

## Çamaltı Tuzlasından Ekstrem Halofilik Archaea İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu\*

\*İhsan Yaşa, Özge Kahraman, Ebru Tekin, Ali Koçyiğit

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye  
\*E mail: ihsan.yasa@ege.edu.tr

**Abstract:** Isolation and molecular identification of extreme halophilic archaea from Çamaltı Saltern. Extreme halophilic microorganisms are organisms adapted to live at high salt concentrations and therefore have some interests at biotechnological area. In this study, halophilic archaea were isolated from samples taken from the Çamaltı Saltern and identification of isolates were performed with their biochemical tests and 16S rDNA sequencing. Isolates 1, 4, 6, 7, 10, 11, 13 were identified as *Haloferax alexandrinus* with 99% sequence similarity; isolate 5 was identified as *Haloferax alexandrinus* with 98% sequence similarity; isolate 12 was identified as *Haloferax alexandrinus* with 96% sequence similarity; isolate 3 was identified as *Haloferax sp. HSC4* with 99% sequence similarity; isolate 8 was identified as *Haloferax sp. YT 228* with 97% sequence similarity; isolate 2 was identified as *Halobacterium salinarum R1 strain* with 99% sequence similarity; 9 isolate was identified as *Halobacterium salinarum* with 97 %sequence similarity.

**Key Words:** Extreme halophilic microorganisms, Çamaltı saltern, archaea, 16S rDNA, molecular identification.

**Özet:** Ekstrem halofilik mikroorganizmalar yüksek tuz koşullarında yaşamaya adapte olmuş bu nedenle biyoteknoloji alanında ilgi gören canlılardır. Bu çalışmada İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan alınan örneklerden ekstrem halofilik archaea izolasyonu gerçekleştirilerek bu mikroorganizmaların biyokimyasal testlerinin yanı sıra moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. 16S rDNA analizleri sonucu 1, 4, 6, 7, 10, 11, 13 nolu izolatlar %99 oranında *Haloferax alexandrinus*, 5 nolu izolat %98 oranında *Haloferax alexandrinus*, 12 nolu izolat %96 benzerlik oranıyla *Haloferax alexandrinus*, 3 nolu izolat %99 *Haloferax sp. HSC4*, 8 nolu izolat %97 *Haloferax YT 228*, 2 nolu izolat %99 *Halobacterium salinarum R1 strain*, 9 nolu izolat %97 *Halobacterium salinarum* olarak tanımlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ekstrem halofilik mikroorganizmalar, Çamaltı tuzlası, archaea, 16S rDNA, moleküler identifikasyon.

\*Bu çalışma E.Ü. Araştırma fon saymanlığı 2006/Fen/056 nolu proje ile desteklenmiştir.

### Giriş

Ülkemizdeki önemli tuz üretim yerlerinden biri olan Çamaltı Tuzlası, İzmir iline 28 km uzaklıkta, Gediz nehri havzasına kurulmuş, Türkiye'nin deniz kaynaklı en büyük tuzlasıdır. İlk kez 1863 tarihinde İtalyanlar tarafından düzenli tuz üretim havuzları ve tesisleri inşa edilmiştir. Çamaltı Tuzlası 24.161.000 m<sup>2</sup> alana yayılmış buharlaştırma havuzları ve 3.158.000 m<sup>2</sup> alanı kaplayan kristalizasyon havuzlarıyla önemli bir sulak alandır. Su depolama havuzları %35-50, buharlaştırma havuzları %50-150, kristalizasyon havuzları %150-300 tuzluluktadır (Koru, 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikrobiyal yaşamın spesifik çevrelerle sınırlı olmadığını, mikrobiyal komünitenin yüksek sıcaklık, yüksek tuz, asidik ve alkali pH, yüksek basınç gibi ortamlarda bulunabileceğini ortaya koymuştur. Bu tür ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar ekstremofiller olarak adlandırılırlar (Van den Burg, 2003). Ekstremofilik mikroorganizmaların, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan üyeleri olan halofiller üç domainde de (Archaea, Bacteria, Eukarya) yer almaktadır (Horikoshi ve Grant, 1998) ve Kushner' e (1978, 1993) göre; halofilik olmayanlar (0-1 M), az halofiller (0,2-2,0 M), ılımlı halofiller (0,4-3,5 M), ekstreme yakın halofiller (1,4-4,0 M), ekstrem halofiller (2,0-5,2 M),

halotolerantlar (0->1 M) ve değişken halofiller (0->3 M) olarak sınıflandırılmışlardır. Halofilik mikroorganizmalar tuzlular, hipersalin göl gibi bölgelerde bulunurlar. Bu ortamlarda, *Dunaliella* (%10 w/v), *Artemia salina*, *Ephydra* gibi ökaryotik organizmalar da yer alır. Bakteriler içerisinde ise %15 w/v tuz konsantrasyonunun altında büyüemeyen *Salinibacter ruber* son yıllarda en ekstrem halofilik bakteri olarak tanımlanmıştır(Horikoshi ve Grant, 1998). *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* gibi genuslar ise Archaea domaininde yer alır ve bunlar tuzun çökme noktasına yakın konsantrasyonlarda yaşayabilirler (Horikoshi ve Grant, 1998).

