

## SİVAS'IN SOLAR TUZLALARINDAKİ MİKROBİYAL TOPLULUKLARIN KÜLTÜR-BAĞIMLI KARAKTERİZASYONU

Seval ÇINAR<sup>1</sup>, Mehmet Burçin MUTLU<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye

### ÖZET

Bu çalışmada Sivas'ta bulunan farklı solar tuzlalardan halofilik mikroorganizmaların izolasyonu yapılmıştır ve elde edilen izolatların 16S rRNA gen analizine dayalı karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işlemi farklı tuz konsantrasyonları ile hazırlanmış 5 farklı besiyeri ile gerçekleştirilmiştir. Morfolojik olarak farklılık gösteren kolonilerin 16S rRNA genleri ARDRA ile analiz edilmiştir ve kesim profilleri karşılaştırılmıştır. 47 adet suş tanımlama amacıyla seçilmiştir. *Bacteria* domaini içerisinde yer alan izolatların *Idiomarina*, *Salinivibrio*, *Halomonas*, *Salinibacter*, *Gracilibacillus*, *Thalassobacillus*, *Aliifodinibius*, *Chromohalobacter*, *Planococcus*, *Marinobacter*, *Bacillus*, *Aquisalimonas*, *Marinococcus*, *Alkalibacillus*, *Kangiella* ve *Microbulbifer* cinsleri ile filogenetik olarak ilişkili olduğu saptanmıştır. Halofilik arke izolatları ise *Haloferax*, *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Halopelagius*, *Halorhabdus* ve *Haloarcula* cinsleri içerisinde dağılım göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Halofilik Mikroorganizmalar, Solar Tuzlalar, Sivas

### CULTIVATION-BASED CHARACTERIZATION of MICROBIAL ASSEMBLAGES in SOLAR SALTERNs, SİVAS

#### ABSTRACT

In this study, halophilic microorganisms were isolated from different solar salterns in Sivas and characterization of these isolates based on 16S rRNA gene analysis have been performed. Isolation was done by using 5 different media prepared with different salt concentrations. 16S rRNA genes of morphologically distinct colonies were analyzed by ARDRA and restriction profiles were compared. 47 strains were selected for identification purposes. It has been determined that the isolates in the *Bacteria* domain are phylogenetically related to genera *Idiomarina*, *Salinivibrio*, *Halomonas*, *Salinibacter*, *Gracilibacillus*, *Thalassobacillus*, *Aliifodinibius*, *Chromohalobacter*, *Planococcus*, *Marinobacter*, *Bacillus*, *Aquisalimonas*, *Marinococcus*, *Alkalibacillus*, *Kangiella* and *Microbulbifer*. Halophilic archaeal isolates were distributed among genera *Haloferax*, *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Halopelagius*, *Halorhabdus* and *Haloarcula*.

**Keywords:** Halophilic Microorganisms, Solar Salterns, Sivas

## 1. GİRİŞ

Doğada tatlı sulardan doymuş tuz konsantrasyonuna kadar tuzluluğa sahip tüm çevrelerde yaşam mevcuttur. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip topraklar ve sular (göller, kaynak suları, solar tuzlalar) dünyanın birçok bölgesinde yaygındır. Bu çevrelerde gelişen halofilik mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonuna adaptasyon mekanizmaları ve biyoteknolojik kullanım alanları açısından ilgi odağı olmuştur [1, 2].

Solar tuzlalar, tuz üretimi amacıyla yapay olarak oluşturulan havuzlardan oluşan sistemlerdir ve bu ortamlardaki komünite yapısı dünyanın pek çok bölgesinde ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır [3, 4, 5]. Solar tuzlaların farklı tipleri bulunmaktadır. Ayvalık ve Çamaltı tuzlası Türkiye'deki iki büyük solar tuzladır ve

\*Sorumlu Yazar: [mbmutlu@anadolu.edu.tr](mailto:mbmutlu@anadolu.edu.tr)

deniz tuzlarına örnektirler. Göl tuzlarına ise Tuz gölü kıyısındaki Kaldırım, Kayacık ve Yavşan tuzları örnek verilebilir. Kaynak tuzlarına ise daha çok İç ve Doğu Anadolu’da rastlanmaktadır ve bu çalışmanın konusunu oluşturmaktadırlar [6, 7].

Ülkemizin pek çok farklı bölgesinde jeolojik devirlerde denizlerin ve kapalı havzaların buharlaşması sonucu oluşmuş kaya tuzu yatakları bulunmaktadır. Yeraltı suları bu tuz tabakasından geçerken onu çözer ve yeryüzüne çıkar. Yeryüzüne çıkan bu kaynak suları, bazı bölgelerde, tuz üretimi amacıyla havuzlarda biriktirilir. Bu tip tuzlar, kaynak tuzlarıdır. Sivas, tuz üretiminin yapıldığı kaynak tuzları açısından zengin bir ildir [7, 8, 9]. Bu çalışmadaki örnekleme alanlarımız olan Bingöl ve Fadlum kaynak tuzları Sivas’ın merkezi yakınlarında, Tuzlagözü, Cedit ve Hamo kaynak tuzları ise Sivas’ın Zara ilçesinde yer almaktadır.

