	615/628	%98 *Oceanobacillus iheyensis*, isolate HL2RS17
S7	27F-1492R	812/847	%96 *Oceanobacillus iheyensis*, isolate HL2RS17
S8	27F-1492R	1167/1216	%96 *Oceanobacillus* sp. Ts14
S17	27F-1492R	647/677	%96 *Oceanobacillus* sp. DB-16

3.5. FISH ve DAPI

Elde edilmiş kaya tuzu örneklerinin ilk önce DAPI ile boyama yapılarak toplam hücre sayımı yapılması, EUB 338 probu ile hibridizasyondan sonra bakteri sayımı, ARC 915 probu ile hibridizasyonu ile arke sayımı yapılması hedeflenmiştir. Ancak floresan mikroskobu altında yapılan gözlemlerde sadece Nevşehir ve Yozgat örneklerinde hücresel örneklere rastlanılmış diğer örneklerde ise hiç hücre gözlenememiştir. Nevşehir ve Yozgat örneklerinde gözlenen sinyallerin hücre olduğundan emin olunmamakla birlikte, eğer hücre oldukları varsayılsa bile sayım yapılamayacak kadar az olduklarına kanaat getirilmiştir. Mikroskop altındaki görüntülere örnek olarak Görsel 3.7. ve Görsel 3.8. verilmiştir.



Görsel 3.7. *Nevşehir örneğinin DAPI ile boyanmış floresan mikroskop görüntüsü*



Görsel 3.8. *Nevşehir örneğinin DAPI ile boyanmış başka bir görüntüsü*

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Halofiller, hipersalin çevrelerde bulunan tuzu seven organizmalardır. Ağırlık olarak prokaryotik olmakla birlikte ökaryotik mikroorganizmalar içeren bu grup; sadece ozmotik basınçla başa çıkmakla kalmayıp, tuzun denatüre edici özelliklerine direnç gösterecek kapasiteye sahiptirler (DasSarma ve Arora, 2001, s. 1).

Ekstremofillere, yeni biyomoleküller, biyomateryaller ve metabolitler açısından birer cevher gözüyle bakılmaktadır. Haloarkeal enzimler olağandışı şekilde stabildirler ve ekstrem çevrelere adapte olmuşlardır bu yüzden; yüksek iyonik kuvvet altında gerçekleşen endüstriyel proseslere uygun birer adaydırlar (Kanekar vd., 2012, s. 1). Bu nedenle halofilik prokaryotların tanımlanması önemlidir.

Dünyada hipersalin çevreler üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Özellikle sıvı ortamlar, toprak ve diğer katı çevrelere kıyasla daha fazla çalışılmaktadır. H. Larsen 1981 yılında maden olarak çıkarılmış kaya tuzlarının bakteri içermediğini söylemiş olmasına rağmen 20. yüzyılın başlarından itibaren çok eski kaya tuzlarından halofilik mikroorganizmaların izole edildiği ara sıra bildirilmiştir (Stan-Lotter ve Fendrihan, 2011).

1994'te Denner ve diğerleri, Avusturya'da bulunan bir tuz madenine ait bir kaya tuzundan ekstrem halofilik bir arke izole etmişlerdir. Kaya tuzunun Permiyen dönemine ait olduğu bildirilmiş ve bu organizmanın 6,5 ile 9,5 pH aralığında üreme gösterebildiğini bildirmişlerdir. Bulunan organizmanın yeni bir tür olduğunu önererek *Halococcus salifodinae* ismini önermişlerdir. Organizma bu isimle literatüre girmiştir.

2002'de Stan-Lotter ve diğerleri, Avusturya'da bir tuz madeninden Permiyen döneme ait bir kaya tuzundan bir arke izole etmişler ve örneğin lipid kompozisyonuna, 16S rRNA gen sekansına, hücre şekline ve büyüme karakteristik özelliklerine bakarak örneği *Halococcus* cinsine yerleştirilerek, diğer analizler sonucu yeni bir tür olduğunu önererek, örneğin *Halococcus dombrowskii* olarak adlandırılmasını önermişlerdir. Organizma bu isimle literatürde bulunmaktadır.

2013'te Conner ve Benison, batı Avustralya'da bulunan "Lake Magic" isimli asidik-tuzlu gölde yaptıkları bir çalışmada, tuz yatağı içerisindeki "fluid inclusion"lar (Kristal içerisinde sıvı ve gazdan oluşmuş mikroskobik kabarcık) içerisindeki

mikroorganizmaları optikal petrografi, UV-vis petrografi ve lazer Raman spektrometrisi kullanarak gözlemlemişlerdir. 1-3 µm boyutunda, parlak, UV-vis aydınlatmada, yeşil gözüken, prokaryotik kok şeklinde organizmalar görüntülemişlerdir. Ayrıca 5-7 µm arasında sarı kürecikleri UV-vis aydınlatma altında mavi görünen organizmaların da *Dunaliella* algi olarak yorumlamışlardır. Gölün pH'ının 1,7 ve tuzluluk oranının %37 ve sıcaklığının da 0-50 ˚C arasında değişebildiğini bildirmişlerdir.

Albuquerque ve diğerleri 2016'da Polonya'da bir tuz madeninden aldıkları su örneğinden, kırmızı renkli, gram negatif ve kok morfolojiye sahip 2 arke izole etmiş ve bunların *Halorhabdus* cinsine ait olduğunu göstermiş. Örneklerden biri *Halorhabdus rudnickae* olarak adlandırılmasını önerek, yeni bir tür bulmuşlardır.

Ülkemizde de tuz madenlerinin prokaryotik çeşitliliğin belirlenmesine dair yapılmış çalışmalar bulunmaktadır.

Birbir ve diğerleri 2004'te yayınladıkları bir çalışmada, Tuzköy tuz madeninden izole ettikleri 12 koloni üzerinde, fenotipik karakterizasyon, lipit analizleri, antibiyotik duyarlılık testleri ve PCR amplifikasyonu uygulamışlardır. PCR sonuçlarına göre tüm strainlerin *Archaea* domaininden *Halobacteriaceae* familyasına ait olduğu görülmüştür. DGGE sonuçlarına göre 10 farklı izolat DNA sekanslaması için seçilmiştir. DNA dizilemesi ve filogenetik analizler bulunan türlerin *Halobacterium, Haloarcula, Natrinema* ve *Halorubrum* cinslerine ait olduğunu göstermiştir.

Yıldız 2008 yılında, Çankaya tuz madeninden aldığı su örneklerinden, 15 izolat elde etmiş ve bunlardan farklı hücre ve koloni morfolojisi gösteren 7 izolatı, gram reaksiyonları, hareketlilik, membran polar lipit içerikleri ve çeşitli biyokimyasal özelliklerine bakarak, 7 izolattan 2'sinin *Haloarcula* ve 3'ünün *Halorubrum* cinslerine ait olabileceğini gözlemlemiştir.

Bayrak 2010 yılında Kars, Kağızman Kaya Tuzlası'ndan elde ettiği, tuzlu toprak, tuzlu su ve tuz örneklerinden iki farklı izolat elde etmiş, ve morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve 16S rRNA sekans analizlerine göre bu iki izolatın, *Bacillus* ve *Halomonas* cinslerine ait türler olduğunu tespit etmiştir.

Özcan ve diğerleri 2012'de yayınladıkları bir çalışmada Çankaya tuz madeninden (Çankırı) elde ettikleri tuzlu su örneklerinden, geleneksel ve moleküler yöntemlerle birlikte izolasyona gitmiş, seçtikleri 8 farklı izolatın *Halorubrum, Haloarcula, Halococcus* ve *Halobacterium* cinslerine ait olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yapılan çalışmamızda farklı illerden elde edilmiş kaya tuzu örneklerinden 16 izolat elde edilmiştir. Tüm izolatlara 2 farklı DNA ekstrasyon protokolü uygulanmıştır. İzolatlardan S9, S10, S11, S12, S15 kodlu izolatların DNA'ları 2 farklı ekstrasyon yöntemi denenmesine rağmen, DNA'ları elde edilememiş, daha sonra farklı yöntemler denemek istenildiğinde ise kültürler ne sıvı ortamda ne de katı ortamda canlandırılamamıştır.