Diğer ekosistemlerde olduğu gibi hipersalin ortamlarda kirlilikle karşı karşıya kalmaktadır. Bu tür ortamlarda halofilik mikroorganizmaların tarafından organik kirleticilerin biyolojik olarak parçalanması üzerine çok az bilgi olmasına karşın, ekstremofil olmayan mikroorganizmalar tarafından böyle ortamlardan organik kirleticilerin etkili bir şekilde uzaklaştırılması mümkün olmamaktadır. Halofilik mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonunda üreyebilmeleri nedeni ile hipersalin ortamların biyoremediasyonu ve tuzlu su atıklarının işlenmesi için önemlidirler (Le Borgne, 2008).

Ekstrem halofilik mikroorganizmalar biyolojik tuza toleranslılığın model organizmalarıdır ve farklı sıcaklık, tuz

konsantrasyonlarında optimum aktivite gösteren proteaz, lipaz, amilaz, DNaz, esteraz, selülaaz, pullanaz ve ksilanaz gibi hidrolitik enzim kaynaklarıdır. Haloarchaeal ekstremozimler tuza son derece dayanıklı olmalarının yanı sıra çevrelerindeki uzun süreli yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı yani termotoleranttır. Bu özellikler birçok uygulama için oldukça ilgi çekicidir. (Obayashi ve diğ., 1988).

Halofilik mikroorganizmaların izolasyonları diğer ekstremofilik türlere göre daha kolaydır. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip düşük miktarda organik madde içeren ortamlar ve aerobik, ılıman sıcaklık (40°C) izolasyon için yeterlidir (Dyall Smith, 2008). Çalışmamızda %25 tuz içeren besiyerlerinden izole edilen ekstrem halofilik mikroorganizmaların tanısı fizyolojik ve dizi 16S rRNA dizi analizleri ile yapılmıştır. Günümüzde hızla gelişen moleküler teknikler dolayısı ile toprak ve su örneklerinden saf bakteri kültürü elde edilmesine gerek olmadan da DNA izolasyonları kolaylıkla yapılabilen ve alınan örneklerdeki mikrobiyal çeşitlilik ortaya çıkarılabilmektedir (Cuadros-Orellana ve diğ., 2006). Ancak, çalışmamızda çevresel örneklerden DNA izolasyonu yerine kültüre edilebilir mikroorganizmaların izolasyonu, bu türlerin biyoteknolojik ve fizyolojik çalışmaları için bir ön koşuldur. İzole edilen türlerin tanılanması, ülkemiz ekstrem halofilik kültüre edilebilir prokaryotik çeşitliliğinin ortaya çıkarılmasına katkıda bulunacağı gibi izolatlarımız diğer araştırmacıların çalışmaları için de bir kaynak teşkil edecektir.

## Materyal ve Yöntem

Denemede kullanılan mikroorganizmaların izole edildiği toprak örnekleri Kasım ayında İzmir Çamaltı Tuzlası'nın iki farklı bölgesinden toprak 10cm kadar kazılarak alınmıştır. Alınan örnekler, steril kavanozlara aktararak laboratuvara ulaştırılmıştır. Tuzladan alınan toprak örneklerinin her birinden 5'er gr alınarak 250 ml'lik erlenlerde 50 ml 5 adet sıvı SW-25 (NaCl 202, 5 g lt<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 17, 5 g lt<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 24 g lt<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0, 9 g lt<sup>-1</sup>, KCl 5 g lt<sup>-1</sup>, NaHCO<sub>3</sub> 0, 15 g lt<sup>-1</sup>, NaBr 0, 065 g lt<sup>-1</sup>, Maya Özütü 5 g lt<sup>-1</sup>, pH 1N NaOH ile 7, 2'ye ayarlanmıştır) içeren ortamlara (Nieto ve diğ., 1989'a göre modifiye edilmiştir) aktarılıp 40°C'de 120 rpm'de 7 gün çalkalamalı inkübatörde inkübe edilerek mikroorganizmaların bu ortamda gelişmeleri sağlanmıştır. SW-20(NaCl 162 g lt<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 14 g lt<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 19, 2 g lt<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0, 72 g lt<sup>-1</sup>, KCl 4 g lt<sup>-1</sup>, NaHCO<sub>3</sub> 0, 12 g lt<sup>-1</sup>, NaBr 0, 052 g lt<sup>-1</sup>, Maya Özütü 5 g lt<sup>-1</sup> pH 1N NaOH ile 7, 2'ye ayarlanmıştır), SW-25 agar besiyerlerine çizgi ekim tekniğiyle ekimleri yapılarak saflaştırılmış, petrielerde oluşan halofilik üyeler koloni ve pigmentasyon özelliklerine göre lup yardımıyla seçilmiş (Hezayen ve diğ., 2002). ve yatık SW-25 ortamlarında üretilerek +4°C'de stoklanmışlardır.