Günümüzde, farklı habitatlardaki mikrobiyal komünite yapısının etkin bir şekilde ortaya konulmasını sağlayan pek çok moleküler teknik kullanılmaktadır. Kültür-bağımlı çalışmalarla elde edilen suşlar ortamdaki dominant komünite yapısını her zaman yansıtmayabilir, ancak mikroorganizmaların metabolik özelliklerini, birbirleri arasındaki ilişkileri doğru ve ayrıntılı bir şekilde incelemek adına saf kültür eldesi önemlidir. Bu çalışmada, kaynak tuzlarındaki kültüre-edilebilir halofilik mikrobiyal gruplar üzerine odaklanılmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

Sivas’ta bulunan Cedit (Aralık 2014), Tuzlagözü (Ağustos 2014), Fadlum (Ekim, 2014) ve Bingöl (Ekim, 2014) tuzlarından su örneği, Hamo (Eylül, 2014) tuzlasından ise tuz örneği alınmıştır. Tuzlalardan alınan su örneklerinin tuzluluğu el refraktometresi ile ölçülmüştür.

İzolasyon çalışması için R2A, DBCM2, Medyum B, *Salinibacter ruber* besiyeri ve Modifiye Geliştirme Besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri bileşenleri şu şekildedir; R2A [g/L: maya özütü 0.5, pepton 0.5, kazamino asit 0.5, glukoz 0.5, nişasta 0.5g, Na-pirüvat 0.3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3, MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 0.05; besiyerinin içeriğine ek olarak 200g/L NaCl eklenmiştir], Medyum B [g/L: maya özütü 0.5, kazamino asit 7.5, MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 20, NaCl 200, KCl 1, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.02, Tri-Na-sitrat 3], *Salinibacter ruber* besiyeri [g/L: NaCl 195, MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 49.5, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 34.6, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1.25, KCl 5, NaBr 0.625, HNaCO<sub>3</sub> 0.25; maya özütü 1], Modifiye Geliştirme Besiyeri (MGM) [%30’luk stok tuzlu su çözeltisi içeriği g/L: NaCl 240, MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 35, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 30, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.73, KCl 7, NaBr 0.8, HNaCO<sub>3</sub> 0.2 (MGM besiyerleri %12, %18, %23 ve %25 tuz konsantrasyonu içerek şekilde %30’luk stok tuzlu su çözeltisinden seyreltilerek hazırlanmıştır ve maya özütü 1g/L, pepton 5g/L ile desteklenmiştir)], DBCM2 besiyeri [MGM besiyeri için hazırlanan %30’luk stok tuzlu su, tuzluluğu %25 olacak şekilde seyreltilir. 950mL %25’lik tuzlu su üzerine 50mL %23 MGM besiyeri eklenir ve çözelti otoklovlanır. Besiyeri otoklavlandıktan sonra, 0.2µm por çaplı filtre ile steril edilmiş çözeltiler, belirtilen hacimlerde içerisine eklenir; 1L besiyerine 10mL 1M Tris.Cl (pH 7.4), 5mL 1M NH<sub>4</sub>Cl, 2mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 7.4), 1mL SL10 iz element çözeltisi, 3mL Vit10 vitamin çözeltisi, 4.4mL %25’lik Na-pirüvat çözeltisi] [10, 11, 12].

5g tuz örneği 100mL %20 NaCl çözeltisinde çözülmüş ve bu çözeltiden ekim yapılmıştır. Tuzlalardan alınan su örneklerinden 50µl, 100µl ve 200µl hacimlerde yukarıda belirtilen katı besiyerlerine yayma ekim yapılmıştır [12]. Örneklerden besiyerlerine en az iki paralel olacak şekilde ekim yapılmıştır.

Tuzlalardan alınan su örneklerinden bir kısmı otoklavda 121°C’de 15dak. steril edilmiştir. Bu steril edilen tuzlu sular maya özütü [1g/L] ve pepton [5g/L] ile desteklenip yukarıda belirtilen besiyerlerine ek olarak

kullanılmıştır. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip olan tuzlaların suları, besiyeri bileşiminde %18 ve %23 olacak şekilde saf su ile seyreltilmiştir.

Örneklerden ekim yapılan petripler 37°C’de, su kaybını azaltmak için plastik poşetler içerisinde, bir ay inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan kolonilerin morfolojik farklılıkları, geliştiği besiyeri ve tuz konsantrasyonu göz önüne alınarak farklılık gösterenlerden bazıları tanımlama amacıyla seçilmiştir. Saflıklarından emin olmak için çizgi ekim yapılmıştır. Bu çalışmada elde edilen saf kültürler, -80°C’de %20 gliserol stoklarında saklanmaktadır.

Halofilik mikroorganizmaların hücreleri genellikle saf suda kolayca parçalanmaktadır. Dolayısıyla hücreler saf su içerisine aktarılıp bir süre kaynatılırsa genomik DNA ile birlikte hücre içeriği suya geçer. 100µl hacimlerde MQ-su 1.5mL’lik ependorflara aktarılmıştır ve kültürlerden bir miktar alınıp bu tüplere aktarılmıştır. Ependorflar kaynar su banyosunda 10 dak. bekletilmiştir, ardından 5 dak. 12,000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar yeni ependorflara aktarılmıştır ve kısa bir süre sonra polimeraz zinciri reaksiyonunda (PZR) kalıp DNA olarak kullanılmışlardır.

İzolatların 16S rRNA genine yönelik yapılan PZR’da 21f [Arke-spesifik ileri primer (5’-TTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3’)] [13], 27f [Bakteri-spesifik ileri primer (5’-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3’)] ve 1492r [Evrensel geri primer (5’-GGTTACCTTGTTACGACTT-3’)] [14] primerleri kullanılmıştır. İzolatların gDNA’sından arke ve bakteri spesifik iki farklı PZR kurulmuş ve *Archaea* mı yoksa *Bacteria* domainine mi ait olduğu belirlenmiştir.