Elde edilen DNA'ların 16S rRNA bölgeleri hedeflenerek PCR ile çoğaltılması sağlanarak izolatlar arası *Archaea* ve *Bacteria* domain ayırımı yapılmıştır. 11 izolattan S2, S3 ve S4'ün *Archaea* domainine, S1, S5, S6, S7, S8, S14, S16, S17'nin ise *Bacteria* domainine ait olduğu görülmüştür. 16S PCR ürünleri daha sonra *Hinf* I ve *Mbo* I restriksiyon enzimleri ile kesilerek, elde edilen bantların oluşturduğu profillerden aynı olanlar, aynı tür kabul edilmiş, profillerden farklı bantlaşmalar gösterenler farklı tür kabul edilmiştir. ARDRA bantlaşmalarının farklılıklarına ve benzerliklerine bakıldığında sadece 3 farklı tipte bantlaşma gözlenmiştir. Öteki moleküler metotlara kıyasla ARDRA strainler arasında tür seviyesinde identifikasyona izin veren, güvenilir hızlı bir yöntemdir ve sadece minimum ekipman gerektirip özel bir cihaz gerektirmez (Hoppe-Seyler vd., 2003, s. 438).

Halofiller üzerinde çalışan mikrobiyologlar, hipersalin dünyanın çok az takdir edilmesi ve üzerinde az çalışma olması gerçeği ile karşı karşıyadırlar. Buna rağmen halofilik araştırmacılar kendi bakteriyel stoklama yöntemlerinde karşılaştıkları problemleri, halofilik olmayan mikroorganizmalar için kullanılan saklama koşullarını kullanmaktadır. Ancak bu teknikler o kadar iyi çalışmamakta olup, hipersalin mikrobiyolojinin bu önemli açısında bu konuda bir tartışma veya kılavuz bulunmamaktadır (DiFerdinando ve Vreeland, 2006, sf. 719-720). Çalışma sırasında bazı strainler izole edilip %20'lik gliserol içerisinde saf bir şekilde saklanmış olmasına rağmen, ilerleyen aşamalarda tekrar canlandırılıp kullanılmak istenildiklerinde canlandırılamamışlardır. Çeşitli saklama yöntemleri mevcut olmasına rağmen, her

zaman hangi organizma için hangi saklama yönteminin en iyisi olduğunu bilmek mümkün değildir. Gliserol ile saklama yöntemi yaygın bir yöntem olması ile birlikte 5 seneye kadar izolatların saklanmasının mümkün olduğu bir yöntemdir. Ancak bazı kaynaklarda mikrobiyologların sadece gliserolün yanı sıra, gliserolle birlikte bir miktar mikroorganizmanın izole edildiği besiyerinden de bir miktar konulup saklandıkları bildirilmiştir. Bahsedilen kaynaklarda direkt olarak halofilik organizmalardan bahsedilmediğine dikkat çekilmelidir. Öte yandan halofillerin özel durumları başlı başına problemin nedeni olabilir. Halofiller hücre bütünlülüğünü korumak için tuza ihtiyaç duymaktadırlar. Bu özel durum saklama işleminin ve sonradan canlandırma işleminin başarısız olma nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir.

Metagenomik kütüphaneler oluşturulurken, toprak ve su örneklerinden DNA ekstrasyonu için farklı protokoller izlenmiş ve amaç; moleküler analizler için, elde edilebilecek en fazla miktar, verimlilik ve uyumluluk olmuştur. Hücre lizisi için bir çok fiziksel method kullanılmıştır; dondurup-çözdürme, bead mill homojenizatör ve ultrasonikasyon gibi. Bu gibi fiziksel yöntemler örnekte bulunan tüm grup mikroorganizmalara eşit porsiyonlarda lize olma şansı tanımaktadır. Kimyasal yöntemlere kıyasla "bead beating" yönteminin daha fazla çeşitlilik gösterildiği bildirilmiştir. Bazı farklı tipteki toprak türleri için de hem fiziksel hem de kimyasal metotların birlikte uygulanmasının daha çok mikrobiyal çeşitliliğin ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir (Singh ve Satyanarayana, 2017, s. 21). Çalışmada direkt çevresel örnekten DNA ekstrasyonuna gidilmemiştir. Bunun yerine saf kültürden DNA ekstrasyonu yapılmıştır. Ancak gene benzer şekilde her DNA ekstrasyonu yönteminin her mikroorganizma için uygun olmadığı söylenebilir.

Bir yüzyılı aşkın bir şekilde bilinilmektedir ki; mikrobiyal türlerin çok büyük bir kısmı sentetik besiyerlerinde *in vitro* şekilde gelişmezler ve bu yüzden bu türler keşfedilmemiş şekilde kalırlar. Metagenomik ve rRNA yaklaşımları bu kültüre edilememiş türleri açığa çıkarmıştır. Bu "kayıp" mikrobiyal çeşitliliğe ulaşmak önemli bir ilgi odağı olmuştur çünkü hem temel bilimler için hem de uygulamalı bilimler için karşılaşılan bir aşılması gereken zorluk olmuştur (Nichols vd., 2010, s. 2445). Herhangi bir çevreye ait mikropların karmaşıklığını ve dinamiklerini anlayabilmek

için, mikrobiyal komünitelerin moleküler parmak izlerinin çıkarılması daha kolay ve daha kesin sonuç veren bir tekniktir çünkü bir çok organizma kültüre alınma prosesine direnç gösterir (Litchfield, Sikaroodi ve Gillevet, 2006, s. 513). Çalışmada sıvı ortamında erlenlerde gelişen bir çok örnek, kendine özgün yine aynı içerikteki ancak katı formdaki besiyerine ekildiğinde, izolatlar gelişmemiştir ve bu sebepten olası farklı kültürler saflaştırılamamıştır. Örneğin Yozgat örneği 6 farklı sıvı besiyerinden 4'ünde üremiş olmasına rağmen kendine ait gene aynı özgün besiyerlerinin katı formların hiçbirinde gelişmemiştir.

Kültüre alınamayan organizmalar faktörü dışında, geleneksel mikrobiyoloji yöntemleri, moleküler yöntemlere kıyasla; daha zahmetli olup, daha fazla zaman gerektirir ve buna karşılık alınan verim ise daha düşüktür. Moleküler yöntemler ise geleneksel yöntemlere kıyasla; daha hızlı, az zahmetli, daha hassas, spesifik ve etkilidir (Adzitey, Huda ve Ali, 2013, s. 98). Özellikle son yıllarda kültüre alınmadan direkt genomların elde edilip, genomlar üzerinden yapılan çalışmalar, mikrobiyal komünite çalışmaları arasında popüler bir yaklaşım tekniği olmuştur. Karışık komünitelerden direkt toptan olarak mikrobiyal DNA'nın izole edilip sekanslanması, potansiyel olarak mikrobiyal genlerin tümüne erişim ve bu genlerin tekrar bir araya getirilme işlemine izin verir. Ancak bu çabalardan sonra genomları kapatmak "microheterogeneity" (Mikro-çok türellik) nedeniyle son derece zordur. Öte yandan kültüre alma işlemi metagenomiğin ortaya koyduğu teorisel bulguları destekleyecek kompozisyon sunar (Nichols, 2007, s. 351).