Fenotipik ve biyokimyasal testler Oren ve diğ., (1997) tarafından belirlenen minimum tanılama testlerine göre yapılmıştır. Özel durumlar dışında 40°C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. Mikroorganizmaların saflık kontrolleri ve hücre morfolojilerini tayin etmek için Dussault (1955) gram boyama yöntemi uygulanmış ayrıca Olympus faz-kontrast mikroskopundan yararlanılarak gerçek ortamlarındaki

morfolojileri belirlenmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testi için disk difüzyon metodu uygulanmış ve Oxoid marka Novobiyosin (NV, 5 µg), eritromisin (E, 15 µg), streptomisin (S, 10 µg), basitrasin (B, 0, 04 U), penisilin G (P, 10 IU), ampisilin (AM: 10 µg), tetrasiklin (TE, 30µg) antibiyotikleri kullanılmıştır (Birbir ve Sesal, 2003, Montalvo-Rodriguez ve diğ., 1998, Birbir ve diğ., 2007).

Optimum büyüme koşullarını tayin etmek için her bir izolat farklı NaCl konsantrasyonlarını içeren (%0, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30 w/v) SW agar ortamına 10µl spotlanmıştır. Sıcaklık toleransı denemesi için SW-25 sıvı ortamlarına ekilen mikroorganizmalar 20, 27, 37, 40, 50°C'de inkübe edilmişlerdir. Optimum geliştikleri pH'yı tayin etmek için; pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10'a ayarlanmış SW-25 sıvı ortamı kullanılmıştır. Büyüme için gerekli minimum magnezyum ihtiyacını saptamak amacıyla %0, 0.1, 0.2, 0.4, 0, 6, 0.8, 3.2 konsantrasyonlarında MgCl<sub>2</sub> içeren SW-25 agar ortamları kullanılmıştır (MgSO<sub>4</sub> yerine Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenmiştir) (Montalvo-Rodriguez ve diğ., 1997). Minimum maya özütü gereksinimi denemesi için %0, %0.1, %0.01, %0, 5 konsantrasyonlarında maya özütü içeren SW-25 sıvı ortamları kullanılmıştır. Farklı karbon kaynağında gelişme denemesi için karbon kaynakları 0, 22µm por çaplı şırınga filtreden geçirilmiş ve besiyerinde %1 olacak şekilde %0, 01 maya özütü içeren SW-25 ortamına eklenmiştir (Gruber ve diğ., 2004, Stan-Lotter ve diğ., 2002, Montalvo-Rodriguez, 1998). Farklı azot kaynağında gelişme denemesi için maya özütü içermeyen SW-25 agar içerisine %0, 67 (w/v) karbon base ortamı, %1 azot kaynağı eklenmiştir (soya pepton, et özütü, NH<sub>3</sub>Cl). Biyokimyasal testlerden indol testi (Montalvo-Rodriguez ve diğ., 1997), nitrat indirgenmesi testi; (Wistreich, G.A. ve Lechtman, M.D.1980, Birbir ve diğ., 2004), nitrat gaz oluşumu (Karaboz, 1988, Tamer ve diğ., 1989, Birbir ve diğ., 2004), oksidaz testi, (Gerhardt ve diğ. 1994, Wistreich, G.A. ve Lechtman, M.D.1980), katalaz testi (Montalvo-Rodriguez ve diğ., 1997, Gerhardt ve diğ. 1994, Wistreich, G.A. ve Lechtman, M.D.1980) yapılmıştır. Hücre dışı hidrolitik enzimlerden esteraz, gerçek lipaz tayini (Bhatnagar ve diğ, 2005, Martin ve diğ., 2003, Sanchez-Porro ve diğ., 2003), amilaz tayini (Montalvo-Rodriguez ve diğ, 1998), selülaaz tayini (Yaşa ve Kılınç, 2002), Proteaz tayini (Kanlayakrit ve Bovornreungroj, 2005) yapılmış, DNaz tayini için ise %0, 005 konsantrasyonda metil yeşili SW-25 ve DNaz agar içeren ortama katılmış ve besiyerine organizmalar spotlanmıştır. Koloni etrafındaki sarı zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Elder ve diğ., 1977).

