

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDEKİ TUZLU
TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN
TUZA DAYANIKLI BAKTERİLERİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Furkan ORHAN

Doktora Tezi

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Prof Dr. Medine GÜLLÜCE

2013

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDEKİ TUZLU TOPRAKLARDAN
İZOLE EDİLEN TUZA DAYANIKLI BAKTERİLERİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Furkan ORHAN

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

ERZURUM

2013

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Doğu Anadolu Bölgesindeki Tuzlu Topraklardan İzole Edilen Tuza Dayanıklı Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu

Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, Furkan ORHAN tarafından hazırlanan bu çalışma 06/12/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **Biyoloji** Anabilim Dalı'nda **Doktora** tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu** (..../....) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Metin TURAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza :

Üye : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özlem BARIŞ

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: BAP-2012/479

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDEKİ TUZLU TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN TUZA DAYANIKLI BAKTERİLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Furkan ORHAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Bu çalışmada; Erzurum, Erzincan ve Iğdır illerinin tuzlu toprak örnekleri alınarak, bu topraklardaki tuza toleranslı 63 bakterinin izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen isolatların tanı ve karakterizasyonu konvensiyonel (morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler) ve moleküler yöntemlere [yağ asiti metil ester profilleri (FAME), 16S rRNA PCR ve 16S rRNA gen bölgesi DNA dizi analizi] göre yapıldı. Fenotipik ve genotipik verilerin birlikte değerlendirilmesi sonucu 33 izolat tür seviyesinde, 30 izolat ise cins düzeyinde tanımlanması yapıldı. Sekans analizi yapılan 63 izolata 2'si *Halomonas*, 6'sı *Halobacillus*, 4'ü *Zhihengliuella*, 2'si *Nesterenkonia*, 4'ü *Oceanobacillus*, 1'i *Marinibacillus*, 2'si *Virgibacillus*, 2'si *Jeotgalibacillus*, 5'i *Staphylococcus*, 2'si *Promicromonospora*, 2'si *Planococcus*, 1'i *Terribacillus*, 2'si *Thalassobacillus*, 1'i *Gracilibacillus*, 1'i *Microbacterium*, 1'i *Exiguobacterium* ve 25'i *Bacillus* olmak üzere toplam 17 cinsin tanısı ve karakterizasyonu yapıldı.

2013, 191 sayfa

Anahtar Kelimeler: Tuzlu topraklar, ılımlı halofilik bakteriler, karakterizasyonda konvensiyonel ve moleküler yöntemler (FAMEs, Sekans analizi)

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SALT TOLERANT BACTERIA IN SALT AFFECTED SOILS OF EAST ANATOLIA REGION

Furkan ORHAN

Ataturk University

Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

In the current study, 63 salt tolerant bacteria were isolated from salt-affected soil samples of Erzurum, Erzincan and Iğdır provinces. The obtained isolates were identified and characterized by conventional (morphology, physiology and biochemical tests) and molecular techniques [fatty acid methyl ester profile (FAMES) and 16 rDNA]. Regarding the results of phenotypic and genotypic data, 33 isolates were identified at species level and 30 isolates at genus level. Among 63 sequenced isolates 2 of them were *Halomonas*, 6 were *Halobacillus*, 4 were *Zhihengliuella*, 2 were *Nesterenkonia*, 4 were *Oceanobacillus*, 1 was *Marinibacillus*, 2 were *Virgibacillus*, 2 were *Jeotgalibacillus*, 5 were *Staphylococcus*, 2 were *Promicromonospora*, 2 were *Planococcus*, 1 was *Terribacillus*, 2 were *Thalassobacillus*, 1 was *Gracilibacillus*, 1 was *Microbacterium*, 1 was *Exiguobacterium*.

2013, 191 Pages

Key Words: Salt-affected soils, moderate halophilic bacteria, conventional and molecular (FAMES, sequence analysis) techniques

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji, Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü ve Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Araştırmanın planlanmasından yürütülmesine ve sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, büyük özveride bulunan, danışmanım, Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye, çalışmalarım sırasında her konuda yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarımın farklı aşamalarında ve tezin hazırlanma sürecinde fikirlerinden istifade ettiğim Sayın Prof. Dr. Metin TURAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖZKAN'a, Sayın Arş. Gör. Derya YANMIŞ'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Sedat BOZARI'ya manevi desteklerinden dolayı tüm Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışanlarına, çalışmalarımın bir bölümünü yürüttüğüm Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e, teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında sevgi, ilgi, maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Annem, Babam ve Kardeşlerime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP-2012/479) kapsamında desteklenmiştir.

Furkan ORHAN

Aralık 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	7
2.1. Tuzlu Toprakların Tanımı ve Sınıflandırılması	7
2.2. Topraklarda Tuzluluğu Oluşturan Faktörler	8
2.3. Toprağın Fiziksel ve Kimyasal Yapısı Üzerine Tuzluluk ve Sodikliğin Etkisi	9
2.4. Tuzluluk ve Sodikliğin Bitkiler Üzerine Etkisi	10
2.5. Tuzluluğun Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi	12
2.6. Tuzlu Toprakların İyileştirilmesinde Kullanılan Yöntemler	14
2.7. Halofilik Bakteriler	19
2.7.1. Halofiliklerin taksonomisi.....	19
2.7.2. Halofilik bakterilerin ekstrem koşullara adaptasyonlarını sağlayan yapılar....	22
2.7.2.a. Halofilik bakterilerin hücre duvarları.....	22
2.7.2.b. Halofilik bakterilerin ekstraselüler kapsülleri.....	22
2.7.2.c. Halofilik bakterilerin flagellaları	23
2.7.2.d. Sitoplazmik membran ve lipitleri	23
2.7.2. e. Halofilik bakterilerin polar lipid metabolizması	23
2.7.2.f. Halofilik bakterilerin yağ asidi metabolizması	25
2.7.2.g. Fotosentetik membranlar	27
2.7.2.h. Gaz vezikülleri.....	28
2.7.2.i. Endosporlar	28
2.7.2.j. Halofilik bakterilerin fizyolojileri	28
2.7.2.k. Halofilik bakterilerde iyon metabolizması	29

2.7.2.1. Halofiliklerde enzim özellikleri	31
2.7.2.m. Halofilik bakterilerde organik uyumlu çözünenler	32
2.7.3. Halofilik bakterilerin genetiği ve genomu	35
2.7.4. Halofilik bakterilerin biyoteknolojik uygulamaları ve potansiyelleri	36
2.7.4.a. Halofilik bakterilerin biyodegradatif potansiyelleri	37
2.7.4.b. Halofilik bakteri metabolitlerinin stabilizatör olarak kullanımı	38
2.7.4.c. Halofilik bakteriler tarafından biyopolimerlerin üretimi	38
2.7.4.d. Halofilik bakterilerin enzimleri	39
2.7.5. Bakteri sistematğinde kullanılan klasik yöntemler	39
2.7.6. Bakteri sistematğinde kullanılan moleküler yöntemler	40
2.7.6.a. Bakteri sistematğinde genotipik materyalin kullanılması	40
2.7.6.b. Ekstrakromozomal elementlerin bakteri sistematğinde kullanılması	42
2.7.6.c. Bakteri sistematğinde genomik dna parmak izi analizlerinin kullanılması	43
2.7.7. Bakteri sistematğinde kemotaksonomik yöntemlerin kullanılması	45
2.7.7.a. Bakteri sistematğinde mikrobiyal tanılama sistemi (MIS)	45
2.7.7. b. Bakteri sistematğinde biyolog sisteminin kullanılması	46
2.7.7. c. Bakteri sistematğinde çözünebilir protein profillemesinin kullanılması	47
2.7.7. d. Bakteri sistematğinde serolojik tanı yöntemlerinin kullanılması	48
3. MATERYAL ve YÖNTEM	49
3.1. Materyal	49
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	49
3.1.2. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı	50
3.2. Yöntem	55
3.2.1. Tuzlu topraklardan alınan bakterilerin izolasyonu ve muhafazası	55
3.2.2. İzolatların bazı fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi	56
3.2.2.a. İzolatların tuz toleranslarının belirlenmesi	56
3.2.2.b. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi	56
3.2.3. İzolatların bazı morfolojik özelliklerin belirlenmesi	56
3.2.3.a. Hücre morfolojisi	56
3.2.3.b. Gram reaksiyon testi	57
3.2.3.c. Endospor varlığının ve hücre içindeki yerinin belirlenmesi	57
3.2.3.d. Hareketlilik testi	58

3.2.4. İzolatların bazı biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi.....	58
3.2.4.a. Katalaz testi.....	58
3.2.4.b. Oksidaz testi	58
3.2.4.c. Amilaz testi	59
3.2.4.d. Nitrat redüksiyon testi	59
3.2.4.e. Nitrit redüksiyon testi.....	60
3.2.5. İzolatların bazı hidrolitik özelliklerinin belirlenmesi.....	60
3.2.5. a. Farklı şekerlerden asit üretme yeteneğinin belirlenmesi	60
3.2.5.b. Kazein hidrolizi	61
3.2.5.c. Eskülin hidrolizi	61
3.2.5.d. Jelatin hidrolizi	61
3.2.5.e. Tween 80 hidrolizi	62
3.2.6. Antibiyotik direnç özelliklerinin belirlenmesi	62
3.2.7. Moleküler testler	63
3.2.7.a. Bakteri izolatlarının yağ asit profillerinin belirlenmesi	63
3.2.7.b. İzolatların bazı genetiksel özelliklerinin belirlenmesi.....	64
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	69
4.1. Bakteri izolasyonu Sonuçları	69
4.2. İzolatların fizyolojik test sonuçları.....	69
4.2. İzolatların Morfolojik Test sonuçları	71
4.3. İzolatların Biyokimyasal Test sonuçları.....	74
4.4. İzolatların Hidroliz Test sonuçları.....	76
4.5. İzolatların Şeker Fermentasyon Test sonuçları	78
4.6. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	80
4.9. İzolatların 16S rRNA BLAST Sonuçları	92
5. TARTIŞMA.....	94
KAYNAKLAR	110
EKLER.....	129
EK 1. EM1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	129
EK 2. EM2 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	130
EK 3. EM3 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	131
EK 4. EM4 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	132

EK 5. EM7 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	133
EK 6. EM8 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	134
EK 7. EM9 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	135
EK 8. EM10 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	136
EK 9. EM11 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	137
EK 10. EM12 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	138
EK 11. EM13 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	139
EK 12. EM14 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	140
EK 13. EM15 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	141
EK 14. EM16 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	142
EK 15. EM17 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	143
EK 16. EM18 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	144
EK 17. EM19 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	145
EK 18. EM20 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	146
EK 19. EM21 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	147
EK 20. EM22 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	148
EK 21. EM23 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	149
EK 22. EM24 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	150
EK 23. EM25 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	151
EK 24. EM26 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	152
EK 25. EM28 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	153
EK 26. EM29 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	154
EK 27. EM30 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	155
EK 28. EM31 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	156
EK 29. EM32 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	157
EK 30. EM33 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	158
EK 31. EM34 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası	159
EK 32. EK1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	160
EK 33. EK2 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	161
EK 34. EK3 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	162
EK 35. EK4 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	163
EK 36. EK5 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	164

EK 37. EK6 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	165
EK 38. EK7 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	166
EK 39. EK8 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	167
EK 40. EK9 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	168
EK 41. EK10 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	169
EK 42. EK12 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	170
EK 43. EK13 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	171
EK 44. EK14 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	172
EK 45. EK15 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	173
EK 46. EN1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	174
EK 47. EN2 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	175
EK 48. EN3 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	176
EK 49. EN4 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	177
EK 50. EN5 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	178
EK 51. EN6 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	179
EK 52. EN7 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	180
EK 53. EN8 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	181
EK 54. EN9 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	182
EK 55. EN10 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	183
EK 56. EN11 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	184
EK 57. EN12 Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	185
EK 58. IA Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	186
EK 59. IB Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	187
EK 60. IC Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	188
EK 61. ID Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	189
EK 62. IE Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	190
EK 63. IF Kodlu İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Sırası.....	191
ÖZGEÇMİŞ	192