DAPI (4’,6’-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) floresan bir boya olup, çift sarmallı DNA'nın tercihen A-T bağlarının zengin olduğu bölgelerine bağlanır. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, deniz bakterilerine karşı spesifik olmayan bir şekilde etki gösterildiğine, bazı durumlarda da DNA'ya daha az etkili bir şekilde bağlandığı bildirilmiştir. Ancak ekstrem halofilik arkelerin başarılı bir şekilde de DAPI ile boyandığı bilinmektedir. Haloarkelerin boyanmasında özel problemlerle karşılaşıldığı bilinmektedir. Örneğin; *Halococci* kalın hücre duvarına sahip olduğundan, fiksasyon ve etanol ile geçirgenlik sağlanmasından sonra DAPI ile boyanabilirken, diğer haloarkeler (örnek verilecek olursa; *Halobacterium, Haloarcula, Haloferax, Halorubrum* cinslerine ait türler) prosedür sırasında, hücre duvarının olmayışından ve dış çeperlerin

hassaslığından ötürü parçalanmaktadırlar. Bu cinsteki bakteriler için modifiye DAPI protokolleri uygulanmaktadır (Stan-Lotter vd., 2006, s. 574). Çalışmada, saf su içerisinde çözülen kaya tuzu örneklerinin, homojen olarak çözünüp protokolün basamaklarından birinde filtre edilmesine rağmen, FISH ve DAPI görüntülerinde tuz kristallerine rastlanılmıştır. Yapılan mikroskobik gözlemler sırasında sadece Nevşehir ve Yozgat örneklerinde hücresel örneklerle karşılaşılmıştır. Görüntülerde hücrelerin homojen bir şekilde filtre üzerinde yayılmadığı dikkat çekmiştir.

Bu çalışmada; kültüre edilebilir prokaryotlar izole edilmeye çalışılmış, elde edilen izolatlardan da moleküler yöntemler kullanılarak identifikasyona gidilmiştir. ARDRA sonucunda 16 izolatın, 3 farklı profil gösterdiği gözlemlenmiştir. 16 izolattan 5 temsilci seçilip dizi analizine gönderilmiştir. BLAST sonuçlarına göre 5 izolatta 3 farklı tür gözlemlenmesi beklenirken, 4 farklı tür gözlemlenmiştir. 5 izolattan 1'i *Halobacterium* cinsine, diğer 4'ünün ise *Oceanobacillus* cinsine ait türler olduğu gözlemlenmiştir.

16S rDNA analizlerinde, referans ile karşılaştırılan örnek arasında %97'den az benzerlik varsa, genelde bu örnek yeni bir takson olarak kabul edilmektedir. Ancak 16S rDNA gen sekans analizlerinin her zaman güvenilir olmadığı da, kanıtlanmıştır. Aynı cinse ait farklı türler arasında 16S rRNA gen sekansları özdeş olan örnekler de vardır.

S2 izolatının gen bankasındaki *Halobacterium* sp. ile %95 benzerlik göstermesi ve eşleşen baz sayısı miktarı dikkate alındığında (1236/1303) bu izolatın yeni bir takson olabileceği düşünülmektedir. Diğer izolatlar için benzer bir durum söz konusu olmamakla birlikte, tüm izolatlar için biyokimyasal testler, antijen-antikor testleri gibi diğer geleneksel yöntemler kullanılarak moleküler ve geleneksel yöntemlerin sonuçlarının tutarlılığı ve farklılığı ortaya konulabilir.

Mikrobiyal komünite yeryüzündeki biyolojik çeşitliliğin üçte ikisini oluşturmaktadır. Mikroorganizmaların %99'dan fazlası standart teknikler ile kültüre edilememektedirler (Singh ve Satyanarayana, 2017, s. 21). Kültüre edilememe durumu, "asla kültüre edilemeyecek" anlamına gelmemektedir. Sadece şu anki biyolojileri hakkında, kritik bilgilere sahip olmadığımız anlamına gelmektedir. Çoğu kültüre edilemeyen mikroorganizmanın gelecekte kültüre edileceği kesindir (Stewart, 2012, s. 4151). Kültür bağımsız çalışmalar (çoğunlukla 16S rRNA çalışmaları) göstermiştir ki; bu "daha

kültüre edilememiş" bakterilerin, *Eubacteria* ve *Archea* domainleri içinde, yeni sınıflara ve şubelere ait oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca bu çalışmalar daha önceden çok iyi karakterize edilmiş olan, diş plağı, deniz suyu ve bahçe toprağı gibi ortamlarda bile yeni bakteriyel örneklerin bulunmasına neden olmuştur (Sharma vd., 2005, s. 72).

Şu ana kadar yayınlanmış prokaryotik tür sayısı 19.000 civarındadır (DSMZ, 2017). Kültür bağımsız teknikler, gelişmiş düzeyde olmasına rağmen, daha kültüre edilememiş prokaryotların fizyolojisi hakkında bize sadece kısıtlı bilgi verir. Bu yüzden daha kültüre edilememiş mikroorganizmaların, üzerinde fizyolojik ve moleküler analizler yapılmadıkça bu organizmaları tam anlamıyla takdir etmek mümkün değildir (Overmann, 2006, s. 80)

Kültür bağımlı yaklaşımlar ve kültür bağımsız yaklaşımlar hem birbirini tamamlar hem de karşılaştırma yapılması için bir olanak sağlar.

Sonuç olarak;

1. 6 farklı ilden elde edilmiş 6 farklı kaya tuzu üzerinden kültüre edilebilir bakteriler izole edilmiş ve moleküler yöntemler kullanılarak tür seviyesinde identifikasyona gidilmiştir.
2. Örneklerdeki doğal mikroorganizma sayısını gözlemleyebilmek amacı ile FISH ve DAPI prosedürleri uygulanmış. Nevşehir ve Yozgat örneklerinde hücre benzeri yapılar görülmüş ancak bu yapıların hücre olunduğundan emin olunmamakla birlikte bunların hücre olduğu varsayılsa bile sayım yapılamayacak kadar az olduklarına kanaat getirilmiştir. Bununla birlikte Kars ve Kırşehir örneklerinin sıvı besiyeri ile zenginleştirildiğinde üreme gözlendiği de göz ardı edilmemelidir.

Kars ve Kırşehir örneklerinden elde edilen izolatların DNA'sı çıkartılamadığından, ileriki çalışmalarda farklı protokoller kullanılarak DNA'larının çıkarılarak identifikasyona gidilmesini önermekle birlikte, bu izolatların bu çalışmada kullanılan saklama koşulları ile saklanamadığına dikkat edilmesi gerektiğini bildiririz.

Yozgat örneği 4 farklı sıvı besiyerinde üremesine ve FISH / DAPI mikroskobik incelemelerinde hücresel yapılar gözlemlenmesine rağmen, katı besiyeri üzerinde

gelişme göstermemiştir. İleriki çalışmalarda farklı besiyerleri kullanılarak ve/veya farklı büyüme şartları sağlanarak bu hücrelerin izole edilmesi hedeflenebilir.

Erzurum ve Çankırı örneklerinde, hiçbir besiyerinde, ürememe gözlemlenmemiştir. FISH ve DAPI mikroskobik incelemelerinde de hücreye rastlanmamıştır. Çalışmada FISH ve DAPI komplikasyonları olabileceğinden buradan bu örneklerde "prokaryotik hücre yok" anlamı çıkarılmamalıdır ve farklı izolasyon yöntemleri, besiyerleri ve ortam şartları sağlanarak tekrardan izolasyon çalışmaları yapılmalıdır.

Örneklerden direkt olarak mikrobiyal DNA izolasyonuna gidilerek, bu DNA'lardan dizi analizine gidilerek bu örnekler içerisindeki şimdilik kültüre edilemeyen mikroorganizmaların tanımlanması mümkün olabilir.