Bazı yoğun ve mukusumsu gelişen izolatlardan kaynatma yoluyla elde edilen kalıp solusyonundan kurulan PZR reaksiyonundan ürün elde edilememiştir. Bu izolatlar için gDNA izolasyonu yapılmıştır ve PZR’da kalıp olarak bu DNA özütü kullanılmıştır.

gDNA ekstraksiyonu için 200µl sıvı kültür 1.5mL’lik ependorflara aktarılır ve 10,000 g’de 2 dak. santrifüj edilir. Sıvı kısım pipetle uzaklaştırılır. Hücre peleti üzerine 200µl MQ-su eklenip, tüp maksimum hızda vortekslenir. Üzerine 200µl fenol eklendikten sonra, tüp birkaç kez ters-düz edilir. Ependorflar 65°C’de 10 dak. su banyosunda inkübe edildikten sonra 10,000 g’de 5 dak. santrifüj edilir. Üstteki faz, alt faza dokunmadan, dikkatlice yeni ependorfa aktarılır. Üzerine 400µl soğuk etanol (%100) eklenir ve tüp birkaç kez ters-düz edilir. Tüpler buzda 10 dak. bekletilir. Daha sonra 10,000 g’de 10 dak. santrifüj edilir, supernatant dökülür ve pellet üzerine %70’lik etanol eklenir. Tekrar 10,000 g’de 10 dak. santrifüj edilir ve alkol, pelete dokunmadan, pipetle dikkatlice uzaklaştırılır. Pelet oda sıcaklığında kurutulur ve 100µl MQ-suda çözülür [12]. Bazı izolatlardan elde edilen gDNA ekstraktları PZR’da kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

İzolatlardan elde edilen 16S rRNA geni PZR ürünlerinin, ARDRA (Amplifiye edilmiş rDNA Restriksiyon Analizi) ile analizinde *Hinf*I restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Restriksiyon reaksiyonu için 7µl MQ-su, 1µl enzim (Fermentas), 2µl tamponundan (Fermentas), 10µl PZR ürünü kullanılmıştır. Tüpler 16 saat 37°C su banyosunda bekletilmiştir. 1X TBE (tris-borik asit-EDTA) ile %2’lik agaroz jel hazırlanmıştır ve kesim reaksiyonları bu jele yüklenmiştir. Yürütme işlemi 60V’da 2.5saat gerçekleştirilmiştir. Kesim profilleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır ve her profilden en az bir temsilci izolat tanımlama amacıyla seçilmiştir.

İzolatların 16S rRNA genlerinin PZR ürünleri jelden saflaştırılmıştır (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System; Promega) ve dizileme için Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı kullanılmıştır. Dizi analizi için kurulan reaksiyonda 12µl mix (GenomeLab DTCS Quick Start Kit, Beckman Coulter), 3µl MQ-su, 1µl primer ve 4µl PZR ürünü yer almaktadır. Dizileme sonrası elde edilen veriler, GenBankasındaki (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) verilerle karşılaştırılıp en yakın benzerlik gösterdiği taksonlar belirlenmiştir.

Filogenetik analiz “phylogeny.fr” kullanılarak gerçekleştirilmiştir (<http://www.phylogeny.fr/>) [15, 16]. Diziler MUSCLE kullanarak hizalanmıştır [17]. Filogenetik ağaçlar maksimum olasılık (maximum likelihood) algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve seç-bağla (bootstrap) analizi 100 tekrarlı yapılmıştır.

### 3. BULGULAR

Tuzlalardan alınan su örneklerinin toplam tuzluluğu Cedit için %17,5 (kaynak suyu; pH=7.01), Fadlum için %26,2 (havuz; pH=7.4), Bingöl için %27 (havuz; pH=7.22) ve Tuzlagözü için %26,2 (havuz; pH=7.45) olarak belirlenmiştir.