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenosine-5'-triphosphate
Bp	Base pair (Baz çifti)
CTAB	Hekzadesil trimetil-amonyum bromit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
g	Gram
HPLC	Yüksek basınç sıvı kromatografisi
H ₂ O ₂	Hidrojen per oksit
KI	Potasyum iyodit
KOH	Patasyum hidroksit
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre (10 ⁻³)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre (10 ⁻⁶)
µM	Mikromolar
NaCl	Sodyum klorit tuzu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
TAE	Tris Asetat EDTA tamponu
TE	ris-EDTA tamponu
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
tRNA	Transfer RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Abiyotik stres şartlarında bitki-mikroorganizma ilişkisi	18
Şekil 2.2. 16 S rDNA sekans karşılaştırmalarına göre yapılan evrensel filogenetiksel ağaç	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Uygulama çeşidine göre topraktan uzaklaştırılan Na ⁺ ve oluşturulan nispi CO ₂ miktarları	16
Çizelge 4.1. İzolatların fizyolojik test sonuçları	70
Çizelge 4.2. İzolatların morfolojik test sonuçları.....	72
Çizelge 4.3. İzolatların biyokimyasal test sonuçları	74
Çizelge 4.4. İzolatların hidroliz test sonuçları	76
Çizelge 4.5. İzolatların şeker fermentasyon test sonuçları	78
Çizelge 4.6. İzolatların antibiyotik direnç test sonuçları	80
Çizelge 4.7. İzolatların yağ asidi tanı sonucu ve yüzde tanı değerleri.....	82
Çizelge 4.8. Sherlock 6.0 kütüphanelerine göre izolatların yağ asit profilleri	84
Çizelge 4.9. İzolatların 16S rDNA BLAST sonuçları	92

1. GİRİŞ

21. yüzyılın en önemli konularını tarımsal stratejilerin geliştirilmesi oluşturmaktadır. Zira Birleşmiş milletlerin tahminine göre dünya nüfusunun 2025 yılında 8.01 milyara ulaşacağı göz önünde bulundurulursa 50 yıl içinde bu rakam bugünkü nüfusun 2 katına yaklaşacak ve böyle bir nüfusu beslemek için ise yeni tarımsal politika ve stratejilere ihtiyaç duyulacaktır (Ladiero 2012). Bu stratejilerin başında ise mevcut alanların iyileştirilmesi ve problemlere yönelik çözümlerin geliştirilmesi gelmektedir. Mevcut alanların iyileştirilmesi kapsamında ise dünya genelindeki kullanılabilir tarımsal arazilerin kullanımını sınırlandıran veya bunlardan verim alınamamasına neden olan önemli etmenlerden biri olarak karşımıza çıkan topraktaki tuz oranının artması ile ilgili mücadeleler göze çarpmaktadır. Tuzlaşma yeryüzünde en yaygın görülen toprak degradasyon süreci olup Avrupa da yaklaşık 1 ile 3 milyon hektar alanı etkilerken, çölleşmeye de neden olmakta ve tüm dünya genelinde insan, ekosistem sağlığı ve toprak üretkenliği üzerine zararlı etkileri bulunmaktadır (Jadhav *et al.* 2010). Dünya yüzeyinde tahmini olarak %40'lık bir alanda mevcut olan tuzluluk sorununun olduğu düşünülürse bu problemle mücadelenin gerekliliği daha iyi anlaşılacaktır (Jadhav *et al.* 2010).

Tuzlu topraklar, genelde aşırı miktarlarda çözülebilir sodyum, kalsiyum ve magnezyum'un kloritler, sülfatlar ve bikarbonatlar içermesi şeklinde tanımlanır. Toprak tuzluluğunun değerlendirilmesinde genelde dört faktör/indeks göz önünde bulundurulur. Elektrik iletkenlik (EC) değeri santimetrede 4.000 mikrosimensi geçtiğinde, değişebilir sodyum oranının (ESP) 15'in altında olduğunda, pH değeri 8,5 veya altında olduğunda ve tuzluluğunun (toplam eriyebilir tuz içeriğinin) 0,2 değerinden büyük olması durumunda topraklar tuzlu topraklar kategorisinde değerlendirilir (Rengasamy 2010).

Tuzluluk toprak ve sulardaki toplam çözünen tuz miktarının artması ile meydana gelir. Tuzluluk, oluşum şekline göre birincil tuzluluk ve ikincil tuzluluk olarak nitelendirilir. Tuzluluğun doğal sebeplerden (anakaya, iklim, taban suyu vb. faktörlerden) dolayı meydana gelmesi birincil tuzluluk olarak adlandırılır ve bu faaliyetler neticesinde

serbest kalan tuzlar bulundukları yerden yer altı sularıyla yayılırlar. Tuzluluğun, sulama ve drenaj gibi insan faaliyetleri sonucu oluşması ise ikincil tuzluluk olarak adlandır ve bu yolla meydana gelen aşırı miktardaki su, toprak profilinin değişmesine ve/veya yer altı sularının yer değiştirmesinde rol oynar (Anonymous 2005). Aşırı miktarda biriken su, su tabakası seviyesini veya taban suyuna yapılan basıncı artırır. Su seviyesi toprak yüzeyine yakın olduğunda ise buharlaşma meydana gelir ve tuzun toprakta birikmesine neden olur (Werner and Lockington 2004).

Toprak solüsyonunda çözülebilir tuzların yüksek konsantrasyonda olması toprağın su dinamiğini, fiziksel kararlılığını ve topraktaki besin hareketini etkileyerek toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirir. Toprak partiküllerinin içinde sodyum konsantrasyonunun diğer tuz konsantrasyonlarından fazla olması toprağın dağılmasına ve toprak yapısının bozulmasına neden olur. Bu tür toprakların ıslanmaları toprak partiküllerinin kabarması ve dağılmasıyla sonuçlanır ki, bu durum toprak yapısının bozulmasının ana sebeplerinden biridir. Yapısı bozulan toprağın geçirgenliği ve süzme kapasitesi değişir. Yani toprağın kabarması ve agregatların gevşemesiyle toprak geçirgenliği, hidrolik iletkenlik ve süzdürme oranı düşer (Rengasamy 2006).

Tuzlu topraklar hem bitkilerin az büyümesine hem de düşük ürün elde edilmesine neden olur. Tuzlu topraktaki çözülebilen iyonlar, bitkilerin osmotik potansiyelini düşürmek suretiyle bitkileri etkilerler. Toprağın tuz yoğunluğundaki artış, suyun bitki köklerine girişini engelleyerek, bitkilerde transpirasyon ve fotosentez gibi yaşamsal faaliyetlerin düşmesine ve bitkinin strese girmesine neden olur (Waisel 1972). Ayrıca, tuzluluk direkt olarak tuzun kimyasal etkisiyle bitkinin büyümesini ve metabolizmasını sekteye uğratarak veya dolaylı olarak toprağın havalandırılmasını, geçirgenliğini ve yapısını etkileyerek bitki büyümesini sınırlandırabilir. Tuzluluğun bitki üzerindeki etkileri iklim, toprak durumu, tarımsal uygulamalar, sulama politikaları, ürün tipleri ve çeşitleri, bitki büyüme seviyesi ve tuz içeriğiyle değişir (Sparks 1995). Tuzluluk genelde her ürün için farklı olan elektrik iletkenliği belli bir değeri geçmedikçe ürün verimini etkilemez. Bu tuzluluk seviyesinin eşik değeri veya elektrik iletkenliğinin eşik değeri olarak bilinir ve bitkiden bitkiye değişiklik gösterir (Maas 1990). Ürün veriminin düşmesine ilaveten

tuzluluk arazinin taşıma kapasitesini düşürür, çimlenmeyi geciktirir ve yapılabilecek ekim seçimini sınırlandırır (Zhang *et al.* 2010).

Tuzluluğun, toprakta bulunan mikroorganizmalar üzerine de çok önemli etkileri vardır. Topraktaki iyon konsantrasyonun (özellikle sodyum iyonunun) 0,15M'dan daha fazla olması hiperosmotik ortamların oluşmasına ve bu durum sonucunda suyun mikroorganizma hücresinden uzaklaşmasına neden olur. Bu şartlar altında hücreler büzülürler. Ayrıca, yüksek sodyum iyon konsantrasyonu suyun bu iyonla etkileşiminden dolayı mikroorganizmaların suya ulaşmalarını/suyu kullanmalarını zorlaştırır. Sodyum iyonunun mikroorganizmaların büyümesi üzerine etkisi her bir mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu su aktivitesine bağlı olarak değişir. Hipertonik şartlara mazur kalan mikroorganizmalardan halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar hariç diğerleri ya ölürler ya da dormant kalırlar. Genellikle, toprağın yüksek tuzlulukta olması bitki gelişiminin yanında topraktaki mikroorganizma aktivitelerini de düşürür. Mikroorganizma aktivitelerinin düşmesi de dolaylı olarak bitkiye gerekli besin maddelerin kullanılabilirliğini etkiler (Kreuzwieser and Gessler 2010).

Tuzlu toprakların iyileştirilmesinde öncelikle toprak tuzluluk değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerin belirlenmesi gerekmektedir. Belirlenen parametre değerleri doğrultusunda atılması gereken adımlar ve iyileştirme yöntemleri tespit edilmelidir. Tuzlu bir toprağın ıslahında bitki kök bölgesi derinliğindeki eriyebilir tuzların uzaklaştırılması gerekir. Genel olarak tuzluluk sorunu bulunan bir toprağın iyileştirilmesinde kullanılan yöntemlerden biri yıkama işlemidir. Toprağın özelliğine göre yıkama, devamlı göllendirme, aralıklı göllendirme ve yağmurlama uygulamaları şeklinde yapılabilir. Tuzlu-sodyumlu toprakların ıslahında ise toprağa çeşitli kimyasal maddelerin eklenmesinden sonra yıkama işlemi yapılarak sorun giderilmeye çalışılmaktadır. Benzer şekilde sodyumlu toprakların iyileştirilmesinde de toprağa çeşitli kimyasal maddelerin ilavesi ve ardından yıkama işlemi ile iyileştirme sağlanmaktadır (Vukadonovic and Rengel 2007).

Hem tuzlu-sodyumlu hem de sodyumlu toprakların iyileştirilmesinde en çok kullanılan kimyasallar; jips ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), kalsiyum klorid (CaCl_2), kalsit (CaO_3), hidroklorik (HCl) ve sülfirik asit (H_2SO_4)'tir. Jips ve kalsiyum klorid uygulaması ile direk olarak toprak yüzeyine kalsiyum iyonu sağlanarak sodyum iyonu ile yer değiştirebilirken sülfirik asit ve hidroklorik asit uygulaması ile topraktaki kalsit çözünmesi sağlanır (Mace *et al.* 1999). Sorunlu toprakların iyileştirilmesinde bu iyileştiriciler dışında organik iyileştiriciler (kentsel atık çamuru) (Anjos and Mattiazzo 1998), tarımsal ve endüstriyel atıklar da kullanılmaktadır (Dubey and Mondal 1993). Tuz sorunu bulunan toprakların yıkama veya kimyasal madde ilavesiyle iyileştirilmesi ancak uygun ve yeterli sulama suyu veya yağmur olması durumunda mümkün olabilir. İyi kalite sulama suyu yetersizliği, kırsal bölgelere iyi kalite su sağlama maliyetlerinden ve iyileştirmede kullanılan kimyasal maddelere harcanan giderlerden dolayı bu tür iyileştirme metotlarının kullanımını sınırlandırmaktadır (Shakir *et al.* 2011).

Tuzlu toprakların iyileştirilmesinde kullanılan yöntemlerden birisi de biyolojik yöntemlerdir. Son zamanlarda yapılan birçok araştırmada tuzluluk sorunu bulunan toprakların iyileştirilmesinde bitki yardımcı yaklaşımların fiziksel metotlardan daha etkili olduğu belirtilmiştir (Zhao and Qin 2005; Quadir *et al.* 2008; Li *et al.* 2008). Bu tür topraklara tuza toleranslı bitkilerin ekimiyle buharlaşan suyun ciddi oranda azaldığı tespit edilmiştir (Quadir *et al.* 1996; Li *et al.* 2008). Birçok arazi çalışmasında elde edilen sonuçlar tuzluluk sorunu bulunan topraklara tuz toleranslı bitkilerin ekimiyle oluşan yoğun ve kalın kök sistemi sayesinde toprakların fiziksel olarak iyileştirilmesi ve tuzların toprağın daha derin katmanlarına itildiğini göstermiştir (Sun *et al.* 2002; Akher *et al.* 2004). Ayrıca bu tür uygulama ile oluşan vejetasyonun toprak yüzeyindeki nem kaybını ve tuz toplanmasını minimize ettiği de belirtilmiştir (Ghaly 2002; Ling *et al.* 2003).