KAYNAKÇA

Adzitey, F., Huda, N. ve Ali, G. R. R. (2013). Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech*, 3 (2), 97-107.

Ağaçfidan, A. ve Badur, S. (2002). Antijen - Antikor Reaksiyonları ve İndirekt Tanı Yöntemleri. E. Bozkaya (Ed.), *Tıbbi Mikrobiyoloji -1-* içinde. (s. 285-297). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Aksel, A. (2014). *Iğdır Bölgesinde Çıkarılan Kaya Tuzu Örneklerindeki Bazı Eser Metallerin ICP-MS ile Analizi*. Yüksek Lisans Tezi. Kars: Kafkas Üniversitesi.

Albano, H., Henriques, I., Correia, A., Hogg, T., Teixeira, P. (2008). Characterization of microbial population of 'Alheira' (a traditional Portuguese fermented sausage) by PCR-DGGE and traditional cultural microbiological methods. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (6), 2187-2194.

Albuquerque, L., Kowalewicz-Kulbat, M., Drzewiecka, D., Staczek, P., d'Auria, G., Roselló-Móra, R. Costa, M. (2016). Halorhabdus rudnickae sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a salt mine borehole in Poland. *Systematic and Applied Microbiology*, 39 (2), 100-105.

Aljohny, B. O. (2015). Halophilic Bacterium - A Review of New Studies. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12 (3), 2061-2069.

Amann, R. I., Ludwig, W., ve Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 143-169.

Amann, R. ve Ludwig, W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nuc1eic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 555-565.

Antón, J., Llobet-Brossa, E., Rodríguez-Valera, F., Amann, R. (1999). Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Enviromental Biology*, 1 (6), 517-523.

Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., Roselló-Móra, 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

Apetroaie, C., Andersson, M. A., Spröer, C., Tsitko, I., Shaheen, R., Jääskeläinen, E. L., Wijnands, L. M., Heikkilä, R., Salkinoja-Salonen, M. S. (2005). Cereulide-producing strains of Bacillus cereus show diversity. *Archieves of Microbiology*, 184 (3), 141-151.

Aslanzadeh, J. (2006). Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. Y. Tang ve C. W. Stratton (Eds.), *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* içinde (s. 84-116). A.B.D.: Springer.

Barutoğlu, Ö. H. (Tarihsiz). Türkiye Tuz Yatakları. http://www.maden.org.tr/resimler/ekler/22.pdf (Erişim tarihi: 19.05.2017)

Berquist, B. R., Müller, J. A. ve DasSarma, S. (2006). Genetic Systems for Halophilic Archaea. F. A. Rainey ve A. Oren (Eds.), *Extremophiles - Methods in Microbiology Volume 35* içinde. (s. 649-680). İspanya: Elsevier.

Bertoldo, C. ve Antranikian, G. (2009). Biotechnology of Archaea. H. W. Doelle, S. Rokem ve M. Berovic (Eds.), *Biotechnology - Volume IX: Fundamentals in Biotechnology* içinde. (s. 186-219). Singapur: EOLSS.

Birbir, M., Ogan, A., Calli, B. Mertoglu, B. (2004). Enzyme Characteristics of Extremely Halophilic Archaeal Community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 (6), 613-621.

Bouchet, V., Huot, H. ve Goldstein R. (2008). Molecular Genetic Basis of Ribotyping. *Clinical Microbiology Reviews*, 21 (2), 262-273.

Bunn, T. W. ve Sikarwar, A. S. (2016). Diagnostics: Conventional Versus Modern Methods. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 8 (4), 1-7.

Campbell, S. ve Landry, M. L. (2006). Rapid Antigen Tests. Y. Tang ve C. W. Stratton (Eds.), *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* içinde (s. 23-41). A.B.D.: Springer.

Conner, A. J. ve Benison, K. C. (2013). Acidophilic Halophilic Microorganisms in Fluid Inclusions in Halite from Lake Magic, Western Australia. *Astrobiology*. 13 (9), 850-860.

DasSarma, S. ve Arora, P. (2001) Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9.

DasSarma, S. (2006). Extreme Halophiles Are Models for Astrobiology. *Microbe*, 1(3), 120-126.

DeLong, E. (1992). Archaea in costal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 5685-5689.

Demergasso, C., Casamayor, E. O., Chong, G., Galleguillos, P., Escudero, L., Pedrós-Alió, C. (2004). Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiology Ecology*, 48 (1), 57-69.

Denner, E. B. M., McGenity, T. J., Busse, H., Grant, W. D., Wanner, G., Stan-Lotter, H., (1994). Halococcus salqodinae sp. nov., an Archaeal Isolate from an Austrian Salt Mine. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44 (4), 774-780.

Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). (2017). Prokaryotic nomenclature up-to-date. http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html (Erişim tarihi: 19.05.2017)

DiFernidando, J. ve Vreeland, R. H. (2006). Storage of Halophilic Bacteria. F. A. Rainey ve A. Oren (Eds.), *Extremophiles - Methods in Microbiology Volume 35* içinde. (s. 719-730). İspanya: Elsevier.

Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (10), 3623-3630.

Dyall-Smith, M. (2009). The Halohandbook: protocols for haloarcheal genetics. http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/Halohandbook_2009_v7.2mds.pdf (Erişim tarihi: 19.05.2017)

Fakruddin, M. D., Mannan, K. S. B., Mazumdar, R. M., Chowdhury, A. Hossain, M. D. N. (2013). Identification and characterization of microorganisms: DNA-fingerprinting methods. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 35 (4), 397-404.

Fendrihan, S., Legat, A., Pfaffenhuemer, M., Gruber, C., Weidler, G., Gerbl, F., Stan-Lotter, H. (2006). Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 5(2-3), 203-218.

Fendrihan, S., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gerbl, F. W., Holzinger, A., Grösbacher, M., Briza, P., Erler A., Gruber, C. Plätzer, K., Stan-Lotter, H. (2012). Spherical particles of halophilic archaea correlate with exposure to low water activity – implications for microbial survival in fluid inclusions of ancient halite. *Geobiology*, 10 (5), 424-433.

Galinski, E. A. (1995). Osmoadaptation in Bacteria. R. K. Poole (Ed.), *Advances in Microbial Physiology* içinde. (s. 273-319). A.B.D.: Academic Press.

Goris, J., Konstantinidis K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J. M. (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 81-91.

Grant, W. D., Gemmell, R. T., McGenity, T. J. (1998). Halobacteria: the evidence for longevity. *Extremophiles*, 2, 279-287

Henriet, O., Fourmentin, J., Delincé, B., Mahillon, J. (2014). Exploring the diversity of extremely halophilic archaea in food-grade salts. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 36-44.

Hoppe-Seyler, T. S., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W. H. , Geis, A., Heller, K. J. (2003). Identification and Differentiation of Species and Strains of Arthrobacter and Microbacterium barkeri Isolated from Smear Cheeses with Amplified Ribosmal DNA Restriction Analysis (ARDRA) and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 438-444.

Jaakkola, S. T., Zerulla, K., Guo, Q., Liu, Y., Ma, H. Yang, C., Bamford, D. H., Chen, X., Soppa, J. Oksanen, H. M. (2014). Halophilic Archaea Cultivated from Surface Sterilized Middle-Late Eocene Rock Salt Are Polyploid. *PLoS One*, 9 (10), 1-9.

Jaakkola, S. T., Ravantti, J. J., Oksanen, H. M., Bamford, D. H. (2016). Buried Alive: Microbes from Ancient Halite. *Trends in Microbiology*, 24 (2), 148-160.

Janda, J. M. ve Abbott, S. L. (2002). Bacterial Identification for Publication: When is Enough Enough?. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (6), 1887-1891.