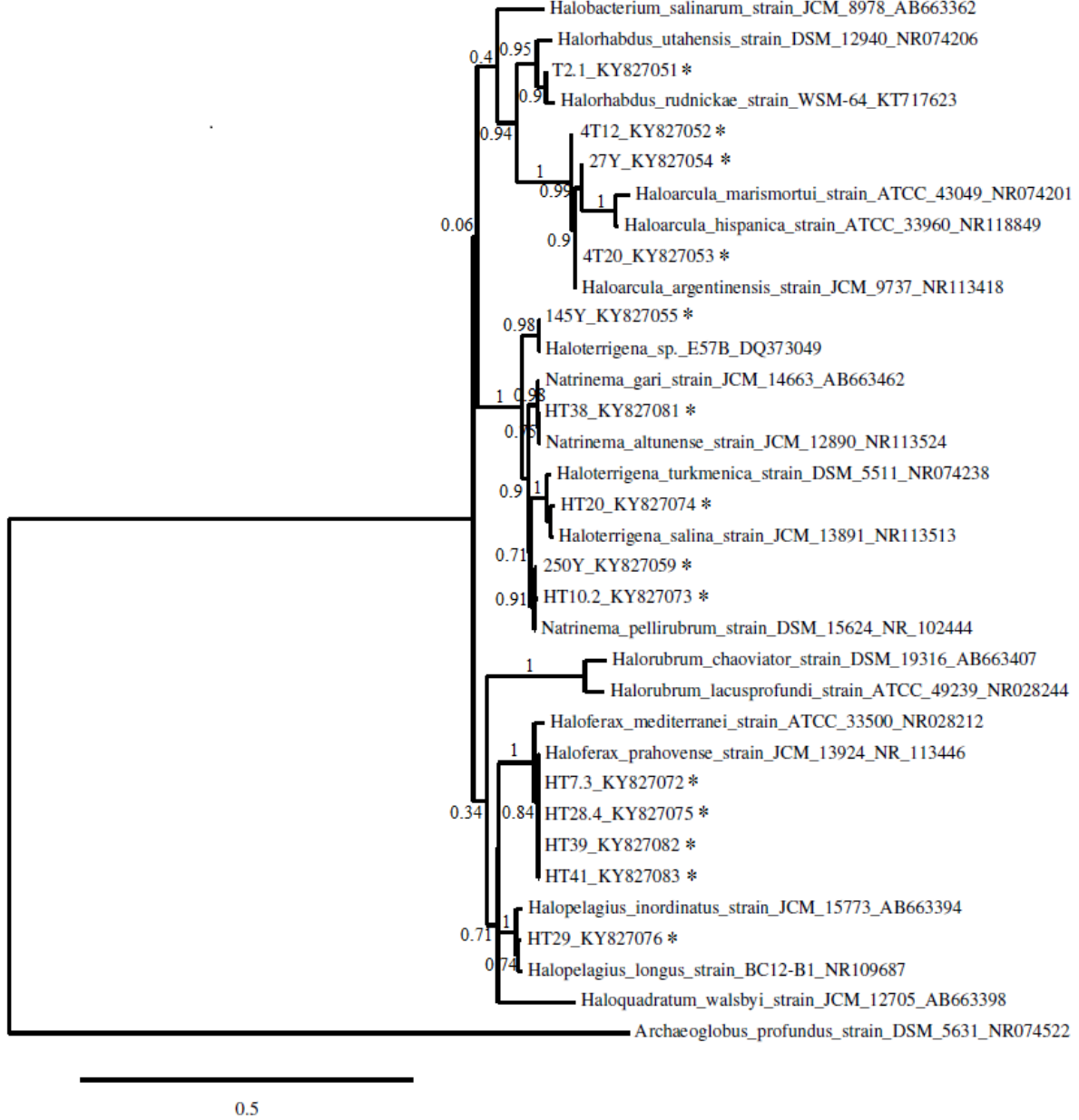
Kültür çalışmamızda inkübasyon sonrası oluşan kolonilerin sayısı belirlenmiştir ve koloni oluşturan birim sayısının genel olarak MGM besiyerinde daha fazla olduğu, medyum B’den elde edilen değerlerin ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. Besi ortamlarına göre koloni oluşturan birimlerin sayısına bakıldığında ise %12 MGM’den elde edilen değerler  $5.9 \times 10^3$ – $6.6 \times 10^4$  kob/ml; %18 MGM’den elde edilen değerler  $8.4 \times 10^3$ – $3.6 \times 10^4$  kob/ml; %23 MGM’den elde edilen değerler  $5.0$ – $9.8 \times 10^3$  kob/ml; R2A’dan elde edilen değerler  $3.8$ – $7.7 \times 10^3$  kob/ml; medyum B’den elde edilen değerler ise  $1.0$ – $1.9 \times 10^3$  kob/ml arasındadır.

Kolonilerin seçimi rastgele yapılmamıştır, özellikle farklı koloni morfolojisi gösterenler analiz için tercih edilmiştir ve 69 tane izolat seçilmiştir. Bu izolatların 16S rRNA genine yönelik domain-spesifik primerlerle gerçekleştirilen PZR işlemi sonucu, 22 tanesinin *Archaea*, 47 tanesinin ise *Bacteria* domainine ait olduğu belirlenmiştir. ARDRA analizi sonucu bakteriler 24 profil, arkeler ise 6 profil vermiştir. 47 tane izolatın 16S rRNA geni dizilenmiştir. İzolatların filogenetik olarak ilişkili olduğu gruplar Şekil 1 ve 2’te gösterilmiştir. Bakteri izolatlarının *Proteobacteria* (*Idiomarina*, *Salinivibrio*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter*, *Aquisalimonas*, *Kangiella*, *Microbulbifer*), *Bacteroidetes* (*Salinibacter*, *Aliifodinibius*) ve *Firmicutes* (*Gracilibacillus*, *Thalassobacillus*, *Planococcus*, *Bacillus*, *Marinococcus*, *Alkalibacillus*) filumlarında yer aldığı; arke izolatlarının ise *Halobacteriaceae* familyasındaki *Haloferax*, *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Halopelagius*, *Halorhabdus* ve *Haloarcula* cinsleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