Tuzlu toprakların iyileştirilmesinde mikroorganizmaların kullanımı ise son zamanlarda sıklıkla üzerinde durulan konulardan biridir (Yuan *et al.* 2007; Chookietwattana and Maneewan 2012; Martins and Peixoto 2012). Bu tür mikroorganizmalar direkt veya dolaylı mekanizmalarla veya her iki mekanizmayla bitki büyümesini teşvik ederler. Bu

mikroorganizmalar dolaylı olarak sideroforlarıyla veya ürettikleri antibiyotik ve ekstra selüler hidrolitik enzimleriyle bitki patojenlerini engellerler (Glick *et al.* 1998). Bu mikroorganizmalar direk mekanizmalarla azot fikse etme, sideroforlarla demir sağlama, fosfat çözme, indol asetik asit, sitokin ve giberallin gibi bitki hormonları üretme ve kuraklık, ağır metal, patojen saldırısı ve tuzluluk gibi stres şartlarında bitkide seviyesi artan etilenin seviyesini düşüren aminosiklopropan karbosiklik asit deaminaz aktiviteleri sayesinde bitki büyümesini teşvik ederler (Grichko *et al.* 2001; Mayak *et al.* 2004; Reed *et al.* 2005; Indiragandhi *et al.* 2008; Zahir *et al.* 2009; Turan *et al.* 2012). Tuzlu toprakların iyileştirilmesi ve buradaki bitkilerin büyümesinin teşvik edilmesi için kullanılacak olan mikroorganizmaların ortama adaptasyon sağlamış olan doğal floradan elde edilmesi dolayısıyla halotolerant veya halofilik mikroorganizmaların seçilmesi oldukça doğru bir yaklaşımdır. Örneğin bu anlamda bir halotolerant olan *Pseudomonas putida* kanola bitkisinde tuz stresinin artırdığı etilen seviyesini düşürerek bitki büyümesini teşvik ettiği rapor edilmiştir (Cheng *et al.* 2007).

Halofilik mikroorganizmaların hücre yüzeyinde yüklü fosfolipidler fazladır ve bu sayede suyun az olduğu ortamlarda mikroorganizmaları suya karşı çekerek hücrelerin kurumasını engeller. Bu mikroorganizmaların sitoplazmik membranları; dış tuz konsantrasyonlarında iyon geçirgenliğini ve internal membran protein aktiviteleri gibi fonksiyonları ayarlamak için oldukça değişken düzenlemeler geçirirler (Russel 1993). Artan tuz konsantrasyonuyla genellikle siklopropan yağ asidi ve doymamış yağ asitleri artarken, dallanmış yağ asitlerinin oranı azalır (Oren 2002; Chen *et al.* 2009; Sanchez-Porro *et al.* 2009). Halofilik mikroorganizmaların fizyolojileri de çok değişkendir. Genelde intraselüler K^+ konsantrasyonu dış ortamındaki K^+ konsantrasyonundan oldukça fazla, Na^+ konsantrasyonu ise dış ortamdan daha azdır. Bu mikroorganizmaların, protein ve enzimleri yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivite gösterirler. Halofilik mikroorganizmalar; osmotik dengeyi ve turgoru sağlamak için düşük moleküler ağırlıklı ‘uyumlu çözünen’ denilen organik bileşikler ya sentezlerler ya da dış ortamdan alırlar (Oren 2002; Pastor *et al.* 2010).

Tuzlu toprakların iyileştirilmesinde topraktaki mevcut tuzluluğa adapte olmuş olan mikroorganizmaların kullanımı, iyileştirmede kullanılan yöntem ister kimyasal ister bitki temelli olsun her şekilde hem mevcut yöntemin etkinliğini artıracak hem de tek başına kullanımı sorunlu toprağın iyileştirilmesine katkı sağlayacaktır (Chang *et al.* 2013). Çünkü tuzlu şartlara adapte olan bu mikroorganizmalar hayatta kalabilmek için gerçekleştirdikleri bir takım yaşamsal faaliyetleri (çevrelerinden besin alımı, metabolizma artıklarının salınması, çeşitli maddelerin parçalanması, besin döngüsü vb.) sonucu sorunlu toprakların yapısında değişikliklere neden olurlar.

Bu bilgiler ışığında Erzurum, Erzincan ve Iğdır illerindeki tuzlu topraklarından mikroorganizmalar izole edilmiştir. İzolatların tuzlu toprakların iyileştirilmesindeki potansiyelleri araştırılarak bu potansiyele sahip izolatların karakterizasyonu ve tanımlarının yapılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Tuzlu Toprakların Tanımı ve Sınıflandırılması

Tuzluluk, toprak veya sulara farklı tuzların bitkinin büyümesini engelleyebilecek konsantrasyonlarda bulunması ve toprak verimliliğini azaltması olarak tanımlanır. Toprak derişimini değiştiren tuz formlarının başında sodium klorür (NaCl) gelirken klorür (KCl, MgCl₂, CaCl₂), sülfat (Na₂SO₄, MgSO₄, K₂SO₄, CaSO₄), nitrat (Na₂NO₃, KNO₃) ve bikarbonat (CaCO₃, MgCO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃, NaHCO₃) türevleri ile boratlar ve karbonatlar toprak tuzluluğuna neden olan başlıca tuzlardır (Errabii *et al.* 2006). Kurak bölge topraklarında toprak eriyiğinde tuzların fazlaca birikmesi ve Na⁺ konsantrasyonunun artması, değişim kompleksi olan kil mineralleri ve humusun Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ ile doymasına ve Na⁺'un değişim kompleksine geğmesine neden olmaktadır. Kurak bölge topraklarında buharlaşmanın çok yoğun olması ve az miktarda bulunan suyun bitkiler tarafından alınması sonucu, toprak eriyiğinde bulunan tuzlar çözünürlük sınırlarını aşar ve CaCO₃, MgCO₃ ve CaSO₄ şeklinde çöker. Bu durumda, sodiklik yani Na⁺'un topraktaki nispi oranı' artmış olur (Niu *et al.* 2010). Sadece topraktaki sodiklik değil sulama sularında oluşabilecek sodiklik de toprak yapısı ve geğirgenliği üzerine olumsuz etki yapmaktadır (Bardhan *et al.* 2007). ABD Riverside Bölge Tuzluluk Laboratuvarı tarafından yapılmış olan sınıflandırma şekli ile tuzlu ve alkali topraklar *Tuzlu topraklar*, *Tuzlu-Alkalin (sodik) topraklar* ve *Tuzsuz-Alkalin topraklar* olmak üzere 3 sınıfa ayrılmıştır.

Tuzlu topraklar: Bu topraklar en fazla Na⁺, farklı miktarlarda Ca⁺², Mg⁺² ve K⁺ olmak üzere çok miktarda eriyebilir tuz katyonları içerirler. Tuzlu topraklarda Cl⁻ ve SO₄⁼ başta olmak üzere HCO₃⁼ ve NO₃⁻ iyonlarına rastlanırken CO₃⁼ a genellikle rastlanılmaz. Doygunluk diğer bir ifadeyle saturasyon, toprak ekstraktlarının sahip olduğu referans değerler belirtilecek olursa; 25°C' deki elektrik kondüktivitesi (elektrik geğirgenliği) (EC x 10³) > 4 dS m⁻¹, değişebilir Na⁺ yüzdeleri (ESP) < %15 ve pH'ları < 8.5'tir.

Tuzlu -Alkalin (sodik) topraklar: Tuzlaşma ve alkalileşme olaylarının birlikte meydana gelmesiyle oluşan bu topraklar hem görünüşleri hem de diğer özellikleri yönünden tuzlu topraklara benzerler. Fazla tuzları yıkandığında toprak eriyiğindeki tuz konsantrasyonunun azalması ve değişebilir Na^+ hidrolize olarak NaOH 'ı oluşturması sonucunda tuzsuz-alkali topraklara dönüşürler. Çünkü havanın CO_2 'i ile birleşerek Na_2CO_3 'a dönüşen NaOH , toprağın pH'sını 8.5'un üzerine çıkartarak kuvvetli alkalilik meydana getirir. Bu toprakların doygunluk ekstraktının 25°C 'deki elektrik geçirgenliği ($\text{EC} \times 10^3$) $> 4 \text{ dS m}^{-1}$, değişebilir Na^+ yüzdeleri (ESP) > 15 ve pH'ları bazen > 8.5 olabilir.

Tuzsuz-Alkalin topraklar: Genellikle tuzlu-alkali toprakların yıkanması sonucu oluşan topraklardır. Na^+ ile doymuş olan kil fraksiyonu sonunda ufalanabilen bir bileşik olan Na_2CO_3 'a dönüştüğünden dağılmış bir haldedir. Dağılmış olan bu fraksiyon sularla taşınarak toprağın üst yüzeyinin 5–10 cm alt kısımlarında çok sert tabakaların oluşmasına neden olur. Tarıma elverişli olmayan bu toprakların doygunluk ekstraktlarının 25°C 'deki $\text{EC} \times 10^3 < 4 \text{ dS m}^{-1}$, değişebilir Na^+ yüzdeleri (ESP) $> \%15$ ve pH'ları genellikle 8.5–10 arasındadır.

2.2. Topraklarda Tuzluluğu Oluşturan Faktörler

Farklı coğrafik bölgelerde bulunan tuzlu toprakların içerdikleri tuz çeşitleri ve bu tuz çeşitlerinin bulunma konsantrasyonları birbirinden oldukça farklıdır. Bir toprakta biriken tuzların çeşidini, daha çok yüzey ve drenaj suyu ve suyun devamlı temas halinde bulunduğu veya içerisinden geçtiği jeolojik yapı ve toprak materyali tayin eder. Bu faktörlerin yanı sıra, tuzlu ve alkalin toprakların oluşumlarında iklimin rolü büyüktür. Bölgenin kurak veya yarı kurak iklim karakterinde olması, yani yıkanma ve yağışın az, buharlaşmanın ise fazla olması sularla taşınıp götürülemeyen tuzları düz alanlarda, toprak suyunda ve yüzey sularında biriktirdiğinden tuz konsantrasyonunu artırır. Oysa nemli iklim bölgelerinde fazla yağışlar nedeniyle eriyebilir tuzlar yıkanarak topraklardan uzaklaşır. Bu nedenledir ki nemli iklim bölgelerinde sadece nehir ağızlarındaki deltalar dışında tuzlu topraklara pek rastlanmaz. Toprakların

tuzlulaşmasında, bilinçsiz sulama, drenaj olanaklarının yetersizliği, yüksek taban suyunun etkisi ve yanlış gübrelemenin de etkisi çok büyüktür.

Aynı zamanda sulamada kullanılan suların kalitesi de tuzluluğa neden olan faktörlerdendir (Yıldırım 2006). Dünya çapında sulanan alanların yaklaşık %33'ünde tuzluluk problemi mevcuttur. İyi kalitede sulama suları bile 100-1000 g/m³ düzeyinde tuz içermektedir. Bu miktarda tuz içeren sulama sularının yılda 10.000 m³ kullanıldığı düşünülürse toprağa ortalama 1-10 ton tuz verilmiş olmaktadır.

2.3. Toprağın Fiziksel ve Kimyasal Yapısı Üzerine Tuzluluk ve Sodikliğin Etkisi

Genelde kurak ve yarı kurak bölgelerde bulunan tuzlu topraklarda değişik konsantrasyonlarda birçok tuz çeşidi bulunur. Topraktaki çözülebilir tuzların yüksek konsantrasyonu; toprağın su dinamiğini, fiziksel kararlılığını ve topraktaki besin hareketini etkileyerek toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirir (Sardinha *et al.* 2003).

Oldukça farklı bileşenlerden oluşan toprak karışımının içinde sodyum konsantrasyonunun diğer tuz konsantrasyonlarından fazla olması, toprağın dağılmasına ve toprak yapısının bozulmasına neden olur. Bu tür topraklar ıslandıklarında, kabarma/dağılma meydana geldiğinden toprak yapısının bozulmasına sebep olur (Rengasamy 2006). Sodik topraklar yağmur veya sulamadan hemen sonra aşırı ıslanırlar ve birkaç gün içinde suyun buharlaşmasıyla hemen kururlar. Bu topraklarda yapı kararsızlığı toprak yüzeyine yakın yerlerde bir yalıtım tabakasının oluşturur ve toprağın aşırı şekilde sertleşmesine neden olur. Aşırı miktarda kuruyan topraklarda kök gelişimi ve bitki büyümesi çok yavaş olur. Bitki örtüsünün sağlıklı gelişememesi, rüzgâr ve su tarafından meydana getirilen erozyon riskini de artırmaktadır. Bu şekilde kabaran ve dağılan toprak zamanla toprak yüzeyinden toprağın biraz daha derinine inerek yağmur suyunun veya sulama suyunun toprağın daha derinlerine inmesini engeller ve bu alanda hidrolik iletkenliğin düşmesine sebep olur. Hidrolik iletkenlikteki değişiklik ise besinlerin yer altı sularına hareket etmesine engel olur. Ayrıca, sodyum, bor ve

alüminyumun çözünürlüğü yüksek pH nedeniyle arttığından, alkali toprak yapısı toprakta iyon toksisitesine neden olur. Üretilen tarım ürünlerinin toprakta bulunan iyon toksisitesinden etkilenecek bu iyonları biriktirdikleri ve daha sonra besin zinciriyle insanlara ulaştırdıkları göz önüne alınırsa, sadece tarım ürünlerinin verimliliğini arttırmak için değil insan ve çevre sağlığını korumak adına da topraktaki tuzluluk ve sodiklik önemli bir sorundur (Rengasamy 2006).