Janda, J. M. ve Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (9), 2761-2764.

Juez, G. (2004). Extremely Halophilic Archea: Insights into Their Response to Environmental Conditions. A. Ventosa (Ed.), *Halophilic Microorganisms* içinde (s. 243-250). Berlin: Springer.

Kanekar, P. P., Kanekar, S. P., Kelkar, A. S., Dhakephalkar, P. K. (2012). Halophiles - Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications. T. Satyanarayana, B.N. Johri, A. Prakash (Eds.), *Microorganisms in Environmental Management* içinde (s. 1-34). Hollanda: Springer.

Kim, K. K., Lee, K. C., Lee, J. (2011). Halogranum salarium sp. nov., a halophilic archaeon isolated from sea salt. *Systematic and Applied Microbiology*, 34 (8), 576-580.

Kunte, H. J. (2007). Osmoregulated solute transport in halophilic bacteria. A. Ventosa (Ed.), *Halophilic Microorganisms* içinde (s. 155-165). Almanya: Springer.

Kunte, H. J. (2009). Osmoregulation in Halophilic Bacteria. C. Gerday ve N. Glansdorff (Eds.), *Extremophiles (Volume 2)* içinde (s. 263-277). İngiltere: EOLLS.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. E. Stackebrand ve M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* içinde (s. 115-175). A.B.D.: John Wiley and Sons.

Laupland, K. B. ve Valiquette, L. (2013). The Changing Culture of the Microbiology Laboratory. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 24 (3), 125-128.

Litchfield, C. D., Sikaroodi, M. ve Gillevet, P. M. (2006). Characterization of Natural Communities of Halophilic Microorganisms. F. A. Rainey ve A. Oren (Eds.), *Extremophiles - Methods in Microbiology Volume 35* içinde. (s. 513-533). İspanya: Elsevier.

Loeffelholz, M. ve Deng, H. (2006). PCR and Its Variations. Y. Tang ve C. W. Stratton (Eds.), *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* içinde (s. 166-183). A.B.D.: Springer.

Ludwig, W. (2010). Molecular Phylogeny of Microorganisms: Is rRNA Still a Useful Marker? A. Oren ve R. T. Papke (Eds.), *Molecular Phylogeny of Microorganisms* içinde (s. 65-84). İngiltere: Caister Academic Press.

Ma, Y., Galinski, E. A., Grant, W. D., Oren, A., Ventosa, A. (2010). Halophiles 2010: Life in Saline Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (21), 6971-6981.

Madigan, M. T. ve Martinko, J. M. (2010). Evrimsel Mikrobiyoloji ve Mikrobiyal Çeşitlilik. C. Çökmüş (Ed.) *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi* içinde (s. 321). Türkiye: Palme Yayıncılık.

Malorny, B., Tassios, P. T., Rådström, P., Cook, N., Wagner, M., Hoorfar, J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 83 (1), 39-48.

McGenity, T. J., Gemmell, R. T., Grant, W. D., Stan-Lotter, H. (2000). Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environmental Microbiology*, 2 (3), 243-250.

Moldenhauer, J. (2008). Overview of Rapid Microbiological Methods. M. Zourob, S. Elwary ve A. Turner (Eds.) *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems* içinde (s. 49-75). A.B.D.: Springer.

Mormile, M. R., Biesen, M. A., Gutierrez, M. C., Ventosa, A., Pavlovich, J. B., Onstott, T. C., Fredrickson, J. K. (2003). Isolation of Halobacterium salinarum retrieved directly from halite brine inclusions. *Environmental Microbiology*, 5 (11), 1094-1102.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S., Pfaller, M. A. (2002). Bacterial Classification. W. Schmitt ve L. L. Grigg (Eds.) *Medical Microbiology* içinde (s. 7-11). A.B.D.: Mosby.

Nichols, D. (2007). Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiology Ecology*, 60 (3), 351-357.

Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., Epstein, S. S. (2010). Use of Ichip for High-Throughput In Situ Cultivation of "Uncultivable" Microbial Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (8), 2445-2450.

Norton, C. F. ve Grant, W.D. (1988). Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystals. *Journal of General Microbiology*, 134, 1365-1373.

Olsen, J. E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P. E., Popovic, T., Rasmussen, H. N., Olsvik, O. (1995). Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 28 (1), 1-78.

Onyenwoke, R. U., Brill, J. A., Farahi, K., Wiegel, J. (2004). Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (Firmicutes). *Archives of Microbiology*, 182 (2), 182-192.

Oren, A. ve Litchfield, C. D. (1999). A procedure for the enrichment and isolation of Halobacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 173, 353-358.

Oren, A. (2002a). Adaptation of Halophilic Archaea to Life at High Salt Concentrations. A. Läuchli ve U. Lüttge (Eds.), *Salinity: Environment — Plants — Molecules* içinde (s. 81-96). Hollanda: Kluwer Academic Publishers.

Oren, A. (2002b). Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 39, 1-7.

Oren, A. (2002c). Taxonomy of Halophilic Microorganisms: Archaea, Bacteria, and Eucarya. J. Seckbach (Ed.), *Halophilic Microorganisms and their Environments - Cellular Origin and Life in Extreme Habitats* içinde (s. 23-57). Hollanda: Kluwer Academic Publishers.

Oren, A. (2006). The Order Halobacteriales. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Third edition, Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* içinde (s. 113-164). A.B.D.: Springer.

Oren, A. (2007). Biodiversity in Highly Saline Environments. C. Gerday ve N. Glansdorrf (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Extremophiles* içinde (s. 223-231). A.B.D.: ASM Press.

Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4 (2), 1-13.

Oren, A. (2011). Diversity of Halophiles. K. Horikoshi (Ed.), *Extremophiles Handbook* içinde (s. 309-326). Japonya: Springer.

Oren A. (2014). Halophilic archaea on Earth and in space: growth and survival under extreme conditions. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 372 (2030)

Oren, A. (2014). Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles*, 18 (5), 825-834.

Oren, A. (2016). Life in High-Salinity Environments. M. Yates, C. Nakatsu, R. Miller, S. Pillai (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology, Fourth Edition* içinde (s. 4.3.2 - 1-13). A.B.D.: ASM Press.

Overmann, J. (2006). Principles of Enrichment, Isolation, Cultivation and Preservation of Prokaryotes. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Third edition, Volume 1: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology* içinde (s. 80-136). Singapore: Springer.

Özşen, H. (2009). *Kaya Tuzuna Ait Kısa ve Uzun Dönemli Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Matematiksel Modellenmesi*. Doktora Tezi. Konya: Selçuk Üniversitesi.

Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G., Imhoff, J. F. (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbial Ecology*, 11 (2), 107-115.

Ruiz-Ruiz, C., Srivastava, G. K., Carranza, D., Mata, J. A., Llamas, I., Santamaría, Quesada, E., Molina, I. J. (2011). An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium Halomonas stenophila strain B100 selectively induces apoptosis in human T leukaemia cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (2), 345-355.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 (4732), 1350-1354

Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis,T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

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.

Scheu, P. M., Berghof, K. ve Stahl, U. (1998). Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, 15 (1), 13-31.

Sharma, R., Ranjan, R., Kapardar, R. K., Grover, A. (2005). 'Unculturable' bacterial diversity: An untapped resource. *Current Science*, 89 (1), 72-77.

Shivanand, P. ve Mugeraya, G. (2011). Halophilic bacteria and their compatible solutes – osmoregulation and potential applications. *Current Science*, 100 (10), 1516-1521.

Singh, B. ve Satyanarayana, T. (2017). Basic Microbiology. A. Pandey ve J. Teixeira (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Foundations of Biotechnology and Bioengineering* içinde (s. 1-31). Hollanda, İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri: Elsevier.