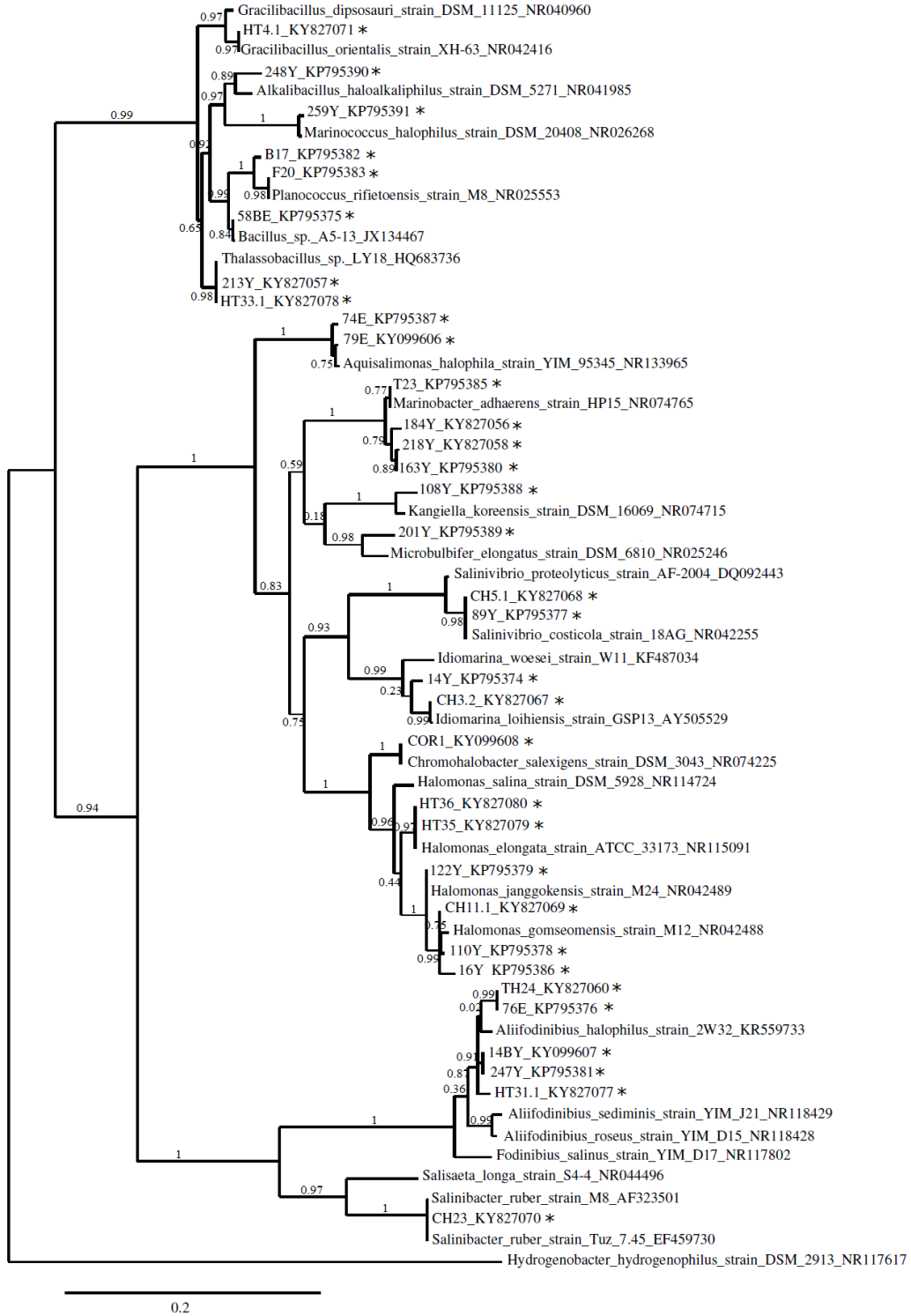
Analiz için tercih edilen izolatların sayısı bölgelere göre eşit dağılım göstermemektedir. Koloni morfolojileri açısından oldukça fazla çeşitlilik gösteren Tuzlagözü ve Hamo örneklerinden, analiz için daha fazla sayıda izolat seçilmiştir. Bu tuzlalardan farklı halofilik arkelerin ve halotolerant bakterilerin izolasyonunda, diğer tuzlalara göre, daha verimli sonuç elde edilmiştir (Şekil 3). Sadece bu iki bölgeden analiz için tercih edilen halofilik arke izolatlarının çoğunun *Haloferax*, *Haloarcula* ve *Natrinema* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir. Bu grupların temsilcilerini izole etmek için genellikle özel bir zenginleştirme gerekli değildir ve standard besiyerleri ile kolaylıkla izole edilebilmektedirler. *Haloterrigena* (R2A), *Halopelagius* ve *Halorhabdus*’a ait arke suşları ise (medyum B) sadece tek bir besiyerinden izole edilmiştir. Ayrıca bu iki tuzladan *Firmicutes* filumuna ait farklı halotolerant bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4).

Fadlum ve Bingöl örnekleri, daha önce analiz edilen örnekler arasındadır ve petrielerde oluşan koloni morfolojilerinde çeşitlilik fazla olmadığı için az sayıda izolat analize alınmıştır. Bu bölgelerden seçilen izolatların, daha önceki çalışmalarımızda temsilcisi bulunmayan, *Planococcus* ve *Chromohalobacter* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir. *Planococcus* izolatları %12 MGM’de turuncu renkli koloniler oluşturması, *Chromohalobacter* ise yüksek konsantrasyonda tuz içeren besi ortamında (%23 MGM) çabuk gelişmesi açısından farklı bulunmuş ve analiz için seçilmiştir (Şekil 3 ve 4).