İzolatların moleküler tanımlarında DNA izolasyonu için SW-25 ortamında üretilen ve OD<sub>600</sub> ~ 1 olan örneklerden 1.5 ml alınıp steril ependorf tüplerine aktarılmıştır. Tüpler +4°C'de 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatantları atılıp 400 µl steril soğuk ultra saf su eklenmiş ve kısa süreli vortekslenmiştir. Tüpler 70°C'de su banyosunda 10dk tutulmuştur (Dyall-Smith, 2006). Tekrar +4 °C'de 12.000 rpm'de 10dk santrifüjlenmiş süpernatant alınıp 5µl RNAaz (20µg/ml) çözeltisi eklenmiş ve 37°C'de 30dk bekletilmiştir. Kontrol için %0,8'lik agaroz jelde 1saat 80V'da yürütülmüştür.

16S rDNA PCR reaksiyonu için; A21F 5'- TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3' forward ve U1492R 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACTT-3' reverse primerleri kullanılmıştır (Elshahed ve diğ., 2004). Reaksiyon; 95°C'de 5 dk, 95°C'de 45 sn denatürasyon, 50°C'de 1dk primer bağlanması, 72°C'de 1, 4 dk polimerizasyon, 72°C'de 7dk son uzama şeklinde 35 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. PCR örnekleri %1, 5'luk agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Dizi analizi Refgen (ODTÜ-Teknokent) tarafından yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 kullanılmıştır.

## Bulgular

İzolasyon sonucu 13 izolat elde edilmiştir. 2 ve 9 nolu izolatların kırmızı-mor, diğerler izolatların turuncu-kırmızı pigmente sahip oldukları gözlenmiştir. Gram boyama sonucu tüm izolatlar Gr (-) boyanmıştır. Faz-kontrast mikroskop sonucu 13 izolatın morfolojik şekilleri ve antibiyotik duyarlılık testleri Tablo 1 de verilmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testinde 8 mm altındakiler dirençli olarak değerlendirilmiştir (Asha ve diğ., 2005).

**Tablo 1.** İzolatların antibiyotik dirençlilikleri.

İzolat	Antibiyotik							Morfoloji
	NV	P	E	AM	TE	B	S	
1	40	9,5	D	D	D	D	D	Basil
2	39	18	D	D	D	D	D	Basil
3	40	10	D	D	D	D	D	Pleomorfik
4	45	D	D	D	D	D	D	Pleomorfik
5	40	D	D	D	D	11	D	Pleomorfik
6	42	D	D	D	D	10,5	D	Pleomorfik
7	45	15,5	D	D	D	D	D	Pleomorfik
8	39	16,5	D	D	D	D	D	Basil
9	32	22	D	D	D	20	D	Basil
10	20	16	D	D	D	28	D	Pleomorfik
11	41	9,5	D	D	D	D	D	Basil
12	39	16,25	D	D	D	D	D	Basil
13	40	D	D	D	D	D	D	Pleomorfik

*Novobiyosin* (NV, 5 µg), *Eritromisin* (E, 15 µg), *Streptomisin* (S, 10 µg), *Basitrasin* (B, 0, 04 U), *Penisilin G* (P, 10 IU), *Amfisilin* (AM: 10 µg), *Tetrasiklin* (TE, 30µg), D: Dirençli.

İzolatların optimum geliştikleri NaCl konsantrasyonunun %20 ve 25 iken %5-30 NaCl konsantrasyon aralığında gelişebildikleri ve NaCl içermeyen ortamda gelişmedikleri gözlenmiştir. Tüm izolatlar pH 5-8 arasında gelişmiş, optimum gelişmeleri ise pH 7'de olmuştur. Sıcaklık toleransı denemesinde ise 27 ile 50°C arasında gelişim gözlenmiş ancak optimum gelişim 37 ve 40°C'de gözlenmiştir. Ayrıca tüm izolatlar 20°C'de 1 haftalık inkübasyonda gelişme göstermemelerine rağmen 40°C'ye alındıklarında aynı sürede iyi gelişmişlerdir. Minimum magnezyum ihtiyaçlarının %0,1 optimum gelişmelerinin ise; %0,4-3,2 magnezyum konsantrasyonları arasında olduğu görülmüştür. Bütün izolatlar en düşük %0,1 maya özütü konsantrasyonunda büyümüşür. Hiç maya özütü içermeyen ve %0,01 maya özütü konsantrasyonunda büyüme olmamıştır. Bu veriden karbon kullanımı testinde yararlanılmıştır. Tek karbon kaynağında büyüme testinde laktöz, maltöz, ksilitol, arabinoz, ksiloz, fruktoz galaktoz, asetat, sitrat ve glukoz denenmiştir (Tablo 2).