2.4. Tuzluluk ve Sodikliğin Bitkiler Üzerine Etkisi

Tuzlu topraklarda, toprak çözeltisinin düşük osmotik potansiyeli ve spesifik iyon toksisitesi bitki büyümesini doğrudan inhibe edebilir. Eğer tuzluluk etkeni, farklı iyonlarla bileşikler oluşturarak esansiyel katyon ve anyonların alımına engel olursa veya hücre içinde bağlanmayla oluşması gereken bileşiklerle rekabet içinde olursa bitkilerde besin yetersizliğine neden olur (Marschner 1995).

Toprak çözeltisinde tuzların aşırı bulunması bitkinin kök gelişimini; buharlaşmasınaterlemesine; fotosentezini; protein sentezini ve enzim aktivitesini düşürerek bitki büyümesini engeller ve tarımsal verimi düşürür (Chhabra 1996). Tuzun bitki fizyolojisine etkisi ve bitkilerin tuza direnç mekanizmaları ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Maser *et al.* 2002; Munns *et al.* 2002).

Tuzlu ve tuzlu-sodik topraklarda bulunan bitkilerin su alma kabiliyetleri kök bölgelerindeki çözünmüş tuzlardan dolayı düşüktür. Çünkü tuzlu ve tuzlu-sodik topraklarda çözülebilen tuzların çok yüksek olması, düşük osmotik potansiyel oluşturur (Shaw 1999; Keren 2000; Rengasamy 2010). Bu yüzden, tuzlu bölgelerde büyüyen bitkilerde, osmotik stres nedeniyle bitkilerin büyümesinin yavaş, renklerinin sarımsı-yeşil olması gibi kuraklık semptomları görülür (Keren 2000). Hem tuzluluğun hem de kuraklığın olduğu bölgelerde ise bitkiler bünyelerine su alabilmek için yüksek osmotik potansiyelin üstesinden gelmek zorundadırlar. Dolayısıyla bitkiler hayatta kalabilmek için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyarlar. Havanın çok sıcak olduğu iklimlerde ve mevsimlerde, bitkilerde terleme faaliyeti, toprakta buharlaşma olayı artar. Bu faaliyetler

sonucu topraklar kurduğundan toprak çözeltisindeki tuz konsantrasyonu artar ve toprak suyunun osmotik potansiyeli artar (Rengasamy 2006).

Tuzlu topraklarda bitkiler toprak çözeltisindeki yüksek osmotik potansiyelin üstesinden gelmek için hücrelerindeki osmotik potansiyeli toprağa göre artırmak zorundadırlar. Bu dengeyi ayarlamak için bünyelerinde çeşitli organik ve inorganik bileşikleri toplamak zorunda kaldıklarından, normal yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştirmek için daha fazla enerji harcarlar (Fitzpatrick *et al.* 2001). Yüksek stres altındaki bu bitkilerde yüksek enerji ihtiyacı bitkinin yavaş büyümesine hatta bitkinin çimlenmesinin gecikmesine veya engellenmesine neden olabilir (Oster *et al.* 1996; Bell 1999). Bu nedenle tarımsal değeri olan bitkilerde tuz stresi çimlenme ve vejetatif büyüme faaliyetlerini sekteye uğrattığından hasat döneminde ciddi ürün kayıplarına neden olur (Eynard *et al.* 2005). Bazı çalışmalarda osmotik potansiyelin -1.0 MPa'nın altına düşmesi bitki üretim verimini ekonomik zarar oluşturacak şekilde düşürmüştür (Kelly and Rengasamy 2006). Örneğin hayvan yemi olarak kullanılan *Trifolium alexandrinum* bitkisi tuzlu suyla (10 dSm-1) sulandığında distile suyla sulandığı duruma göre kök kuru ağırlığı %95; sürgün kuru ağırlığı %91 oranında düşmüştür (Ghollarata and Raiesi 2007).

Tuzlu topraklardaki iyon toksisitesi veya spesifik iyon etkisi toprak solüsyonunda yüksek konsantrasyonlardaki sodyum, kalsiyum, magnezyum, potasyum, klorit, sülfat, bikarbonat ve bor'dan kaynaklanır (Ferguson and Grattan 2005). Bazı iyon konsantrasyonlarının artması bitkilerde iyon dengesizliğine ve iyon toksisitesine neden olur (Munns and Tester 2008). Yüksek pH'ta (8,5'ten büyük) karbonat ve bikarbonat'ın yüksek konsantrasyonları kalsiyum, çinko ve bakır eksikliğine neden olabilir ki buda sodik topraklarda besin dengesizliğini doğurur (Ferguson and Grattan 2005).

Sodik topraklarda zayıf toprak yapısı bitkilerin besin ve su alımını ciddi anlamda etkiler (Qadir and Schuber 2002). Su ve besin alımı sınırlanan bu bitkilerde kök gelişimi yavaş olduğundan kuraklığa hassasiyetleri artar (Curtin and Naidu 1998), köklerin oksijen alımı azalır (So and Aylmore 1993) ve bitki köklerinin patojenlere duyarlılığı artar (Naidu and Rengasamy 1993).

2.5. Tuzluluğun Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi

Tuzluluk miktarının toprakta doğal olarak bulunan mikroorganizmaların miktarı ve çeşidi üzerine olan etkileri ile ilgili birçok araştırma mevcuttur (Tripathi *et al.* 2006; Wichern *et al.* 2006; Ibekwe *et al.* 2010). Wichern *et al.* (2006), yaptığı çalışma sonucunda tuzluluk miktarının osmotik potansiyeli düşürdüğünü böylece tuza toleranslı mikrobiyal genotiplerin yüklerini arttırırken, tuza çok hassas genotipleri öldürdüğünü ve mikrobiyal toplulukların yapı ve aktivitelerini değiştirdiğini bildirmiştir. Tuza toleranslı mikroorganizmaların tuzlu topraklardaki yüksek osmotik potansiyelin etkilerini minimize etmek için geliştirdikleri adaptasyonlardan biri, bünyelerinde bazı çözünen iyonları veya bileşikleri biriktirmektir (Killham 1994). Bazı mikroorganizmalar seçici olarak metabolizma için gerekli iyonları dışardan (özellikle amonyum) alırlar. Diğer bazıları ise osmoregülatör bileşikleri toplayarak adaptasyonlarını gerçekleştirirler (Oren 2001; Schimel *et al.* 1989). Bakterilerde aminoasitler; mantarlarda polioller olarak bilinen bu osmoregülatör bileşikler ‘uyumlu çözünenler’ ifadesi ile tanımlanırlar. Halofilik bir bakteride osmoregülatör maddeler sitoplazmada çok bulunduğundan normal bir bakteriye göre toplam karbon ve azot yüzdesi hücre membranında ve duvarında çok daha düşük oranda bulunur. Bu bileşiklerin fizyolojik koşullar altında herhangi bir yükleri yoktur ve yüksek konsantrasyonlarda hücre içinde bulunabilmeleri için olağan hücresel fonksiyonlardan daha fazla enerji harcanmasına neden olurlar (Sleator and Hill 2002). Örneğin, hücre duvarı sentezi için ortalama 30 ATP gerekirken osmoregülatör bileşiklerin sentezi için gerekli enerji 30-110 ATP’dir (Oren 1999). Yani, tuza tolerans mikroorganizmalara metabolik anlamda ekstra bir yük getirirken diğer metabolik olaylarda ve tuzsuz şartlardaki büyümede daha az enerji harcanır (Wichern *et al.* 2006). Çeşitli nedenlerden dolayı toprakta artan tuzluluk oranı, osmotik strese toleranslı olan ve olmayan, farklı davranışlar sergileyen mikrobiyal genotiplerin birbirinden ayrılmasına neden olarak toprağın mikrobiyal yapısını değiştirir (Pankhurst *et al.* 2001). Örneğin, mantarlar bakterilere göre tuza karşı daha hassastırlar (Pankhurst *et al.* 2001; Wichern *et al.* 2006). Bundan dolayı, bakteri/fungal oranı artan tuzluluk nedeniyle artar. Bu durumda, tuzlu topraklardaki bakteri hakimiyeti aynı zamanda karbon/azot biyokütlesinin düşmesiyle kendini gösterir (Paul and Clark 1989; Jenkinson

1998; Sardinha *et al.* 2003). Bu durum lignin ve bitki polisakkaritleri gibi kompleks maddelerin parçalanmasında fungal mikroorganizmaların enzimleri bakteri enzimlerinden daha etkili olduğundan besin döngüsünü değiştirir (Bailey *et al.* 2002). Dolayısıyla yüksek tuzluluk mikrobiyal biyokütle miktarını düşürdüğü gibi mikrobiyal çeşitliliği ve tür zenginliğini de azaltır (Triphati *et al.* 2006; Wichern *et al.* 2006; Nelson and Mele 2007; Ibekwe *et al.* 2010).

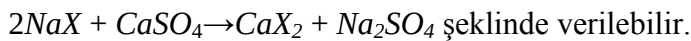
Tuzluluk aynı zamanda mikroorganizmaların sahip olduğu enzim aktivitelerini de etkileyebilir. Yapılan çalışmalarda toprak solüsyonundaki yüksek tuz 3 şekilde enzim aktivitelerini etkilemektedir; (i) enzim hücreden salındıktan sonra aktivitesini kaybeder (ii) protein çözünürlüğünü azaltır, bu durum enzim aktif merkezinin iyonik konformasyonunun değişmesine neden olur (tuz dışarı etkisi), (iii) besinsel dengesizliğe neden olan ve enzim sentezini etkileyen spesifik iyon toksisitesi meydana gelir (Nourbakhsh *et al.* 2006). Araştırma sonuçları göstermiştir ki $EC_e = 40,8 \text{ dS m}^{-1}$ 'e kadar artan tuzlulukta enzim aktivitesi azalır (Batra and Manna 1997). Örneğin, $EC_{1:5} = 9,48 \text{ dS m}^{-1}$ 'e kadar olan tuzluluk oranı β -glükosidaz, proteaz ve fosfataz enzim aktivitelerini düşürür. Bu nedenle tuzluluk karbon, azot ve fosfor döngüsünü etkiler (Garcia and Hernandez 1996). Mikrobiyal aktivitede olduğu gibi toprak solüsyonundaki tuz tipi ve miktarı enzim aktivitesini de çeşitli şekillerde etkiler, bu anlamda en toksik tuz yine sodyum klorittir (Nourbakhsh *et al.* 2006).

Mikroorganizmaların toprak yapısında gerçekleştirdiği olumlu yöndeki faaliyetlerden biri de azot minerilizasyonudur. Tuzluluk amonyumun toplanmasına neden olduğundan toprakta amonifikasyon nitrifikasyondan daha fazla gerçekleşir ve azot minerilizasyonu düşer. Bu nedenle tuzluluk topraktaki azot dönüşümünde oldukça etkili bir faktördür (Rietz and Haynes 2003; Sardinha *et al.* 2003; Yuan *et al.* 2007). Diğer taraftan toprağa tuz eklenmesinden sonra azot minerilizasyonu artabilir (Broadbent and Nakashima 1971; Meli *et al.* 2006). Yapılan bazı çalışmalarda artan azot minerilizasyonunun düşük osmotik potansiyel sonucu mikrobiyal biyokütlenin otolizinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Wichern *et al.* 2006).

2.6. Tuzlu Toprakların İyileştirilmesinde Kullanılan Yöntemler

İyileştirme yöntemlerinden en temel olanı fiziksel olarak sorunlu toprakların işlenmesidir. Fiziksel yöntemler, sorunlu toprakların derin sürülmesi ve toprak profilinin ters yüz edilmesi gibi süreçleri içerirler. Bu yöntemlerle iyi ve kaba yapılı toprak katmanları birbirlerine karıştırıldığından direkt olarak toprağın geçirgenliği artırılır ve geçirgen olmayan katmanlar kırıldığından tek tip toprak yapısı elde edilir.