Stackebrandt, E. (2006). Defining Taxonomic Ranks. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Third edition, Volume 1: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology* içinde (s. 29-57). Singapore: Springer.

Stan-Lotter, H., Pfaffenhuemer, M., Legat, A., Busse, H., Radax, C., Gruber, C. (2002). Halococcus dombrowskii sp. nov., an archaeal isolate from a Permian alpine salt deposit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1807-1814.

Stan-Lotter, H., Leuko, S., Legat, A., Fendrihan, S. (2006) The Assessment of the Viability of Halophilic Microorganisms in Natural Communities. F. A. Rainey ve A. Oren (Eds.), *Extremophiles - Methods in Microbiology Volume 35* içinde. (s. 570-584). İspanya: Elsevier.

Stan-Lotter, H. ve Fendrihan, S. (2015). Halophilic Archaea: Life with Desiccation, Radiation and Oligotrophy over Geological Times. *Life*, 5(3), 1487-1496.

Stewart, E. J. (2012). Growing Unculturable Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194 16), 4151-4160.

Takashina, T., Hamamoto, T., Otozai, K., Grant, W. D., Horikoshi, K. (1990). Haloarcula japonica sp. nov., a new triangular halophilic archaebacterium. *Systematic and Applied Microbiology*, 13 (2), 177-181.

Trüper, H. G. ve Schleifer, K. (2006). Prokaryote Characterization and Identification. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Third edition, Volume 1: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology* içinde (s. 58-79). Singapore: Springer.

Ventosa, A. ve Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11 (1), 85-94.

Ventosa, A. Nieto, J. J. ve Oren, A. (1998). Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62 (2), 504-544.

Ventosa, A. ve Arahal, D. R. (1999). Microbial Life in the Dead Sea. J. Seckbach (Ed.), *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments - Cellular Origin*

and Life in Extreme Habitats içinde (s. 359-368). Hollanda: Kluwer Academic Publishers.

Ventosa, A. ve Arahal, D. R. (2009). Halophily (Halophilism and Halophilic Microorganisms). C. Gerday ve N. Glansdorff (Eds.), *Extremophiles (Volume 2)* içinde (s. 233-246). İngiltere: EOLLS.

Ventosa, A. ve Arahal, D. R. (2009). Physico-chemical Characteristics of Hypersaline Environments and Their Biodiversity. C. Gerday ve N. Glansdorff (Eds.), *Extremophiles (Volume 2)* içinde (s. 247-262). İngiltere: EOLLS.

Ventosa, A., de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., Papke, R. T. (2015). Microbial diversity of hypersaline environments:a metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 80-87.

Viver, T., Cifuentas, A., Díaz, S., Rodríguez-Valdecantos, G., González, B., Antón, J., Roselló-Móra, R. (2015). Diversity of extremely halophilic cultivable prokaryotes in Mediterranean, Atlantic and Pacific solar salterns: Evidence that unexplored sites constitute sources of cultivable novelty. *Systematic and Applied Microbiology*, 38 (4), 266-275.

Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D. ve Powers, W. D. (2000). Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407, 897-900.

Woese, C. R. ve Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (11), 5088-5090.

EKLER

EK-1. S2 İzolatı BLAST sonucu

```
Halobacterium sp. Q37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: KJ644181.1Length: 1457Number of Matches: 1
Related Information
Range 1: 44 to 1324
Alignment statistics for match #1

Score              Expect    Identities        Gaps           Strand
2015 bits(1091)    0.0       1236/1303(95%)    22/1303(1%)    Plus/Minus

Query  288   AGGGACGTAATCACCCGGCGCGCTTATTGACACCGCGACTACTACCGAATCCAAGCATTC  347
             |||||||||  |||||   ||||||||   |||||  |||||  ||||||||||||||  ||  |||
Sbjct  1324  AGGGACGTATTCACC--GCGCGCTT-CTGACA-CGCGATTACTACCGAATCCA-GC-TTC  1271

Query  348   ATGAGGGCGGACTTTCAGCCCTCAATCCGGAACTACGATCGAGTTAAAGAAATTACCGCC  407
             ||||||||  ||  ||||||||||||||||  ||||||||||||||||  |  ||  ||||  ||||
Sbjct  1270  ATGAGGGC-GAGTTTCAGCCCTCAATCCG-AACTACGATCGAGTTTAGGAGATTAGCGCC  1213

Query  408   CTCCTCACGGGAGTTGCATCCCATTGTCTCTGGACCATTGTAGCCCGCGTGTTGCCCAGT  467
              |||||  |  ||||||||||||||||||||  |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1212  -TCCTCTC-GGAGTTGCATCCCATTGTCTC--GACCATTGTAGCCCGCGTGTTGCCCAG-  1158

Query  468   CTCATTCTGGGGCATAATGACCTAACCGTTGCCCGTTCCTTCCTTCCGCTTTAGCAGCCG  527
             |||||||  ||||||||  |||||||  ||||||||||||||||||  ||||||||||||||  |
Sbjct  1157  CTCATTC-GGGGCATACTGACCTA-CCGTTGCCCGTTCCTTCCT-CCGCTTTAGCAGC-G  1102

Query  528   GCAGTCCACCTTAATGTACCCAGCTACCCAAAAGGGTACTGCTGGAAATTAGGAGTGCGG  587
             ||||||||||  ||||||||||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct  1101  GCAGTCCACCT-AATGTACCCAGCTACCCAAA-GGGTACTGCTGGCAATTAGGAGTGCGG  1044

Query  588   GTCTCGCTAGTTGCCTGACTTAACAGGACGCCTCACGGAACGAGCTGACGGCGGCCATGC  647
             ||||||||  |||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||||||||||
Sbjct  1043  GTCTCGCTCGTTGCCTGACTTAACAGGACGCCTCACGGTACGAGCTGACGGCGGCCATGC  984

Query  648   ACCTCCTCTCAGTAGCATCGGGTAAGGTCATCAACCTGACCGGTCATTACTACTGGCGAA  707
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||  ||  |
Sbjct  983   ACCTCCTCTCAGTAGCATCGGGTAAGGTCATCAACCTGACCG-TCATTACTACTGTCGGA  925

Query  708   GCTGGTGAGATGTCCGGCGATGAGTCCAATTAAACCGCAGGCTCCTCCGGTTGTAGTGCT  767
             ||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  924   GCTGGTGAGATGTCCGGCGTTGAGTCCAATTAAACCGCAGGCTCCTCCGGTTGTAGTGCT  865

Query  768   CCCCCGCCAATTCCTTTAAGTACCATCCTTGCAGACGTACTTCCCAGGCGGCCCGCTTCT  827
             ||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  864   CCCCCGCCAATTCCTTTAAGTTTCATCCTTGCAGACGTACTTCCCAGGCGGCCCGCTTCT  805

Query  828   CGGCTTCCCTACGGCACAGCGCAGGCTCGTAGCCTGCGCCACACCTAGCGGGCATCGTTT  887
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  804   CGGCTTCCCTACGGCACAGCGCAGGCTCGTAGCCTGCGCCACACCTAGCGGGCATCGTTT  745

Query  888   ACAGATAGGACTACCCGGGTAACTAATCCGGTTCGAGACCCTAGCTTACCTCCCTCACTG  947
             ||||  ||||||||||||||||  |||||||||||||||||||||||||  |  ||||||||||
Sbjct  744   ACAGCTAGGACTACCCGGGTATCTAATCCGGTTCGAGACCCTAGCTTTCGTCCCTCACTG  685

Query  948   ACGGATCCGTCCTCCTGAGGCGCTTTCGCCACCGGTGGTCCGTCCAGGATTACAGGATTT  1007
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  684   TCGGATCCGTCCTCCTGAGGCGCTTTCGCCACCGGTGGTCCGTCCAGGATTACAGGATTT  625

Query  1008  CACTCCTACCCCGGACGTAACCCTCAGGTCTTCCGGTCCCAAGCCGAACAGTTTCCGCTG  1067
             ||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  624   CACTCCTACCCCGGACGTACCCCTCAGGTCTTCCGGTCCCAAGCCGAACAGTTTCCGCTG  565

Query  1068  GACGCCTGATCGTTAAGCCAACACATTTCCCAACGGACTTGTCCGGCAAGCTACGGACGC  1127
             ||||||||  |||||||||  ||||  ||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||
Sbjct  564   GACGCCTGCTCGTTAAGCGAACAGATTTCCCAACGGACTTGTCCGGCCAGCTACGGACGC  505

Query  1128  TCTAGGCCCAATAATATCGGCCATCACTCGGGCTGCCGCTATTACCGAGGCGGCAGGCAC  1187
             |  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||  |||||||  |||||
Sbjct  504   TTTAGGCCCAATAATATCGGCCATCACTCGGGCTGCCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCAC  445

Query  1188  CGATCTTGCCCAGCCCTTATTCGTACACCACCTTACCGTGTACAAAAGTCGAAGGCTCTA  1247
             ||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||  ||||||||||
Sbjct  444   CGGTCTTGCCCAGCCCTTATTCGTACACCACCTTACGGTGTACAAAAGT-GAAGGCTCTA  386
```

```
Query  1248  TGCCTTCACAATCGGAGTCCCCTGATCGCACTTGCGTAAACTGTAAAGGTTTCGCGCCTG  1307
             |||||||||| |||||||||||| |||||||||||||| | ||||||||||||||||||||
Sbjct  385   TGCCTTCACACTCGGAGTCCCCTTATCGCACTTGCGTACAGTGTAAAGGTTTCGCGCCTG  326

Query  1308  CTGCGCCCCGTAAGGCCCGGAATCTTGTCTCAGAATCCGTCTCCGGGCTCTTGCTCTCAC  1367
             |||||||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  325   CTGCGCCCCGTAGGGCCCGGAATCTTGTCTCAGATTCCGTCTCCGGGCTCTTGCTCTCAC  266

Query  1368  AACCCGCACCGATTATTGGCACGGTGGGCCCTTACCCCACCGTCTACCTAATCGACCGCA  1427
             |||||| |||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  265   AACCCGTACCGATTATTGGCACGGTGGGCCGTTACCCCACCGTCTACCTAATCGACCGCA  206

Query  1428  GCCACATCCTGTGGCGCCGTATGCGTTTCCAGCTCCGCCCGTTCCAGGGGTGGAGCGTTA  1487
             |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  205   GCCACATCCTGTGGCGCCGTA-GCGTTTCCAGCTCCGCCCGTTCCAGGGGTGGAGCGTTA  147

Query  1488  TTGGGAATTAGCCTCAGTTTCCCGAGATTGTTCCCATCCACAGGGAAGTTTGGCCACGTG  1547
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||
Sbjct  146   TTGGGAATTAGCCTCAGTTTCCCGAGATTGTTCCCATCCACAGGGTAGTTTGGCCACGTG  87

Query  1548  TTACGGAGCTTTCCGCTGCGGGGCTAAACCCGCACAACTAGCA  1590
             |||| ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  86    TTACTGAGCTTTCCGCTGCGGGTCTAAACCCGCACAACTAGCA  44
```