Azot kaynağı olarak et özütü, NH<sub>4</sub>Cl, soya pepton kullanılmıştır (Tablo 3).

**Tablo 2.** Tek karbon kaynağında gelişme.

İzolat No	Karbon Kaynağı (%1)				
	Laktöz	Maltöz	Ksilitol	Arabinoz	Ksiloz
1	-	+	-	+	+
2	-	±	-	-	±
3	-	±	-	+	-
4	-	+	-	+	+
5	-	+	-	+	+
6	-	+	-	+	+
7	-	+	-	±	+
8	-	-	-	±	-
9	-	+	-	+	+
10	-	+	-	±	+
11	-	+	-	±	-
12	-	+	-	+	+
13	-	+	-	+	+

İzolat No	Karbon Kaynağı (%1)				
	Fruktoz	Galaktoz	Asetat	Sitrat	Glukoz
1	+	+	±	+	+
2	+	+	-	+	+
3	+	+	-	+	+
4	+	+	-	+	+
5	+	+	-	+	+
6	+	+	±	+	+
7	+	+	-	+	+
8	+	+	-	+	+
9	+	+	-	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	-	+	+
12	+	+	±	+	+
13	+	+	±	+	+

- : Gelişme yok, ± : gelişme zayıf, + : Gelişme iyi.

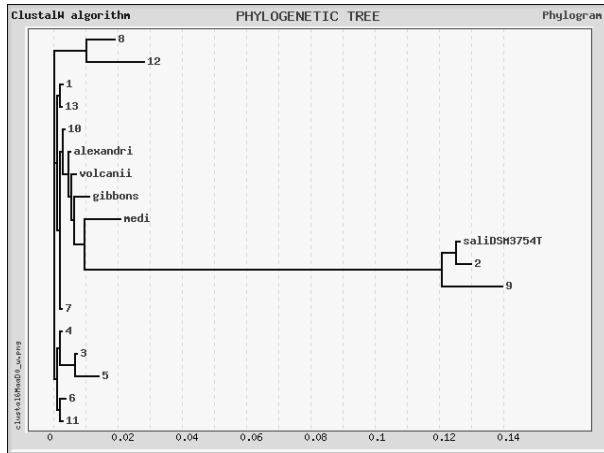
**Tablo 3.** Farklı azot kaynaklarında gelişme.

İzolat No	Azot Kaynağı (%1)		
	Et Özütü	NH <sub>4</sub> Cl	Soya pepton
1	±	±	±
2	+	-	+
3	+	-	-
4	+	±	±
5	+	±	+
6	+	±	±
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	+
10	+	±	±
11	+	-	-
12	+	±	-
13	+	±	+

- : Gelişme yok, ± : gelişme zayıf, + : Gelişme iyi.

Biyokimyasal test sonuçlarına göre; 6 nolu izolat indol pozitif diğer izolatlar indol negatif olarak bulunmuş, hiçbir izolat nitrit ve gaz oluşturmamıştır. Tüm izolatlar oksidaz negatif ve katalaz pozitif olarak bulunmuştur. Ekstraselüler enzim tarama sonuçlarına göre hiçbir izolat amilaz, selülaz ve lipaz aktivitesi göstermemiş, 2, 3, 8, 9, 11 nolu organizmalar esteraz aktivitesi, 2, 5, 9 nolu organizmalar proteaz aktivitesi ve bütün izolatlar ise DNaz aktivitesi göstermiştir.