Sorunlu toprakların iyileştirilmesinde toprakların yıkanması uygulanan diğer bir yöntemdir. Bu yöntemde, aşırı miktarlarda bulunan tuzların topraktan yıkanması için öncelikle yüzeyde biriken tuzlar suda erir hale getirilir ve ardından bu tuzların toprak yüzeyinden tabana sızması sağlanır. Bu amaçla, tuzların eriyebileceği oranlarda su, toprak yüzeyinde göllendirilir ve fazla bekletilmeden akması sağlanır. Ancak, tuzlu-sodik ve sodik toprakların iyileştirilme süreçlerinde tuzların topraktan suyla yıkanması her zaman mümkün olmayabilir. Çünkü sodyumca zengin olan topraklara su verildiğinde, sodyum toprağın geçirgenliğini azaltabilir. Bu yüzden bu tip topraklara, yıkama işleminden önce toprağın kimyasal yapısını düzelterek yardımcı maddelerin ilave edilmesi gerekir. Bu tip topraklara jips veya Ca^{+2} ve Mg^{+2} içerikli kimyasal maddeler verilerek bu maddelerin toprak kompleksine bağlı bulunan Na^+ ile yer değiştirmesi sağlanır (Richards 1954; Bresler and Charter 1982; Tanji 1990). Sodyumlu toprakların iyileştirme süreçlerinde kullanılan kimyasal maddeler genel olarak 3 gruba ayrılabilir; (i) çözünebilir kalsiyum tuzları ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , fosfojips), (ii) az çözünebilir kalsiyum tuzları (CaCO_3) ve (iii) asitler ve asit oluşturan maddeler (H_2SO_4 , kükürt). Bu yöntemde çözünebilir kalsiyum tuzları içerisinde en yaygın olarak kullanılan kimyasal madde jips'tir (Yılmaz 2001). Jips'in topraktaki reaksiyonu;



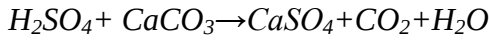
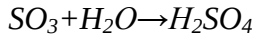
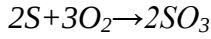
Çözünübilirlikleri nispeten daha düşük kalsiyum tuzları içerisinde ise kireç taşı (CaCO_3) en çok kullanılan bileşiktir.

Kireç taşının topraktaki reaksiyonu ise;



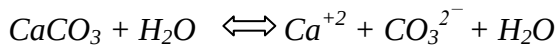
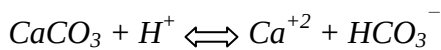
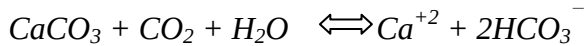
Asitler ve asit oluşturanlar grubundan en çok kullanılan madde kükürt'tür.

Kükürt'ün topraktaki reaksiyonu (Six et al. 2004);



$2NaX + CaSO_4 \rightarrow CaX_2 + Na_2SO_4$ şeklindeki verilebilir. Kükürt bu reaksiyon serisiyle toprakta bulunan Na^+ 'un reaksiyona girdiği maddelerle bileşik yapar (Six et al. 2004).

Tuzlu toprakların iyileştirilmesinde kimyasal yöntemlerden çok daha farklı olarak son yıllarda yaygın bir diğer yöntem bitkilerin kullanımındır. Bu yöntemle kireçli-sodik ve tuzlu sodik toprakların iyileştirilmesi sağlanabilir. Bitkiler, toprağın iyileştirme sürecinde toprakta bulunan kalsiyum içerikli bileşiklerin çözünürlüğünü sağlayarak, proton (H^+) çıkışını arttırarak, köklerin fiziksel etkileriyle toprağın agregat ve hidrolik özelliklerinin iyileştirerek tuz ve Na^+ 'un kökler tarafından alımını sağlayarak görev yaparlar.



Kalsit'in çözünmesi ile yukarıda gösterilen reaksiyon sonucu Ca^{+2} , HCO_3^- ve CO_3^{2-} bileşikleri toprak çözeltisine geçer (Six et al. 2004).

Çizelge 2.1. Uygulama çeşidine göre topraktan uzaklaştırılan Na^+ ve oluşturulan nispi CO_2 miktarları (Quadir *et al.* 2007).

Uygulama	Nispi CO_2 salınımı (kPa)	Na^+ uzaklaştırılması (mol)
Kontrol	0,9–4,3	1,0±0,1
Jips	0,9–2,4	3,3±0,3
Taze organik gübre	3,1-6,0	1,6±0,2
Pamuk	3,0-3,6	1,4±0,1
Alfalfa	4,8-7,2	2,6±0,2
Sordan [<i>Sorghum x drummondii</i> (Steud.) Millsp & Chase]	5,8-14,1	4,0±0,3

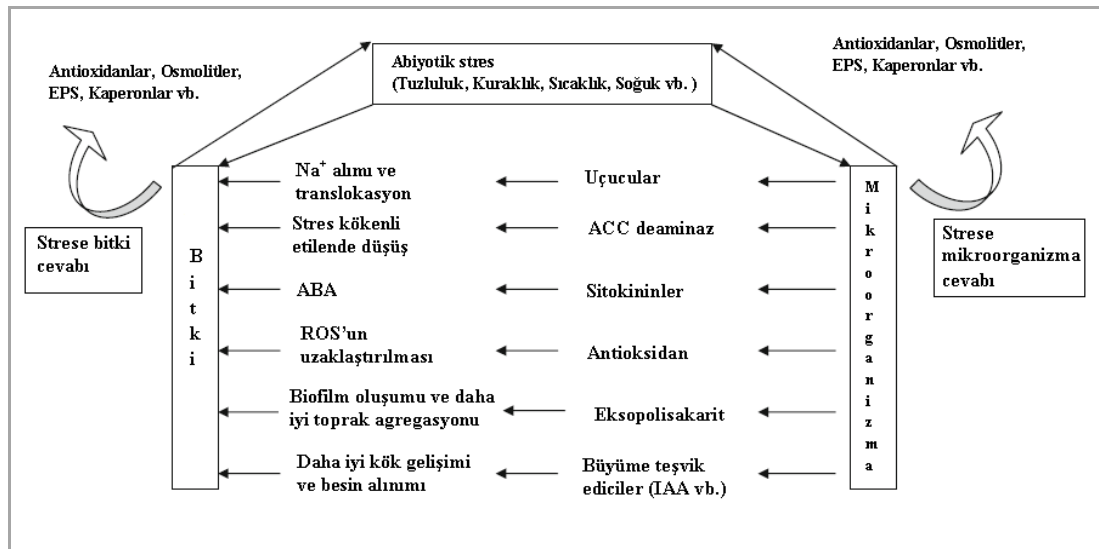
1986 yılında Robinson'un yaptığı bir çalışmada jips, organik gübre ve çeşitli bitki türleri (Pamuk, Alfalfa ve Sordan) kullanılarak bunların Na^+ uzaklaştırma ve nispi CO_2 oluşturma kapasitelerini belirlemiştir. Tabloda da görüldüğü gibi bazı bitki türleri jips uygulamasından daha verimli sonuçlar sağlamıştır (Quadir *et al.* 2008).

Tüm bu yöntemler uygulama açısından uzun zaman alıcı, yorucu ve yüksek maliyetli olmasının yanısıra her zaman arzu edilen başarıya ulaşamaması bilim insanlarını yeni yöntemlerin araştırılmasına yönlendirmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda besin yetersizliği, sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik streslere karşı bitki toleranslarının bazı mikrobiyal türler tarafından artırıldığı gösterilmiştir (Egamberdiyeva and Hoflich 2004; Yang *et al.* 2009). Diğer bir deyişle, son yıllarda yapılan çalışmalar abiotik stres faktörlerine karşı bitkileri korumak ve üretim verimini arttırmak için mikroorganizmaların kullanım potansiyelinin olabileceğini göstermiştir. Tuzlu toprakların iyileştirilmesinde kullanılabilecek mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklı olmalarının yanında tuz stresinin bitkilerde oluşturduğu zararlı etkileri hafifletme veya ortadan kaldırma yeteneklerine sahip olmalıdırlar. Örneğin, yakın zamanda yapılan bir çalışmada tuza toleranslı ve fosfat çözme yeteneğindeki bakterinin domates bitkisinin çimlenme oranını ve çimlenme indeksini artırdığı gösterilmiştir (Chookietwattana and Maneewan 2012). Başka bir çalışmada ise yüksek tuz konsantrasyonlu bir toprakta *Pseudomonas putida* Rs bakterisi pamuk bitkisine inoküle edildiğinde çimlenme oranını ve bitki sağlamlığını arttırdığı

gösterilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca pamuğun ekildiği topraktaki Mg^{+2} , Ca^{+2} ve K^{+} absorpsiyon oranının arttığı diğer yandan Na^{+} absorpsiyon oranının azaldığı rapor edilmiştir (Yao *et al.* 2010). Turp bitkisiyle yapılan bir çalışmada tuz stresi nedeniyle azalan gövde ve kök kuru ağırlığı, klorofil içeriği, bitki başına düşen yaprak sayısının *Staphylococcus kloosii* EY37 ve *Kocuria erythromyxa* EY43 bakterileri tarafından artırıldığı, diğer taraftan elektrolit sızıntısının düşürüldüğü gösterilmiştir (Yıldırım *et al.* 2008). Özbekistan'ının yarı kurak bir bölgesinde pamuk ve bezelye bitki tohumlarının *Pseudomonas alcaligenes* PsA15, *Pseudomonas denitrificans* PsD6, *Bacillus polymyxa* BcP26 ve *Mycobacterium phlei* MbP18 bakterileriyle inoküle edilmesinden sonra bu bitkilerin gövde ve kök uzamasının önemli derecede arttığı gösterilmiştir (Egamberdiyeva and Hoflich 2004).

Bitkiler doğal çevrelerinde kendilerine bir takım avantajlar sağlayan birçok epifitik veya endofitik mikroorganizmalarla birlikte yaşarlar. Bu mikroorganizmalar stres şartları altında bitkilerin metabolizmalarını destekledikleri ve performanslarını artırdıkları için doğrudan veya dolaylı olarak ürün verimini de artırmış olurlar (Dimkpa *et al.* 2009). Bitki büyümesini teşvik edici rizobakterilerden (Plant Growth Promoting Rhizobacteria=PGPR) bazıları doğrudan azot fiksasyonu yaparak, bitki hormonları, iyonlar ve çözünür fosfat sağlayarak bitkinin büyüme ve gelişmesini teşvik edebilirler (Hayat *et al.* 2010; Turan *et al.* 2012). PGPR'lardan bazıları ise dolaylı olarak bitki patojenleri tarafından meydana getirilen bitki hastalıklarına karşı korunmada biyokontrol ajanı olarak görev yaparlar (Lugtenberg and Kamolova 2009). Bitkilerin çok yüksek veya düşük sıcaklık, yüksek tuzluluk, kuraklık, besin yetersizliği ve ağır metal gibi çevresel stres şartlarına uyum sağlamasında fitohormonların önemli rol oynadığı bilinmektedir (Potters *et al.* 2007; Spaepen and Vanderleyden 2010). Indol 3-asetik asit (IAA) üreten bakteriler bitki büyümesinde köklerin gelişimini teşvik ederler (Hayat *et al.* 2010). Bitkilerin bu tür bakterilerle birlikte inoküle edilmesi kök büyümesini, lateral köklerin veya kök tüylerinin oluşumunu teşvik ederek bitkinin stres toleransını artırır. Bakteriyal IAA aynı zamanda etilen öncülü olan aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) degradasyonu yapan ACC deaminaz enzimini de sitimüle eder (Glick 2005). ACC deaminaz enzimi stresin arttırdığı etilen üretimini düşürerek stres

şartlarında sürdürülebilir bitki büyümesine ve gelişimine katkıda bulunur. Diğer bitki hormonlarının düzenlenmesi tuzluluğun toksik etkilerini azaltarak bitkilerin tuzluluk toleransını arttırabilir (Bianco and Defez 2009). Tuz stresine maruz kalan bitkilerde birçok azot içerikli bileşiklerin toplandığı rapor edilmiştir (Parida and Das 2005). Prolin amino asiti diğer streslerde olduğu gibi su ve tuzluluk streslerinde de bitkilerde en çok toplanan aminoasittir. Tuz stresindeki mung fasulyesiyle yapılan çalışmalarda IAA uygulamasının tuz stresine karşı bu bitkiyi önemli derecede koruduğu gösterilmiştir (Devi *et al.* 2012). Yonca bitkisi fazla miktarda IAA üreten PGPR'larla inoküle edildiğinde, bu bitkinin birçok farklı strese karşı koyduğu ve aşırı miktarda prolin aminoasidini sentezlediği rapor edilmiştir (Verbruggen and Hermans 2008).



Şekil 2.1. Abiyotik stres şartlarında bitki-mikroorganizma ilişkisi (Grover et al. 2011).