EK-2. S6 İzolatı BLAST sonucu

```
Oceanobacillus iheyensis partial 16S rRNA gene, isolate HL2RS17
Sequence ID: LT797514.1Length: 1426Number of Matches: 2
Related Information
Range 1: 613 to 1236
Alignment statistics for match #1

Score           Expect   Identities     Gaps         Strand
1085 bits(587)  0.0      615/628(98%)   4/628(0%)    Plus/Minus

Query  815   TTGAAGCCCGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCT  874
             ||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1236  TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCT  1177

Query  875   TCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGA  934
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1176  TCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGA  1117

Query  935   TCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAA  994
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1116  TCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAA  1057

Query  995   CCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAACTCTATCTCTAGAGTGTTCAGAG  1054
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1056  CCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAACTCTATCTCTAGAGTGTTCAGAG  997

Query  1055  GATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGC  1114
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  996   GATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGC  937

Query  1115  TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG  1174
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  936   TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG  877

Query  1175  AGTGCTTAATGCTTTAACTTCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCTAACACCTAGCACTCA  1234
             |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  876   AGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCTAACACCTAGCACTCA  817

Query  1235  TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCC  1294
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  816   TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCC  757

Query  1295  TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCACCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTAC  1354
             |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  756   TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTAC  697

Query  1355  GCATTTCACCGCTACACGTGGAAATCCACTCACCCTCTTCTGCACTCAAGTTTTCCCAGT  1414
             |||||||||||||||||||||| ||||||| || |||||||||||||||||  |||||||
Sbjct  696   GCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCC-TCTTCTGCACTCAAGTTC-CCCAGT  639

Query  1415  TTCAAATGCATGGTTTACGGTTGGAGCC  1442
             ||| |||||| | |||||||||| ||||
Sbjct  638   TTCCAATGCACG-TTTACGGTTG-AGCC  613
```

EK-3. S7 İzolatı BLAST sonucu

```
Oceanobacillus iheyensis partial 16S rRNA gene, isolate HL2RS17
Sequence ID: LT797514.1Length: 1426Number of Matches: 1
Related Information
Range 1: 467 to 1294
Alignment statistics for match #1

Score            Expect   Identities     Gaps          Strand
1352 bits(732)   0.0      812/847(96%)   20/847(2%)    Plus/Minus

Query  782   AGAATGGTTTTGTGGGATTTGCTTGACCTCGCGGGTTCGCTTCCCTTTGTTCCATCCATT  841
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1294  AGAATGGTTTTGTGGGATTTGCTTGACCTCGCGGGTTCGCTTCCCTTTGTTCCATCCATT  1235

Query  842   GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTC  901
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1234  GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTC  1175

Query  902   CTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATC  961
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1174  CTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATC  1115

Query  962   AAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC  1021
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1114  AAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC  1055

Query  1022  ATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAACTCTATCTCTAGAGTGTTCAGAGGA  1081
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1054  ATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAACTCTATCTCTAGAGTGTTCAGAGGA  995

Query  1082  TGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTT  1141
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  994   TGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTT  935

Query  1142  GTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAG  1201
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  934   GTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAG  875

Query  1202  TGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAGGGGCGGGAAACCCCCTAACACCTAGCACTCAT  1261
             |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  874   TGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAGGGGCGG-AAACCCCCTAACACCTAGCACTCAT  816

Query  1262  CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCT  1321
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  815   CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCT  756

Query  1322  CAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTGCCTCCACATCTCTAC  1381
             |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  755   CAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCC-TTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTAC  697

Query  1382  GCATTTCACCGCTACACGTGGAAATTCCACTCTCCTCTTCCTGCACTCAAGTTCCCCAGT  1441
             |||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  696   GCATTTCACCGCTACACGTGGAA-TTCCACTCTCCTCTTC-TGCACTCAAGTTCCCCAGT  639

Query  1442  TTCCAATGACACGTTTACGGGTTGAGCCGGTAAGATTTCACATTCATACTTAAAGGAGCG  1501
             |||||||| |||||||||| |||||||| ||||||||||||||| || |||||||| | ||
Sbjct  638   TTCCAATG-CACGTTTACGG-TTGAGCC-GTAAGATTTCACAT-CAGACTTAAAGAACCG  583

Query  1502  CCTGGCGAGCGCCTTTACGCCCAATAAATTCCCGGAACAGCGCTGGCCACCTACGTATTT  1561
             |||| |||||| |||||||||||||||| |||| || ||| |||| ||||||||||||||
Sbjct  582   CCTG-CGAGCG-CTTTACGCCCAATAA-TTCC-GG-ACAACGCTTGCCACCTACGTATT-  529

Query  1562  ACTGCGGCTGCTGGGTACGTAACTAACCTTTGGCTTTTCTGGCTAACGGTACCGGCAAGC  1621
             || |||||||||||  |||||  || || | ||||||| |||| ||  |||||||| ||||
Sbjct  528   ACCGCGGCTGCTGGC-ACGTAGTTAGCCGT-GGCTTT-CTGGTTA--GGTACCGTCAAGG  474

Query  1622  -GCCATC  1627
              ||||||
Sbjct  473   TGCCATC  467
```