İzolatların tanılanması için elde edilen 16S rDNA dizileri NCBI Blast aracıyla veri bankasıyla karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda 1, 4, 6, 7, 10, 11, 13 nolu izolatlar %99 oranında *Haloferax alexandrinus*, 5 nolu izolat %98 oranında *Haloferax alexandrinus*, 12 nolu izolat %96 benzerlik oranıyla *Haloferax alexandrinus*, 3 nolu izolat %99 *Haloferax sp. HSC4*, 8 nolu izolat %97 *Haloferax YT 228*, 2 nolu izolat %99 *Halobacterium salinarum R1 strain*, 9 nolu izolat %97 *Halobacterium salinarum* olarak tanılanmıştır. İzolatların filogenetik akrabalıklarını ortaya koymak için <http://www.genebee.msu.su/clustal/clustal.php> internet adresindeki Genebee ClustalW 1.83 kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Tüm izolatların karşılaştırmalı filogenetik ağacı. alexandri : *Haloferax alexandrinus*, volcanii: *Haloferax volcanii*, gibbons: *Haloferax gibbonsii*, nedi: *Haloferax mediterranei*, salidSM3754T: *Halobacterium salinarum DSM3754T*

## Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızda İzmir Çamaltı Tuzla'sının ekstrem halofilik archaea biyoçeşitliliğinin ortaya konmasının yanı sıra bu mikroorganizmaların sahip olduğu biyoteknolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla tuzludan alınan örneklerden izolasyon ve saflaştırma bir ön koşul olarak görülmüştür. Bu bağlamda 13 izolat elde edilmiştir. İzolatların tamamı Gram negatif boyanmıştır, bu da Archaea'nın genel özelliklerine uymaktadır. İzolatların büyüme istekleri incelendiğinde NaCl konsantrasyonu olarak optimum %20 ve %25 tuz konsantrasyonlarında geliştikleri, NaCl içermeyen ortamda ise gelişmedikleri görülmüştür. Bu da izolatların Kushner' in yaptığı sınıflandırmaya göre (1978, 1993) türlerin ekstrem halofil olduğunu desteklemektedir. Ayrıca değişen NaCl konsantrasyonlarında miktar arttıkça pigment yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir bu da pigmentin tuz koşullarına dayanıklılıkta rol aldığını göstermektedir (Kushner D. J., 1993). Tek karbon kaynağı denemelerinde faydalanılmak üzere yapılan büyüme için gerekli minimum maya özütü konsantrasyonu denemesinde izolatların en düşük %0, 1 maya özütü içeren ortamda büyüdüğü, %0, 01 maya özütü içeren ortamda büyümediği tespit edilmiş bu nedenle karbon kaynağı kullanımı denemelerinde bu veriden yararlanılarak %0, 01 konsantrasyonda ortama maya özütü eklenmiştir.

Minimum Mg<sup>2+</sup> ihtiyacı incelendiğinde izolatların en düşük %0, 1 w/v Mg<sup>2+</sup> konsantrasyonunda geliştiği görülmüştür. Montalvo-Rodriguez (1997)'in yaptığı denemede ise bu oran %0, 005 olarak verilmiştir. Tüm izolatlar pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 arasında hazırlanan ortamlara ekilmiş ve 5-8 pH'lar arasında gelişim gözlenmiş ancak optimum gelişim 7 ve 8 pH'larda gözlenmiştir.

Ayrıca Oren (2006) tarafından yayınlanan bir çalışmada *Halobacterium salinarum* türü ile ilgili olarak elde edilen sonuçlarda tek karbon kaynağında büyümenin olmadığı ancak ortama %0,005 konsantrasyonda maya özütü gibi hem azot hem de büyüme faktörleri içeren besi yeri bileşenlerinin eklenmesi durumunda büyümenin gerçekleşebileceği belirtilmektedir. Bizim izole ettiğimiz tüm türlerin de tek karbon kaynağında büyüebilmeleri ortam içerisine eklenen %0,01 oranında ki maya özütü nedeniyle gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

İzolatların antibiyotik test sonuçlarında bütün izolatların novobiyosine duyarlı 5, 6, 9, 10 nolu izolatların basitrasine duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Çoğu halofilik Archaea türleri novobiyosine ve basitrasine duyarlıdır. Novobiyosin DNA giraz inhibitörüdür (Holmes ve Dyal Smith, 1991) ve duyarlı olan bakterilerde aynı hedef bölgeye etki etmektedir. Basitrasin ise kokkoid olmayan halofilik Archaea'da hücre duvarının içindeki sakkaritlerin bütünlüğünü bozarak inhibe eder (Wieland ve diğ., 1980). Ayrıca bu tip organizmalarda lipid biyosentezini de inhibe edebilir. Diğer izolatların basitrasine duyarlı olmamalarının sebebi kullanılan basitrasinin düşük (0, 04 U/disk) konsantrasyonda olmasından ya da transpozon etkinliği sonucu oluşmuş olabilecek bir dirençlilikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Bazı literatürlerde kullanılan basitrasin miktarı 10U olarak verilmiştir (Birbir ve diğ., 2003, Hezayen F, 2002, Birbir ve diğ., 2004). Ayrıca tip tür de dahil olmak üzere 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12 nolu izolatlar genelde Archaea'nın dirençli olmasının beklendiği penisilin G'ye duyarlı olduğu saptanmıştır. Bunun antibiyotik dirençliliği sağlayan genin plazmidle kaybindan kaynaklanabileceği bu nedenle plazmid izolasyonu ile ileri analizlere gidilmesi gerektiği düşünülmektedir. Ancak bütün izolatların beklendiği gibi streptomisine dirençli olduğu gözlenmiştir (Oren, 2006). Oren (2006) tarafından belirtildiği gibi bazı türler 100µg/ml konsantrasyonun üzerindeki eritromisine duyarlıdır. Denememizde kullanılan eritromisin konsantrasyonu 15µg'dır ve bu yüzden bütün izolatların eritromisine dirençli olduğu görülmüştür.