Zhang *et al.* (2008) tuz stresi altındaki *Arabidopsis* bitkisi ile yaptığı bir çalışmada, *Bacillus subtilis* bakterisinin ürettiği uçucu bir organik bileşikle bitkiye Na^+ alımını ve Na^+ 'nın bitkideki döngüsünü düzenlediği gösterilmiştir. ACC deaminaz aktivitesine sahip bir *Pseudomonas fluorescence* izolatu yer fıstığı ile inoküle edilmesiyle yer fıstığının tuz toleransının arttığı rapor edilmiştir (Saravanakumar and Samiyappan 2007). Ashaf *et al.* (2004) tuz stresinin çok yüksek olduğu şartlar altındaki buğday bitkisini ekzopolisakkarit üreten PGPR bakterileriyle inoküle etmiştir. Bu çalışma sonucunda ekzopolisakkaritlerin Na^+ 'a bağlanarak topraktaki varlığını azalttığını ve böylece

buğday köklerine alınan. Na^+ 'yı sınırlandırarak kök ve gövde ağırlığını önemli derecede arttırdığını tespit etmişlerdir. Han and Lee (2005), marul bitkisinde tuzluluğun arttırdığı antioksidan enzim seviyelerinin PGPR bakterileri ile muamele sonucu düştüğünü göstermiştir. Benzer bir çalışma Upadhyay *et al.* (2012) tarafından buğday bitkisinde de gösterilmiştir. Sitokinler; *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus*, ve *Pseudomonas spp.*, gibi birçok bakteri tarafından üretilen fitohormonlardır. Önemli fitohormonlardan biri olan absisik asit (ABA), biyotik ve abiyotik strese karşı tepki olarak oluşan bir bileşiktir. Bu bileşik kuraklık, tuzluluk streslerine ve toksik metallerin zararlı etkilerine karşı tohum çimlenmesini ve çiçeklenmeyi inhibe ederek bitkileri korumada kilit öneme sahiptir (Smyth 2011). PGPR bakterileri tarafından üretilen sitokinler, ABA ile ortak bir metabolik yolla oluşturulduklarından ve antagonistik çalıştıklarından sitokin üretiminin artması ABA üretiminin azalmasıyla sonuçlanır (Salamone *et al.* 2001).

2.7. Halofilik Bakteriler

2.7.1. Halofiliklerin taksonomisi

Dünyada oldukça yaygın bulunan tuzlu ortamlar genelde tuz gölleri ve diğer su sistemleri kadar tuzlu topraklarla da temsil edilirler. Bu tür çevrelerde yaşayan organizmalar halofilik olarak tanımlanan ekstrem organizmalardır. Bu organizmalar sadece yüksek iyonik kompozisyonla değil alkalın pH değerleri, düşük oksijen varlığı yüksek veya düşük sıcaklık, ağır metal ve diğer toksik bileşiklerin varlığı gibi çevresel faktörlerle de mücadele etmek zorundadırlar (Oren 2002; Ventosa 2006). Halofiliklerin taksonomisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında optimum büyüme özelliklerine göre yapılması bir çok bilim insanı tarafından kabul gören bir yöntemdir. Bu tür bir sınıflandırma dikkate alındığında tuzlu çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar; (i) ekstrem halofilikler ve (ii) ılımlı halofilikler olarak iki ana fizyolojik gruba ayrılabilir. Ekstrem halofilikler %15-30 NaCl (2,5-5,2 M) tuz içeren besiyerlerinde optimum büyüme kabiliyetinde iken, ılımlı halofilikler %3-15 (0,5-2,5 M) tuz içeren besiyerlerinde optimum büyüme kabiliyetindedirler. Ayrıca çoğu deniz

mikroorganizmaları olan ılımlı halofilikler %1 ile %3 (0,2-0,5 M) tuz içeren besiyerlerinde optimum büyüme kabiliyetindedirler. Halofilik olmayan mikroorganizmalar %1 (0,2 M)'den daha az tuz içeren besiyerlerinde optimum büyüme gösterebilir. Ancak, bu mikroorganizmalardan bazıları yüksek NaCl konsantrasyonlarına tolerans gösterebildiklerinden halotolerant veya ekstrem halotolerant olarak adlandırılırlar (Oren 2002).

Halofilik bakteri domaini *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Thermotogae*, *Cyanobacteria* ve *Tenericutes* olmak üzere sekiz şubeden oluşmuştur. Bunlardan *Proteobacteria* şubesi; *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* ve *Epsilonproteobacteria* şeklinde dört sınıftan oluşur. *Firmicutes* şubesi *Bacilli* ve *Clostridia* şeklindeki iki sınıfa sahiptir. *Actinobacteria* şubesi ise *Actinopolysporineae*, *Corynebacterineae*, *Glycomycineae*, *Micrococcineae*, *Pseudonocardineae* ve *Streptosporangineae* olmak üzere altı alt takıma ayrılmıştır. Şimdiye kadar *Spirochaetes* şubesine ait dört tür tanımlanmış olup bunların tamamı *Spirochaeta* cinsine aittir. *Bacteroidetes* şubesi *Bacteroidia*, *Flavobacteria* ve *Sphingobacteria* olarak adlandırılan üç sınıfı içerir. *Thermotogae* şubesi sadece *Thermotogae* sınıfını ve bu sınıf içinde *Thermotogales* olarak adlandırılan bir takımı içerir. *Cyanobacteria* şubesi mavi-yeşil alg veya *Cyanophyta* olarak bilinir. Bu şubenin sınıflandırması binomiyal sınıflandırmadan dolayı karmaşıktır. Son şube olan *Tenericutes* daha öncede *Firmicutes* şubesi olarak sınıflandırılan *Mollicutes* sınıfını içerir. Halofilik bakteri domaininde bu bakterilerin özellikleri araştırılırken en çok çalışılmış halofilik bakteri *Gammaproteobacteria* sınıfının bir üyesi olan *Halomonas elongata*'dır. Bu yüzden literatürde halofilik bakterilerin özellikleri genelde bu bakteri türü üzerinden anlatılmaktadır (Oren 200; Horikoshi and Bull 2011).

Şekil 2.2. 16 S rDNA sekans karşılaştırmalarına göre yapılan evrensel filogenetiksel ağaç (halofilik mikroorganizmalar koyu renk ile gösterilmişlerdir) (Oren 2002).

2.7.2. Halofilik bakterilerin ekstrem koşullara adaptasyonlarını sağlayan yapılar

2.7.2.a. Halofilik bakterilerin hücre duvarları

Halofilik bakterilerin hücre duvar yapılarının aydınlatılması model organizma *Holomonas elongate* ile gerçekleştirilen çalışmalar sonucu olmuştur. *H. elongate* bakterisinin büyüdüğü ortamın tuz konsantrasyonu arttırıldığında bakteri hücre duvarının hidrofobisitesinde belirgin farklılıklar meydana gelir. Su-hekzadekan karışımı içinde %3 tuzda büyüyen hücreler %20 tuz konsantrasyonunda büyüyen hücrelerden çok daha hidrofobiktir (Oren 2002).

Halofilik bakterilerde durağan fazda hücre yüzeyinin hidrofobisitesi artar. Hücre yüzey hidrofobisitesindeki artış muhtemelen hücre duvar yapısının ve sitoplazma membran yapısının bir sonucudur. Yüksek tuz konsantrasyonlarında yüklü fosfolipidlerin artması hidrofobisitenin artışını açıklamaktadır. Suyun çok az olduğu yüksek tuz ortamlarında hidrofilik hücre yüzeyi, hücreyi su moleküllerine karşı daha çekici kılar ve dolayısıyla hücrenin kurumasını engeller (Oren 2002). *H. elongata*'da peptidoglikanın ilginç bir özelliği bütün hücre duvar hidrofobisitesini artıran hidrofobik lösin amino asidini bulundurmasıdır (Oren 2002). Birçok mikroorganizmada tripsin muamelesi hidrofobik hücreleri hidrofilik hale getirirken bu hücrelerde tripsin muamelesi hidrofobisite de etkili değildir.

2.7.2.b. Halofilik bakterilerin ekstraselüler kapsülleri

Halofilik bakterilerin birçoğunda onları dış ortamın etkilerinden koruyan ve farklı ekzopolisakkaritler içeren kapsül yapıları mevcuttur. Örneğin, *H. eurihalina*'nın kapsül yapısına katmak üzere ilginç özelliklere sahip, %42 oranında karbohidrat ve %15 oranında protein içerirken geriye kalan miktarın doğası belirlenememiş bir ekzopolisakkarit ürettiği tespit edilmiştir. Bu polimer özellikle asidik pH'da oldukça yüksek viskoziteye ve nem çekme kapasitesine sahiptir ayrıca ısıya çok dayanıklıdır

(Oren 2002). Son yıllarda *H. maura* bakterisi tarafından üretilen farklı bir eksopolisakkarit daha tanımlanmıştır (Sudo *et al.* 1995; Oren 2002).

2.7.2.c. Halofilik bakterilerin flagellaları

Hareketin flagella ile sağlanması halofilik bakteri grupları arasında oldukça yaygın görülür. Özellikle kalın, polar, küt flagellalar haloalkalifilik fotosentetik sülfür bakterilerinde (*Halorhodospira abdelmalekii*) yaygın şekilde bulunur (Oren 2002).

2.7.2.d. Sitoplazmik membran ve lipitleri

Hücre membran özellikleri hem tuza bağlı değişimler hem de membran yapısında dominant olan fosfolipid ve yağ asit zincir çeşitleri yönünden araştırılmıştır. Halofilik bakterilerin sitoplazmik membran bileşenleri, iyon geçirgenliği ve integral membran proteinlerinin aktiviteleri gibi fonksiyonları düzenlemek için dışarıdaki yüksek tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak birçok düzenleme geçirirler (Oren 2002).

2.7.2. e. Halofilik bakterilerin polar lipid metabolizması

Halofilik mikroorganizmalar artan tuz konsantrasyonuna karşı dirençli olmanın yanı sıra, sağlıklı bir şekilde metabolik faaliyetlerini gerçekleştirerek, çoğalabilmek için de yüksek tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyarlar. Halofilik mikroorganizmalarda görüldüğü gibi, artan tuz konsantrasyonlarında hücre membranlarındaki negatif yük yoğunluğunu açıklamak için, ilk başta yüksek Na^+ a maruz kalan hücre yüzeyinin yük yoğunluğuna izin veren aniyonik lipid artışının gerekli olduğu savunulmuştur. Fakat, bu açıklama yüksek tuz gerekliliğini açıklamada yeterli bulunmamıştır (Chen *et al.* 2010). Diğer bir görüş ise negatif yüklü fosfolipid içeriğinin katyonlarda selektif permeabiliteyi düzenlemede katkı sağladığı yönündedir (Chen *et al.* 2010). günümüzde kabul gören en geçerli görüş ise polar lipid kompozisyonundaki değişimin membran çift katlı yapısını korumak için bir mekanizma sağladığıdır. Birçok türde fosfatidilkolin (FK), fosfatidiletanolamin (FE) ve difosfatidilgiserol (kardiolin KL) polar

fosfolipidleri ve glikolipidler bulunabilir. Negatif yüklü fosfolipitlerin (FK, KL) tuz artışı durumunda ve doğal fosfolipitlerin (FE) varlığında miktarları artar. FE çift katlı fazlar oluşturmaya meyilli doymamış yağ asitleri içerirken, fosfatidil gliserol (FG) kararlı çift katları oluşturur. Fonksiyonel bir membran doğru oranlarda çift katlı ve çift katlı olmayan lipidler gerektirir. Artan dış ortam tuzluluğunun bir sonucu olarak çift katlı olmayan fazları oluşturmak için FE'nin artan miktarının yüzeyindeki lipid çift katlarının bütünlüğünü koruması gerekir. Çift katmanlı olmayan fazların oluşumundaki eğilim membrandaki FG gibi lipidlerin oranında artışla sonuçlanan spesifik fosfolipid-sentezleme enzimlerini aktive edebilir (Sutton *et al.* 1991; Haque *et al.* 2004). Literatürde artan tuz konsantrasyonlarında halofilik mikroorganizmaların membran lipidlerinin fosfolipid kompozisyonları hakkında birçok çalışma mevcuttur. *Halomonas elongata* %20 tuz konsantrasyonunda %3 deki tuz konsantrasyonuna göre 4 kat daha fazla KL içerirken, FE içeriği düşmüş FG içeriği ise çok fazla değişim göstermemiştir (Haque *et al.* 2004).

Pseudomonas halosaccarolytica'nın içerdiği lipidlerin geneli FE, FK ve KL'dir. Aynı zamanda bu tür, 1:2:2:1 oranlarında fosfat, gliserol, yağ asidi ve glikoz içeren ve FG'den türeyen bir fosfoglikolipid içerir. Bu fosfoglikolipid *Chromohalobacter israelensis*'de tanılanan α -glikozil-fosfatidil gliserolle aynı olabilir (Oren 2002). Tuz oranı %6'dan %23'e çıkartıldığında FE/FG oranı 1,6'dan 1.0'a düşmüştür (Oren 2002).