EK-4. S8 İzolatı BLAST sonucu

```
Oceanobacillus sp. Ts14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: EU306609.1Length: 1295Number of Matches: 1
Related Information
Range 1: 67 to 1268
Alignment statistics for match #1

Score             Expect    Identities      Gaps          Strand
1967 bits(1065)   0.0       1168/1216(96%)  14/1216(1%)   Plus/Plus

Query  118   AAGACTGCGAAACCTCGTGAAAACTCGAGCTTATTCCGGATAACACTTTTCATCTCCTGA  177
             ||||||| || | |||||| |||| |||||| || ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  67    AAGACTGGGATAACTCGTGGAAACGCGAGCTAATACCGGATAACACTTTTCATCTCCTGA  126

Query  178   TGATAATTTGAAAGGCGGCTTTTGCTGTCACTTACTCATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTA  237
             |||||| ||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  127   TGATAAGTTGAAAGGCGGCTTTTGCTGTCACTTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTA  186

Query  238   GTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCTACCTGAGAGGGTGATCGG  297
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  187   GTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  246

Query  298   CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAACACTAGGGAATCTTCC  357
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||||||||||||
Sbjct  247   CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  306

Query  358   GCAATGGACTAAAGTCTGACGGAGCAACGCCTCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTA  417
             |||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  307   GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTA  366

Query  418   AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCATAGTAACTGATGGTTCCTTGACGGTACCT  477
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||
Sbjct  367   AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCATAGTAACTGATGGCACCTTGACGGTACCT  426

Query  478   AACCATAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCTAGGTGGCCAACC  537
             ||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| || | 
Sbjct  427   AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC-AAGC  485

Query  538   GTGGTCCTGGAATAATTGGGCGTAAAGACGATTCGCAGGCGGTTCCTTAAGGTCTGATCA  597
             || |||| ||||| |||||||||||||  ||  |||||||||||||| ||||| ||||||
Sbjct  486   GTTGTCC-GGAATTATTGGGCGTAAAG-CG-CTCGCAGGCGGTTCTTTAAG-TCTGATGT  541

Query  598   GAAAATCTTACGGCTCAACCGTAAACGTGCATCGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAG  657
             | |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  542   G-AAATCTTACGGCTCAACCGTAAACGTGCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAG  600

Query  658   ACGAGAGTGGAATTCCCACCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCCA  717
             | |||||||||||||| | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  601   AGGAGAGTGGAATTCC-A-CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACC-A  657

Query  718   GTGGCGAAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG  777
             |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  658   GTGGCG-AAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG  716

Query  778   AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCCGAAAACGATGAGTGCTAGGGGTTATGGG  837
             |||||||||||||||||||||||| | ||| |||||||||||||||| |||| |||||||
Sbjct  717   AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA-CGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTA-GGG  774

Query  838   AGTTTCTTCGCCCCTTAGTGCCGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG  897
              |||||  |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  775   GGTTTC--CGCCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG  832

Query  898   CCGCAAGGCTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  957
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  833   CCGCAAGGCTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  892

Query  958   TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAACACTCTAGAG  1017
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  893   TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAACACTCTAGAG  952

Query  1018  ATAGAGTTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  1077
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  953   ATAGAGTTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  1012

Query  1078  CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT  1137
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1013  CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT  1072

Query  1138  CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA  1197
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1073  CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA  1132
```

```
Query  1198  AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAAGGGA  1257
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1133  AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAAGGGA  1192

Query  1258  AGCGAACCCGCGAGGTCAAGCAAATCCCACAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGTTG  1317
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  1193  AGCGAACCCGCGAGGTCAAGCAAATCCCACAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG  1252

Query  1318  CAACTCGCCTACATGA  1333
             ||||||||||||||||
Sbjct  1253  CAACTCGCCTACATGA  1268
```

EK-5. S17 İzolatı BLAST sonucu

```
Oceanobacillus sp. DB-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: GU326361.1Length: 1470Number of Matches: 1
Related Information
Range 1: 120 to 793
Alignment statistics for match #1

Score            Expect   Identities     Gaps        Strand
1081 bits(585)   0.0      647/677(96%)   4/677(0%)   Plus/Minus

Query  2    ACTAGCAAGGAGATCTGATCAAGGTAGCTCACCACGCCTTACGCTCCTCAGCGTCAGTTA  61
            ||||  |  ||||  ||||  |||   |  |  ||||  ||||||  ||  ||||||||||||||||||||
Sbjct  793  ACTA-CCAGGATATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGC-TTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTA  736

Query  62   CAGACCAGAGAGT-GGCGTCGCCACTGGTGTTCCTTCCACATTTCTAAGCATTTCACCGC  120
            |||||||||||||  |  |  ||||||||||||||||  ||||||  ||||  ||||||||||||
Sbjct  735  CAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCT-CCACATCTCTACGCATTTCACCGC  677

Query  121  TACACGTAGAATTCCACTATCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGCAGGTT  180
            |||||||  ||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||
Sbjct  676  TACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGCACGTT  617

Query  181  TACGGCTGAGCCGTAAGATTTCACATCAGACTTAAAGAACCGCCTGCGAGCGCTTTACGC  240
            |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  616  TACGGTTGAGCCGTAAGATTTCACATCAGACTTAAAGAACCGCCTGCGAGCGCTTTACGC  557

Query  241  CCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACTTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTA  300
            ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  556  CCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTA  497

Query  301  GCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCATCAGTTACTATGGCACTTGTTCTT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  496  GCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCATCAGTTACTATGGCACTTGTTCTT  437

Query  361  CCCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  436  CCCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTC  377

Query  421  AGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  376  AGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTG  317

Query  481  TCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTAA  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  316  TCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTAA  257

Query  541  GCCATTACCTTACCAACTAGCTAATGCGCCGCAGGCCCATCTGTAAGTGACAGCAAAAGC  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  256  GCCATTACCTTACCAACTAGCTAATGCGCCGCAGGCCCATCTGTAAGTGACAGCAAAAGC  197

Query  601  CGCCTTTCAACTTCTCATCAGGAGATGAAAAGTGTTATCCGGTATAAACTCGCGTGGCCA  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |  ||||||||  |||
Sbjct  196  CGCCTTTCAACTTCTCATCAGGAGATGAAAAGTGTTATCCGGTATTAGCTCGCGTTTCCA  137

Query  661  CGAGGTTTCGCATTCTT  677
            ||||  |  ||  ||  ||||
Sbjct  136  CGAGTTATCCCAGTCTT  120
```

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı **:** Ozan Savaşan

Yabancı Dil **:** İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı **:** İstanbul / 1989

E-posta **:** osavasan@anadolu.edu.tr

Eğitim Bilgileri

2014-2017	Anadolu Üniversitesi - Fen Bilimleri Enstitüsü - Biyoloji Ana Bilim Dalı
2009-2014	Anadolu Üniversitesi - Fen Fakültesi - Biyoloji Bölümü
2003-2006	Şehremini Lisesi
1995-2003	Ataköy Atatürk İlköğretim Okulu