Biyokimyasal testler uygulanırken moleküler tanıya destek sağlayabilecek Oren ve diğ., (1997)'de belirtilen minimum testler uygulanmaya çalışılmıştır. Literatürde *Haloferax alexandrinus* strain TM ile yapılan çalışmada (Asker ve diğ., 2002); nişasta, galaktoz, sitrat hidrolizi, nitrattan gaz oluşumu, kazein hidrolizi gerçekleşmediği, nitratin nitrite aerobik indirgenmesinin, indol oluşumunun, Tween 80 ve jelatin hidrolizinin gerçekleştiği belirtilmektedir. Bizim izole ettiğimiz *Haloferax alexandrinus* türlerinde ise; TM strainindeki gibi nişasta, laktöz hidrolizi nitrattan gaz oluşumu gözlenmemiş fakat bazı *Haloferax alexandrinus* türlerimizde

Tween 80 hidrolizi ve kazein hidrolizi gerçekleşmiştir ve bütün türler sitratı ve galaktozu parçalamıştır. İndol oluşumu ise sadece 6 nolu izolatta gözlenmiştir. Bununda strainler arası farklılığa bağlı olduğu düşünülmektedir. Bununla beraber *H. alexandrinus* ile yapılan mevcut çalışmaların çoğu pigment üretimiyle sınırlıdır bu da strainler arası olabilecek farklılıkları ortaya koyamamaktadır.

İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole ettiğimiz izolatların 9 tanesi *Haloferax alexandrinus* olarak tanımlanmıştır. Bu izolat ilk olarak Mısır- Alexandria bölgesinden izole edilmiş ancak daha önce İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izolasyonu gerçekleştirilmemiştir. Bu bağlamda amaçlandığı gibi tuzların ve ülkemiz halofilik mikroorganizma biyoçeşitliliğine katkı sağlamıştır.