Tuz konsantrasyonu artırıldığında *Salinivibrio costicola*'da önce sentezlenen fosfolipit sentezi sonrada bu duruma bağlı olarak büyümesi inhibe olur. FG'nin biyosentezi birkaç saat devam ettikten sonra büyüme yeniden başlar. Oysaki FE'nin sentezi düşük seviyede kalır ve bu FE/FG oranında bir düşüşe neden olur. Adaptasyonun bu fazında yeni proteinlerin sentezi gerekli değildir. Sadece, doğru membran kompozisyonuna ulaşıldığında organizma büyümesini sürdürebilir (Oren 2002). Biyosentez oranlarındaki bu değişimler dış NaCl konsantrasyonu eski seviyesine döndüğünde tekrar eski durumuna döner (Oren 2002). Fosfolipidlerin biyosentetik enzimleri sitoplazmik membranda yerleştirmişlerdir ve muhtemelen dış çözünen konsantrasyonlarında ani bir değişim olduğunda membranın akışkanlığındaki ve lipid fazındaki doğrudan

değişimlerden sorumludurlar (Haque *et al.* 2004). Tuz artışının oluşturduğu şok muhtemelen osmotik basınç yoluyla hissedilerek süktroz gibi iyonik olmayan çözünenler yardımıyla büyüme ve fosfolipid sentezi üzerine benzer şekilde etki gösterir (Russell *et al.* 1986). Alkalofilik fototrofik sülfür bakterisi olan *Halorhodospira halophila*'da polar lipidlerin çoğu FG, KL ve FE'dir. Tuz konsantrasyonlarının artırıldığı besi ortamlarında büyüme gerçekleştirildiğinde FK içeriği önemli oranlarda artmış FG'deki artış ise nispeten daha az olmuştur (Thiemann and Imhoff 1991; Haque *et al.* 2004).

Halofilik Gram (+) bakterilerdeki duruma bakılacak olursa, tuzlulukla artan aniyonik lipid miktarının FG'den ziyade KL'deki artıştan kaynaklandığı görülür. Bu durumda etki spesifik olmayabilir. Diğer bir deyişle FG'nin harcanmasıyla KL'deki artış genellikle yavaş hücre büyümesi ile ilişkilendirilir ve yüksek tuz konsantrasyonlarında büyüme oranları genelde düşük olduğu gözlemlenir (Haque *et al.* 2004). Gram (+)'lerde gliko(fosfo)lipidler de yaygın şekilde bulunur. *Bacillus haloalkaliphilus*'ta FE'nin olmadığı rapor edilmiştir (Oren 2002).

2.7.2.f. Halofilik bakterilerin yağ asidi metabolizması

Halomonas ve *Chromohalobacter* türlerini de kapsayan çubuk şeklindeki bakteriler genellikle membran lipidlerinde düz-zincirli doymuş, tekli doymamış yağ asitleri ($C_{16:0}$, $C_{16:1}$ ve özellikle $C_{18:1}$) ve siklopropan yağ asidi içerirler (Franzmann and Tindall 1990; Skerratt *et al.* 1991; Oren 2002). Artan tuz konsantrasyonuyla genellikle tekli doymamış yağ asidinin karşısına metil grubunun eklenmesiyle sentezlenen siklopropan yağ asidi ve doymamış yağ asitleri artarken dallanmış yağ asitlerinin oranı azalır. Bu gibi modifikasyonlar açıl zincirinin merkez tarafını katılaştırarak bu yapıyı daha kararlı hale getirir. Ayrıca doymamış yağ asitlerindeki artışa membran akışkanlığının artması eşlik eder. Siklopropan yağ asidinin membran akışkanlığı üzerine etkisi çok açık değildir. Siklopropan yağ asidinin ($C_{17:0}$ cyc vb) fiziksel özelliği ona uyan yağ asidi ($C_{17:0}$) ve ($C_{16:1}$)'den türeyen doymamış yağ asidi arasındaki bir reaksiyonda meydana geldiğinden doymamış yağ asitlerinin kaybıyla siklopropan yağ asidindeki artış membran akışkanlığını düşürecektir (Haque *et al.* 2004).

Halomonas halophila'da artan tuz miktarı siklopropan yağ asidi içeriğinde bir artışa ve beraberinde tekli doymamış yağ asitlerinde bir azalışa neden olur. Tuz konsantrasyonu %5'den %15'e çıkartıldığında $C_{17:0}$ cyc miktarı %0'dan %8,5' ve $C_{19:0}$ cyc miktarı %4,2'den %14,9'a çıkmış ve dallanmış zincirli doymuş yağ asitlerinin içeriği $C_{15:0}$ yağ asidi için %42,9'dan %31,9'a düşmüştür (Haque *et al.* 2004).

Siklopropan yağ asitlerinin ($C_{17:0}$ cyc ve $C_{19:0}$ cyc) metabolizması daha sonra *Pseudomonas halosaccharolytica*'da incelenmiştir. Siklopropan yağ asitlerinin miktarı artan tuz miktarıyla artarken ona uyan tekli doymamış yağ asitlerinde azalma olduğu gözlenmiştir. Siklopropan yağ asit miktarının NaCl miktarıyla, sıcaklıkla ve kültürün durağan faza ulaşmasıyla arttığı ifade edilmektedir. Sentezi bir integral membran proteini ya da membranla alakalı olan siklopropan yağ asidinin aktivitesi NaCl veya KCl ile inhibe edilirken 3M glisin-betain varlığında 12 kat artar (Monteoliva-Sanchez *et al.* 1993; Oren 2002).

Salinivibrio costicola siklopropan yağ asidini üretmez. Bu bakteride çoğunluk yağ asitleri $C_{16:1c9}$, $C_{16:0}$ ve $C_{18:1c11}$ iken az miktarlarda $C_{14:0}$, $C_{17:1}$ ve $C_{18:0}$ bulunur. Doymamış yağ asitlerinin sentezi çoğu prokaryotlarda yaygın olan anaerobik metabolik yolak kullanılarak sentezlenir. $C_{16:0}$ 'ın miktarı optimum tuz şartlarında en düşük iken aşırı düşük ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (%3 ve %17,5 NaCl) artmıştır. Optimum tuz konsantrasyonlarında $C_{16:1}$ 'in miktarı en fazla olarak ölçülmüştür (Sutton *et al.* 1991 Russell 1993). Doymamış yağ asitlerindeki çift bağ pozisyon farklılıkları FG ve FE'nin yağ asitleri kompozisyonunda bulunmuştur. $C_{16:1c11}$ ve $C_{16:1c13}$ gibi yağ asitleri %17,5 NaCl konsantrasyonlarında hücrelerin fosfolipidlerinde bulunurken %6 NaCl konsantrasyonunda büyüyen hücrelerinde bulunmaması tuzluluğun yağ asidi sentetaz enzimi spesifitesini etkilediğini göstermektedir. Tuzluluğun yağ asit miktarı üzerine PE'ninkinden çok daha fazla etkisi vardır, bu durum sitozin difosfat-diaçil gliserol dallanma noktasından sonra selektif NaCl etkisi ile FG ve FE'nin biyosentezinin ayrı ayrı kontrol edildiğini düşündürmektedir (Haque *et al.* 2004).

Gram (+) cinslerde (*Marinococcus*, *Nesterenkonia* ve *Halobacillus*) C_{15:0} ve C_{17:0} gibi dallanmış yağ asitleri dominanttır (Monteoliva-Sanchez *et al.* 1989). Bu yağ asitlerinin miktarı tuzlulukla değişir. *Marinococcus halophilus* bakteride tuz miktarındaki artış sıcaklık artışının neden olduğu değişimlere benzer sonuçlar doğurur. Yani sıcaklık artışı ile doymuş yağ asidi miktarları (daha çok C_{18:0}) artarken C_{15:0} anteiso düşer. Tuz konsantrasyonu %5'den %15'e çıkartıldığında C_{16:1} doymamış yağ asit miktarı %40,9'dan %48,8'e çıkar. Bu organizmada siklopropan yağ asidi tespit edilmemiştir (Monteoliva-Sanchez *et al.* 1987; Haque *et al.* 2004). *Planococcus* sp. suşunun tüm tuzluluk konsantrasyonlarında anteiso C_{15:0} en çok bulunan yağ asididir ve dallanmış yağ asitleri yağ asitlerinin %85'ini oluşturur (Haque *et al.* 2004).

Fototrofik alkalofil *Halorhodospira halophila* çoğunluk olarak düz dallanmış C₁₆ ve tekli doymamış C₁₈ yağ asitlerini içerir. Artan sıcaklıkla C_{18:0} ve doymamış yağ asitlerinin miktarı düşer, C_{16:0} ve doymuş yağ asitleri artar (Oren 2002).

2.7.2.g. Fotosentetik membranlar

Fotosentetik prokaryotlar fotosentetik aparatlarının özenle yerleştiği intraselüler membran sistemlerine sahiptirler. Halofilik üyeleri de olan siyanobakteriler intraselüler tilakoidler içerirler. Halofilik anoksijenik fotosentetik bakteriler arasında intraselüler fotosentetik membranların tiplerinde büyük farklılıklar vardır. Örneğin, *Halochromatium* ve *Thiohalocapsa* cinslerinin türleri, *Rhodovibrio salinarum* ve *Rhodovibrio sodomensis* bakterileri veziküler tipte intraselüler membranlara sahiptirler (Oren 2002). *Rhodothalassium salexigens* türünün fotosentetik membranı sitoplazmik membran yapısına paralelken tilakoid benzeri membranlar ılımlı halofilik *Ectothiorhodospira* cinsi ve gerçek halofilik *Halorhodospira* cinsi için karakteristiktir (Imhoff *et al.* 1991; Oren 2002).

2.7.2.h. Gaz vezikülleri

Gaz vezikülleri birçok halofilik Arkeada yaygın olarak gözlenirken halofilik bakterilerde bu yapılara çok ender rastlanır. Siyanobakterilerin gerçek halofilik temsilcilerinde gaz içermeyen gaz vezikülleri vardır. Sadece %1-6 NaCl tuz konsantrasyonlarında yaşayabildiği için zayıf bir halofilik olan *Ectothiorhodospira vacuolata*, gaz vezikülü oluşturmakla karakterizedir (Imhoff *et al.* 1991; Oren 2002).

Halobacteroidaceae familyasının endospor oluşturan anaerobik üyelerinde gaz keselerini sentezleyen 2 ilginç örnek vardır. *Sporohalobacter lortetii* ve *Orenia sivashensis* türlerinin büyüyen hücreleri gaz vezikülleri içermez. Bununla beraber ne zaman endospor oluşumu başlarsa o zaman gaz veziküllerinin sentezlenmesine başlanır ve bu veziküller doğal endosporlara yapışarak kalır. Bu veziküllerin endosporların yayılmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Zhilina *et al.* 1999; Oren 2002).

2.7.2.i. Endosporlar

Halotolerant endosporlar birkaç halofilik bakteri grubu tarafından oluşturulur ki bunlar; *Clostridiaceae*'de *Clostridium halophilum* (Oren 2002) *Desulfotomaculum halophilum* (Oren 2002); *Halanaerobiaceae* *Natroniella acetigena*; (Zhilina *et al.* 1996; Oren 2002); *Halobacteroidaceae*'de *Sporohalobacter lortetii*. *Orenia* türleri (Zhilina *et al.* 1999; Oren 2002); *Halonatronum saccharophilum* (Zhilina *et al.* 2001); *Bacillaceae*'de *Bacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus* *Salibacillus* cinsleridir (Chaiyanan *et al.* 1999; Oren 2002).

2.7.2.j. Halofilik bakterilerin fizyolojileri

Halofilik bakterilerin metabolik çeşitliliği Arkeaların metabolik çeşitliliğinden çok daha fazladır. Halofilik bakteriler içerisinde aerobik, anaerobik, heterotrof, ototrof, fotoheterotrof, litotrof, oksijenik ve anoksijenik fototrof örnekler mevcuttur.

Halomonas elongate ve *Chromohalobacter salexigens* başta olmak üzere *Halomonadaceae* familyası'nın diğer üyeleri bakteri domaininde halofilik davranış ile ilgili çalışmalarda model organizma olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. *Halomonadaceae* familyası için besinsel istekler genelde basittir ve bu familyada üyelerinin birçoğu şekerler, amino asitler ve organik asitler gibi tek karbon kaynağı ile desteklenmiş mineral besi ortamlarında büyütülebilir (Kushner 1993; Oren 2002). Ancak, büyümek için özel bazı vitaminlerle desteklenmiş besi ortamlarına ihtiyaç duyan bakteri türleri de vardır. Örneğin, *Halomonas halodenitrificans* türünün büyümesini desteklemek için besi ortamına tiamin eklenmelidir. Ayrıca, nitrat veya diğer oksitlenmiş azotlu bileşiklerin olduğu ortamda anaerobik büyüme için metiyonin ilavesi gereklidir. Metiyoninin vitamin B₁₂ ile yer değiştirebilmesi, anaerobik şartlarda metiyonin biyosentezindeki kobalamin-bağımlı metabolik yolun bozulduğunu düşündürmektedir (Oren 2002). Fizyolojik çalışmaların bir diğer model organizması *Salinivibrio costicola*'nın daha karışık istekleri vardır. Bu bakteri için geliştirilmiş besi ortamları sistein, glutamat, arjinin, valin ve izolösin gibi amino asitler ile desteklenmeli, glikoz veya inorganik tuzlara ilave olarak glutamat, kolin, tiamin ve biyotin içermelidir (Oren 2002).