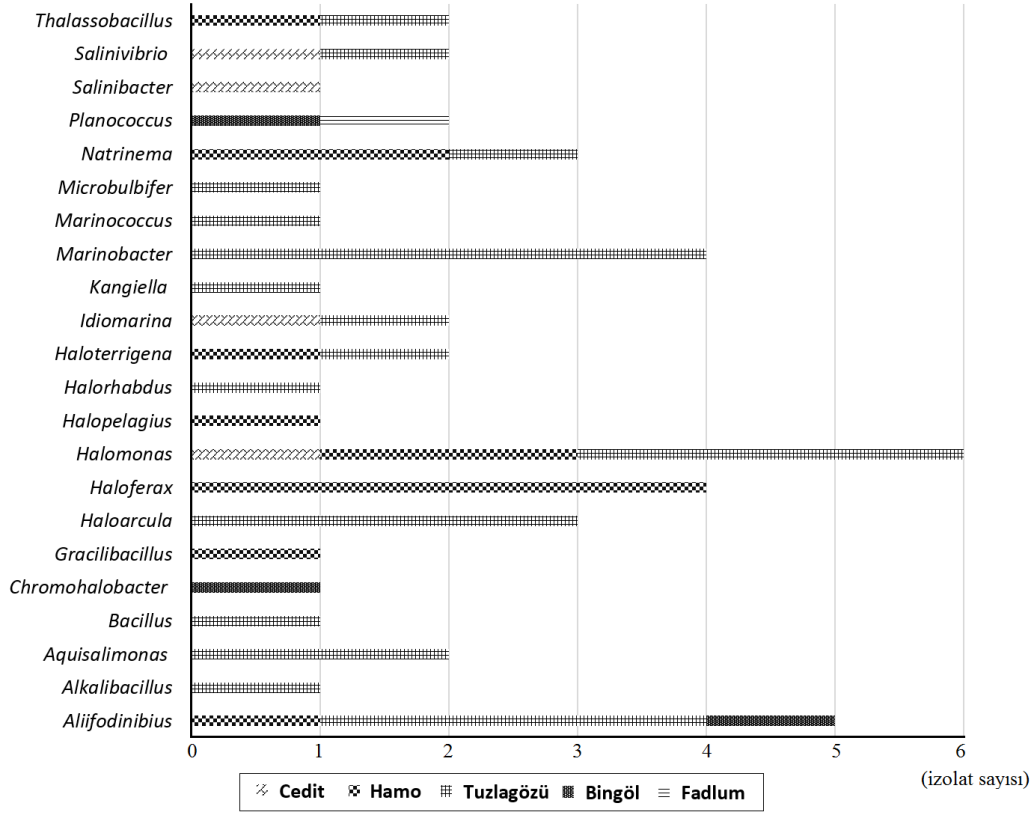
Cedit örneği daha önceki çalışmalarımızda analiz edilen örneklerden biri değildir. Tuzludan aralık ayında örnekleme gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tuzluluğu diğer örneklerle göre çok daha düşüktür. Koloni çeşitliliği oldukça az olmasına rağmen, daha önceden analiz etmediğimiz bir örnek olduğu için, temsilci izolatlar seçilmiştir ve bunların *Idiomarina*, *Salinivibrio*, *Halomonas* ve *Salinibacter* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).



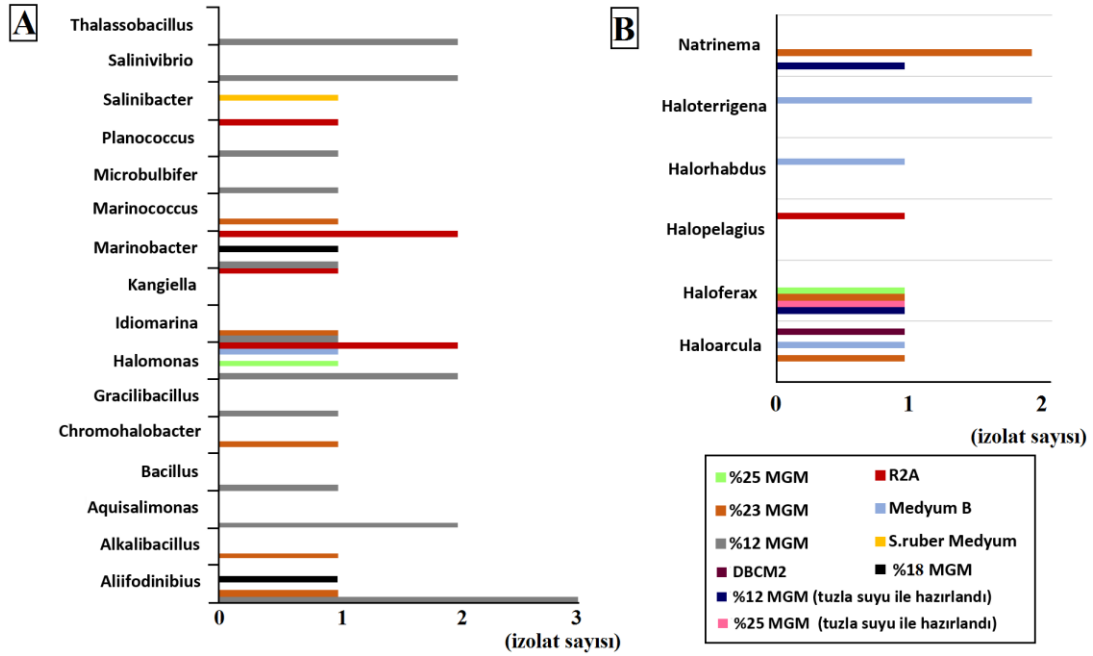
Şekil 1. Bu çalışmada elde edilen arke suşları (yıldızla işaretli) ve yakın ilişkili olduğu kültüre edilmiş gruplar arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Arkeal izolatların dizi bilgisi GenBankasına (NCBI) yüklenmiştir ve erişim numaraları figürde gösterilmiştir. *Archaeoglobus profundus* strain DSM 5631 dış grup olarak kullanılmıştır.



**Şekil 2.** Bu çalışmada elde edilen bakteri suşları (yıldızla işaretli) ve yakın ilişkili olduğu kültüre edilmiş gruplar arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç. Bakteriyal izolatların dizi bilgisi GenBankasına (NCBI) yüklenmiştir ve erişim numaraları figürde gösterilmiştir. *Hydrogenobacter hydrogenophilus* strain DSM 2913 dış grup olarak kullanılmıştır.