### Kaynakça

- Asha K. R. T., D. A. J. Vinitha., S.G. Kiran, W.A. Manjusha, N. Sukumaran, J. Selvin. 2005. Isolation and Cultivation of Halophilic Archaea from Solar Salterns Located in Peninsular Coast of India. *The Internet Journal of Microbiology*. Volume 1 Number 2.
- Asker, D., Y. Ohta. 2002. *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 729-738
- Bhatnagar T., S. Boutaiba, H. Hacene, J.-L. Cayol., M.-L. Fardeau, B. Olivier, J. C. Baratti. 2005. Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and hydrolase production. *FEMS Microbiology Letters* 248: 133-140
- Birbir, M., C. Sesal. 2003. Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey *Turk J Biol* 27: 7-22
- Birbir M., A. Ogan, B. Çallı, B. Mertoğlu. 2004. Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 613-621
- Birbir M., B. Çallı, B. Mertoğlu, R. Bardavid, A. Oren, M. Ögmen, A. Ogan. 2007. Extremely Halophilic Archaea From Tuz Lake, Turkey, and the Adjacent Kaldırım and Kayacık Salterns. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 309-316
- Cuadros-Orellana S., M. Pohlschröder, L.R. Durrant. 2006. Isolation and characterization of halophilic archaea able to grow in aromatic compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57:151-154
- Dyall-Smith M. 2006. The Halohandbook- Protocols for Haloarchaeal Genetics, Version 6.01. <http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/index.html>
- Dyall-Smith M. 2008. The Halohandbook- Protocols for Haloarchaeal Genetics, Version 7.0. <http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/index.html>
- Dussault H.P. 1955. An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 70: 484-485
- Elder B. L., I. Trujillo, D. J. Blazevic. 1977. Rapid Deoxyribonuclease Test with Methyl Green. *Journal Of Clinical Microbiology*, 6:312-313
- Elshahed M. S., F. Z. Najjar, A. R. Bruce, A. Oren, A. D. Thomas, R. L. Krumholz. 2004. Survey of Archaeal Diversity Reveals an Abundance of Halophilic Archaea in a Low-Salt, Sulfide- and Sulfur-Rich Spring, *Applied And Environmental Microbiology*, Apr. 70: 2230-2239
- Gerhardt P., R.G.E Murray, W.A. Wood, N.R Krieg. 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*, American Society For Microbiology. P. 159-169
- Gruber C., A. Legat, M. Pfaffenhuemer, C. Radax, G. Weidler, H.-J. Busse, H. Stan-Lotter. 2004. *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. Salinarum* *Extremophiles* 8:431-439
- Hezayen F. F., B. J. Tindall, A. Steinbüchel, B. H. A. Rehm. 2002. Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestris* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 2271-2280
- Holmes, M. L., and M. L. Dyall-Smith. 1991. Mutations in DNA gyrase results in novobiocin resistance in halophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* 173:642-648.
- Horikoshi K., W.D. Grant(ed). 1998. *Extremophiles*, Chapter 4 Halophiles(W.D. Grant, R. T. Gemmel, T. J. Mcgennity), Wiley-Sons Inc.New York, 93-133
- Kanlayakrit W., P. Bovomreungroj, T. Oka and M. Goto. 2004. Production and Characterization of protease from an Extremely Halophilic Halobacterium sp. PB407 *Natural sciences* 38: 15-20
- Koru, E. 2004. Artemia and it's importance in Çamaltı Saltworks (Izmir, Turkey) ecosystem (in Turkish). *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi* 21: 187-189
- Kushner D.J. 1978. Life in High salt and solute concentrations:halophilic bacteria. İn
- Kushner D.J. (ed) *Microbial Life İn Extreme Environments*. London:Academic Pres, 317-368
- Kushner D.J. 1993. Growth and nutrition of halophilic bacteria in Vreeland RH Hochstein L (eds): *The Biology of Halophilic Bacteria* .Boca Raton:FL CRC Press , pp 87-103
- Le Borgne S., D. Paniagua, R. Vazquez-Duhalt. 2008. Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea *J Mol Microbiol Biotechnol* 15:74-92
- Wistreich, G.A. ve Lechtman, M.D. 1980. *Laboratory Exercises in Microbiology* 4 th edition , USA
- Martin, S., M. C. Marquez, C. Sanchez-Porro, E. Mellado, D. R. Arahall, A. Ventosa. 2003. *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1383-1387
- Montalvo-Rodriguez R., A. Ruiz-Acevedo, J. Lopez-Garriga. 1997. New Isolates of Extremely Halophilic Archaeobacteria (Halobacteria) from Puerto Rico and the Caribbean. *Caribbean Journal of Science*, 33:98-104
- Montalvo-Rodriguez, R., R. H. Vreeland, A. Oren, M. Kessel, C. Betancourt, J. Lopez-Gariga. 1998. *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 48; 1305- 1312
- Nieto J. J., R. Fernandez-Castillo, M. C. Marquez. A. Ventosa, E. Quesada, F. Ruiz-Berraquero. 1989. Survey of Metal Tolerance in Moderately Halophilic Eubacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2385-2390
- Obayashi, A., N. Hiraoka, K. Kita, H. Nakajima and T. Shuzo. 1988. US Patent 4: 724, 209, US Cl. 435/199.
- Oren A., A. Ventosa, W. D. Grant. 1997. Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales* *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 233-238
- Oren A. 2006. The Order Halobacteriales. Dworkin, M. (ed.). *The Prokaryotes*: Chapter 8, 3: 113-164
- Sanchez-Porro C., S. Martin, E. Mellado, A. Ventosa. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J Appl Microbiol*, 94:295-300
- Stan-Lotter H., M. Pfaffenhuemer, A. Legat, H.-J. Buse, C. Radax, C. Gruber. 2002. *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an archaeal isolate from a Permian alpine salt deposit *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1807-1814
- Yaşa İ., A. Kılınç. 2002. Pamuk Liferinden İzole Edilen Selülaz Üreticisi Fungusların Selülaz Aktivitelerinin Belirlenmesi, *Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17 (3), 57-62
- Wieland, F., W. Dompert, G. Bernhardt, and M. Sumper. 1980. Halobacterial glycoprotein saccharides contain covalently linked sulphate. *FEBS Lett.* 120:110-114
- Van den Burg B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*. 6:213-218.