Şekil 3. 16S rRNA geni dizilene izolatların cins düzeyinde örnekleme bölgelerine göre sayısal dağılımı



Şekil 4. Bakteri (A) ve arke (B) izolatlarının izole edildiği besi ortamlarına göre cins düzeyinde dağılımı

#### 4.TARTIŞMA

Solar tuzlardaki mikroorganizmaların tanımlanması üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Çamaltı tuzlasından yapılan izolasyon çalışmalarında halofilik arke olan *Haloferax* ve *Halobacterium*'a ait izolatlar [18] ve *Halobacillus*, *Virgibacillus* ve *Halomonas* bakteri cinslerine ait temsilciler elde edilmiştir [19]. Ayvalık tuzlasındaki halofilik arkelerin karakterizasyonu ise Elevi ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [20]. Tuz gölü kıyısındaki Kaldırım ve Kayacık tuzlarından yapılan izolasyon çalışmalarında *Haloarcula*, *Halorubrum* ve *Halobacterium* grupları izole edilmiştir [21].

Viver ve arkadaşları [22], Akdeniz, Atlantik ve Pasifik okyanusuna kıyısı olan farklı solar tuzlardan geniş çaplı kültür çalışması gerçekleştirmişlerdir ve bu çalışmada halofilik arke izolatları arasında en çok temsil edilen grup *Halorubrum* olmuştur, bunu *Haloarcula* ve *Haloterrigena* takip etmiştir, bakterilerde ise *Salinibacter* en sık rastlanan grup olmuştur. Meksika ve Peru'daki tuzlardan da *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Salinibacter*, *Halomonas* ve *Salicola* cinslerinin temsilcileri izole edilmiştir [23, 24].

Daha önceki çalışmamızda [25] Sivas'ta bulunan Bingöl, Fadlum ve Tuzlagözü tuzlalarındaki mikrobiyal komünite yapısı kültür-bağımlı ve moleküler yöntemler kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. Kristalizasyon havuzlarında *Halobacteriaceae* üyelerinin dominant olduğu yapılan moleküler analizlerle belirlenmiştir ve *Haloquadratum*, *Halorubrum* ve *Haloarcula*'ya ait temsilcilerin ortamda yoğun olduğu belirlenmiştir. *Halorubrum* ve *Haloarcula* üyelerine ait temsilciler de kültür çalışmasında elde edilmiştir. Bakterilerde *Salinibacter* ve *Salisaeta*'ya ait filotiplerin dominant olduğu saptanmıştır ve izolasyon çalışmasında *Salinibacter*'e ait temsilciler izole edilmiştir.

Bu çalışmamızda ise, kültür çalışmalarında sıklıkla temsil edilenler dışındaki grupları saf kültür olarak elde etmeyi amaçladık. Bunun için ortamdaki varlığı daha önceki çalışmamızda moleküler analizlerle saptanan [25], ancak izolatlarımız arasında temsil edilmeyen gruplara odaklanılmıştır ve farklı besiyerleri kullanılarak izolasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

*Halobacteriales* ordosu üyeleri besin gereksinimleri açısından farklılık gösterebilmektedir. Genellikle kompleks besi ortamlarında gelişebilirler. Tercihen amino asitleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Maya özütü, halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar için besi ortamlarında en sık kullanılan karbon kaynağıdır [26, 27]. Daha önceki çalışmalarımızda sıklıkla kullandığımız MGM besi ortamı maya özütü ve pepton içermektedir; ancak bazı halofilik mikroorganizmaların kompleks ortamlarda iyi gelişemediği belirlenmiştir. Örneğin Great Salt Plains'nden (Oklahoma, USA) izole edilen *Halorhabdus* cinsine ait bir suşun maya özütü ve pepton gibi kompleks substratları parçalayamadığı ve sınırlı sayıda substratı kullanabildiği belirlenmiştir [28]. Çalışmamızda *Halopelagius* ve *Halorhabdus*'a ait suşlar ise kazamino asitleri ve düşük konsantrasyonda sitrat ve maya özütü içeren bir besi ortamından izole edilmiştir.

Kare şekilli *Haloquadratum* üyelerinin kristalizasyon havuzlarında yoğun dağılım gösterdiği pek çok çalışmada belirlenmiştir [4, 25] ve temsilcileri ilk kez Burns ve arkadaşları [29] tarafından izole edilmiştir. Bu grubun izolasyonu için pirüvat ve düşük konsantrasyonda organik madde (maya özütü, pepton) içeren DBCM2 besiyeri içeriğini oluşturmuşlardır [29]. Bizim çalışmamızda da aynı besiyeri kullanılmış olup bu gruba ait temsilcilerin izolasyonu amaçlanmıştır, ancak izolasyonunda başarısız olunmuştur.

Bakteri gruplarının izolasyonunda MGM besiyerinin etkili olduğu görülmüştür ve izolatların arasında en çok temsil edilen gruplar *Halomonas*, *Aliifodinibius* ve *Marinobacter* olmuştur. Bu bakteri gruplarının temsilcileri daha önceki çalışmamızda da [25] yoğun olarak elde edilmiştir. Halotolerant bakterilerin metabolik çeşitliliği, halofilik arkelere göre çok daha geniştir ve kolaylıkla pek çok temsilcisi izole



edilebilir. Bu çalışmada ise, özellikle düşük tuzluluğa sahip besi ortamlarının (%12 gibi) kullanımı ve taranan izolat sayısının artırılması farklı bakteri gruplarının elde edilmesinde etkili olmuştur.

İzolatlar arasında en çok temsil edilen *Haloferax* cinsine ait suşların 16S rRNA gen dizileri Telega hipersalin gölünden izole edilenlerle (Romanya) [30] ve *Halomonas* cinsine ait suşların dizileri Great Salt Plains'den elde edilenlerle yüksek dizi benzerliği göstermiştir [31].

Bu çalışmada farklı halofilik mikroorganizmaların izolasyonu için geniş çaplı tarama yapılmıştır ve *Halobacteriaceae* familyasına ait farklı halofilik arke türlerinin izolasyonunda, daha önceki yapılan kültür çalışmalarına kıyasla, daha etkili sonuç elde edilmiştir.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenen 1109F153 numaralı projenin bir bölümüdür. Destek için kurumumuza teşekkür ederiz. Ayrıca tuzlalara giriş ve örnek alınması konusunda yardımcı olan “Fadlum Tuzlası”, “Bingöl Tuzlası”, “Tuzlagözü Tuzlası” ve “Kaynak Çiçek Tuz İşletmesi” çalışanlarına, ayrıca Sayın Şükrü Çiçek’e teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

- [1] Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. J Ind Microbiol Biotechnol 2002; 28:56-63.
- [2] Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environ Technol 2010; 31:825-834.
- [3] Antón J, Rosselló-Mora R, Rodríguez-Valera F, Amann R. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. Appl Environ Microbiol 2000; 66:3052-3057.
- [4] Burns DG, Camakarlis HM, Janssen PH, Dyall-Smith ML. Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. Appl Environ Microbiol 2004; 70:5258-5265
- [5] Baati H, Guermazi S, Amdouni R, Gharsallah N, Sghir A, Ammar E. Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. Extremophiles 2008; 12:505-518.
- [6] Taşman CE. Tuzlarımız. MTA Dergisi 1945; 33:105-108.
- [7] Ergin Z. Tuzun üretim teknolojisi ve insan sağlığındaki yeri. Madencilik Dergisi 1988; 27:21-30.
- [8] Stchepinsky V. Sivas Vilâyeti İdrokarbürleri, Liğnitleri ve Tuzlu Menbaları, MTA Dergisi 1939; 4:88-94
- [9] Yazıcı H, Başibüyük A, Altınbilek S. Kemah (Erzincan) Tuzlaları. Türk Coğrafya Dergisi 1998; 33:53-78
- [10] Rodríguez-Valera F, Ventosa A, Juez G, Imhoff JF. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. Microb Ecol 1985; 11:107-115.

- [11] Oren A. Estimation of the contribution of halobacterial to the bacterial biomass and activity in solar salterns by the use of bile salts. *FEMS Microbiol Ecol* 1990; 6:41-47.
- [12] Dyll-Smith ML. The Halohandbook- Protocols for Haloarchaeal Genetics, Version 7.2, 2009; (<http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/index.html>).
- [13] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992; 89:5685-5689.
- [14] Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1985; 82:6955-6959.
- [15] Dereeper A, Audic S, Claverie JM, Blanc G. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol* 2010; 10:8.
- [16] Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 2008; 36:W465-W469
- [17] Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:1792-1797.
- [18] Yaşa İ, Kahraman Ö, Tekin E, Koçyiğit A. Çamaltı Tuzlasından Ekstrem Halofilik Archaea İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi* 2008; 2:117-121.
- [19] Mutlu MB, Güven K. Bacterial Diversity in Çamaltı Saltern, Turkey. *Pol J Microbiol* 2015; 64:37-45.
- [20] Elevi R, Assa P, Birbir M, Ogan A, Oren A. Characterization of extremely halophilic Archaea isolated from the Ayvalik Saltern, Turkey. *World J Microbiol Biotechnol* 2004; 20:719-725.
- [21] Birbir M, Calli B, Mertoglu B, Bardavid RE, Oren A, Ogmen MN, Ogan A. Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldırım and Kayacık salterns. *World J Microbiol Biotechnol* 2007; 23:309-316.
- [22] Viver T, Cifuentes A, Díaz S, Rodríguez-Valdecantos G, González B, Antón J, Rosselló-Móra R. Diversity of extremely halophilic cultivable prokaryotes in Mediterranean, Atlantic and Pacific solar salterns: evidence that unexplored sites constitute sources of cultivable novelty. *Syst Appl Microbiol* 2015; 38:266-275.
- [23] Sabet S, Diallo L, Hays L, Jung W, Dillon JG. Characterization of halophiles isolated from solar salterns in Baja California, Mexico. *Extremophiles* 2009; 13:643-656.
- [24] Maturrano L, Santos F, Rosselló-Mora R, Antón J. Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:3887-3895.
- [25] Çınar S, Mutlu MB. Comparative analysis of prokaryotic diversity in solar salterns in eastern Anatolia (Turkey). *Extremophiles* 2016; 20:589-601.
- [26] Oren A. The order Halobacteriales. In: *The prokaryotes*. NY, USA: Springer, 2006. pp. 113-164.

- [27] Schneegurt MA. Media and conditions for the growth of halophilic and halotolerant bacteria and archaea. In: *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Netherlands: Springer. 2012. pp. 35-58.
- [28] Wainø M, Tindall BJ, Ingvorsen K. *Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake, Utah. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50:183-190.
- [29] Burns DG, Janssen PH, Itoh T, Kamekura M, Li Z, Jensen G, Rodríguez-Valera F, Bolhuis H, Dyll-Smith ML. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; 57:387-392.
- [30] Enache M, Itoh T, Kamekura M, Teodosiu G, Dumitru L. *Haloferax prahovense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a Romanian salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; 57:393-397.
- [31] Caton TM, Witte LR, Ngyuen HD, Buchheim JA, Buchheim MA, Schneegurt MA. Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microb Ecol* 2004; 48:449-462.