2.7.2.k. Halofilik bakterilerde iyon metabolizması

Halofilik bakteriler arasında intraselüler iyon konsantrasyonu hem türler arasında farklıdır, hem de aynı türün büyüme şartlarına ve kullanılan analiz yöntemine bağlı olarak büyük farklılık gösterir.

Yine de birkaç genelleme yapılacak olunursa;

- 1) Genelde intraselüler K⁺ konsantrasyonu besi ortamındaki K⁺ konsantrasyonundan oldukça fazladır.
- 2) Hücre içi Na⁺ konsantrasyonu genelde hücre dışındakinden daha düşüktür.

3) İntraselüler Na^+ ve K^+ konsantrasyonları artan dış NaCl tuzluluğu ile doğrusal olmayan şekilde artar.

4) Genelde intraselüler iyon konsantrasyonu besi ortamındaki osmotik basıncı dengelemeye yeterli değildir. Bu nedenle osmotik dengenin geri kalan kısmının sağlanması daha önceden de belirtildiği gibi uyumlu organik çözünenlerin hücre içinde toplanması sayesinde olur.

Tuz konsantrasyonunda gerçekleşen ani bir artış halofilik siyonobakterilerde organik osmotik çözücüler üretilmeden önce, hızlı ve geçici bir tuz toplanmasına neden olabilir. Çünkü, organik çözünenlerin sentezi hücrede tuz toplanmasına kıyasla uzun süren bir süreçtir (Oren 2002). Bundan dolayı, tuzcul *Synechocystis* PCC 6714 normal sudan 0,5 M NaCl 'ye transfer edildiğinde 2 dakika içinde hızlı bir NaCl toplanması ve sonra 20 dk içinde Na^+ 'nın K^+ ile yer değiştirmesi takip eder. 24 saatten sonra oluşturulan glikozgliserol ve sükroz gibi organik osmotik çözünenlerin toplanması aşırı potasyumun sıkıştırılarak dışarı çıkmasına izin verir (Oren 2002). Geçici tuz toplanması *Spirulina subsalsa*'da da rapor edilmiştir. Tuz artışını takip eden muazzam bir geçici intraselüler Na^+ ve Cl^- artışı görülür. Solunumla üretilen proton gradiyentinin neden olduğu bir süreçle Na^+/H^+ antiporteri Na^+ 'yi sıkıştırarak dışarı çıkartır (Gabbay-Azaria and Tel-Or 1993; Oren 2002). Bu adaptasyon fazı esnasında intraselülerde üretilen organik osmotik çözünen olan glisin-betain yeni bir dengeye ulaşmak için artar.

Dunaliella kültüründe kontaminasyon olarak izole edilen *Halomonas* 'ın SPC1 suşunda hücrelerin hiperosmotik şoktan sonra gerekli olan K^+ 'ları hemen toplamasına olanak veren bir potasyum transport sistemi karakterize edilmiştir (Cummings *et al.* 1993; Oren 2002).

Halofilik Gr (+)'lerde klorit önemli bir çevresel sinyaldir; flagellasel hareketlilik ve kamçı sentezi aşırı şekilde kloride bağımlıdır (Roesler *et al.* 2000; Roesler and Muller 2002), klorit olmadan endospor vejetatif forma geçemez ve klorit bromitle yer

değiştirebilirken sülfat ve nitratla yer değiştirmez (Dohrmann and Muller 1999; Oren 2002).

2.7.2.1. Halofiliklerde enzim özellikleri

Osmotik dengeyi sağlamak için inorganik iyonları kullanan halofilik bakterilerde tuz adaptasyonu ve tuza bağımlı enzimler gelişmiştir. Birçok halofilik bakteri, içinde yaşadığı besi ortamında bulunan yoğun tuz miktarı nedeniyle strese girer ve hücrelerinde sitoplazmanın aşırı tuzda uygun osmolaritesini sürdürebilmesi için organik uyumlu çözünenler kullanır. Organik uyumlu çözünen üreten ve kullanan bakteri hücrelerinde intraselüler tuz konsantrasyonları bu bakterilerin içinde bulundukları besi ortamının tuz konsantrasyonlarından her zaman daha düşüktür. Halofiliklerin yaşadığı, aşırı tuzlu çevresel şartlara maruz kalan ve “low-salt-in veya düşük-tuz-içeri” stratejisini benimseyen organizmalarda dışarı salınan ekstraselüler enzimler yüksek tuz konsantrasyonlarında tam olarak çalışmak zorundadır.

İzositrat dehidrogenaz, süksinat dehidrogenaz, malat dehidrojenaz, 2-oksoglutarat dehidrogenaz, sitokrom oksidaz gibi farklı enzimler üzerine tuz konsantrasyonunun etkileri *Halobacterium salinarum* ve onun ılımlı halofilik akranı *Micrococcus halodenitrificans* ile karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır (Oren 2002). *Halobacterium salinarum*'un süksinat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz ve izositrat dehidrogenaz enzimleri optimum aktiviteyi 3-4 M KCl'de, 2-oksoglutarat dehidrogenaz enzimi en iyi aktiviteyi 1 M KCl'de gösterdiği rapor edilmiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki birçok durumda KCl, enzim aktiviteleri için NaCl'den çok daha iyi destek sağlar (Oren 2002). *Halomonas halodenitrificans*'daki ilk çalışmalar izositrat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz ve 2-oksoglutarat dehidrogenaz gibi intraselüler enzimlerin genelde düşük tuz konsantrasyonlarında optimal olarak fonksiyonel olduklarını göstermiştir. Oysaki aynı organizmaya ait laktat dehidrogenaz ve sitokrom oksidaz gibi membransal enzimler tuz varlığında daha aktiftirler (Crocker and Dassarma 2007).

Halofilik bakterilerin tuz konsantrasyonu ile enzimlerinin ilişkileri tartışılırken 3 temel enzim çeşidi ayırt edilebilir; (i) besi ortamı tuz konsantrasyonuna maruz kalmayan fakat birçok durumda düşük iyon konsantrasyonu ve organik osmotik çözünenlerin varlığıyla karakterize olan intraselüler ortamdan etkilenen gerçek intraselüler enzimler, (ii) hem intraselüler çevre hem de dış besi ortamından etkilenen transport proteinlerini de içeren membrana bağlı aktivite gösteren enzimler, (iii) yüksek tuz şartlarına maruz kalan ekstraselüler enzimler (Oren 2002; Moreno *et al.* 2013).

Besi ortamında tuza maruz kalan halofilik bakterilerdeki enzimlerin adaptasyonuna *Halomonas elongata*' taki fosfatazlar örnek verilebilir. Bu organizmada hem alkalın hem de asidik fosfataz enzimleri hücre zarına yerleşmiş durumdadır. Düşük tuz konsantrasyonlarında (50 mM) büyüyen hücrelerde çok düşük bir fosfataz aktivitesi tespit edilmiştir. Yüksek tuzlulukta (1,4 ve 3,4 M) büyüyen hücrelerde tüm enzimlerin aktiviteleri hücrelerin içinde büyüdükleri tuz konsantrasyonlarıyla aynı konsantrasyonlarda optimal şekilde aktif oldukları belirlenmiştir. Bu yüzden bu enzimlerin besi ortamındaki NaCl konsantrasyonlarına adapte oldukları düşünülür (Bylund *et al.* 1990).

Tüm bu bilgilere karşın, aerobik halofilik bakterilerde bir istisna yakın zaman önce keşfedilen *Salinibacter ruber*'de mevcuttur. Bu kırmızı, ekstrem halofilik organizma, halofilik Arkeanın *Halobacteriaceae* sınıfı üyelerinin intraselülerinde bulunan potasyum miktarından daha fazla potasyumu intraselülerinde bulundurur. Bu organizmanın karmaşık proteinlerinin aminoasit kompozisyonlarına bakıldığında ise yüksek oranda asidik aminoasit içerdiği, düşük oranda bazik aminoasit içerdiği görülür (Oren and Mana 2002).

2.7.2.m. Halofilik bakterilerde organik uyumlu çözünenler

Halofilik mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonlarında düşük su aktivitesine maruz kaldıklarından hücre büyümesi ve gelişmesinin devamı için turgor basıncının düzenlenmesi gerekir. Bu çerçevede, tüm hücre fonksiyonlarıyla tamamen uyumlu olan

çözünenlerin kullanımı intraselüler turgor basıncını düzenlemede gereklidir (Brown 1990). Halofiliklerin çok az bir bölümü dış ortam nedeniyle oluşan streste osmotik dengeyi sağlamak için tuzu, genellikle de KCl şeklinde kullanır (Oren 2002).

Hücre içi tuz yoğunluğunun nasıl sağlandığına dair ileri sürülen ve geçerliliğini en çok devam ettiren görüş ‘uyumlu çözünen’ görüşüdür. ‘Uyumlu çözünen’ terimi orijinalde Brown and Simpson (1972) tarafından intraselüler ortamda yüksek miktarlarda toplanan düşük moleküler ağırlıklı organik çözünenleri tanımlamak için türetilmiştir. Bu çözünenler çok zayıf enzim inhibitörü olduklarından düşük su varlığında meydana gelebilecek enzim inhibisyonuna karşı enzimleri korurlar. Uyumlu çözünenler diğer çözünenlerle karşılaştırıldıklarında, en belirgin özelliklerinin metabolik süreçler üzerine inhibitör etkilerinin çok az olması göze çarpar. Uyumlu çözünenlerin uyumluluğu, düşük su aktivitesi şartlarında proteinleri ve diğer makro moleküler yapıları inaktivasyona, inhibisyona ve denatürasyona karşı korumayı içerir (Brown 1976). Bu gibi organik osmotik çözünenlerin toplanması tuza adapte olmayan enzimlerin çalışmasına olanak verirken aynı zamanda osmotik dengeyi de sağlar (Galinski 1995; Da Costa *et al.* 1998). Bu tür osmotik çözünenlerin konsantrasyonu hücrelerin içinde yaşadıkları tuz konsantrasyonlarıyla belirlenir (Galinski and Louis 1999). Bu çözünenler değişen dış ortam tuzluluğuna çabucak uyum gösterirler. Ortamdaki su seviyesinin değişmesiyle hücre içinde osmoadaptasyon kapsamında fizyolojik ve genetiksel değişiklikler meydana gelir (Oren 2002). Osmoadaptasyon, *de novo* sentezi veya artan tuz stresinde besiyerinden uygun bileşiklerin alınımı, osmotiksel olarak inaktif formlara degradasyon ve dönüştürme veya dilüsyon stresinden sonra besi ortamına uygun bileşiklerin salınımı gibi olayları ifade eder (Truper and Galinski 1990; Oren 2002).

Uyumlu çözünenler, fizyolojik pH’da çoğu yüksüz veya zwiter iyoniktirler (farklı lokasyonlarda pozitif ve negatif yük bulunduran moleküller) (Oren 2002). Halofilik mikroorganizmalar tarafından uyumlu çözünenler olarak sentezlenen maddelerin tespit ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar artmaktadır (Wohlfarth *et al.* 1990; Oren 1999; Zhu *et al.* 2011). Bu çözünenler birkaç farklı kategoriye ayrılabilirler;

- 1) Polioller [gliserol, arabitol, manitol, erithirol, şekerler (sükroz, treoluz) ve heterozitler (glikozilgliserol)].
- 2) Betainler (trimetilamonyum bileşikleri) ve tetinler (dimetilsülfonyum bileşikleri)
- 3) Amino asitler (prolin, glutamat, glutamin ve türevleri)
- 4) Glutamin amid türevleri ($N\alpha$ -karbamoilglutamin amid; $N\alpha$ -asetilglutaminil amid)
- 5) N-asetillenmiş diamino asitler ($N\delta$ -asetilornitin, $N\epsilon$ -asetillizin)
- 6) Ektoinler (ektoin, β -hidroksiektoin)

Bilinen uyumlu çözünenlerin yapısal farklılıkları arasında muazzam bir çeşitlilik olmasına rağmen onların yapı ve kullanımlarıyla ilgili olarak genellemeler de yapılabilir (Galinski 1995). Bunlar;

- 1) Sükroz ve treoluz gibi disakkaritlerin uyumlu çözünen bileşikler olarak çok sınırlı potansiyelleri vardır. Oysaki bu maddeler halofiliklerde sık sık ama az miktarlarda diğer osmotik çözünenlerle birlikte bulunurlar. Treoluz ve sükroz hücre membranlarını stabilize edici olarak bilinirler.
- 2) Gliserol, arabitol ve inositol gibi poliollerin *de novo* biyosentezi halofilik ve osmofilik mantar, alg ve tuza toleranslı bitkilerde görülürken, halofilik prokaryotlarda çok ender rastlanan bir olaydır. 0,6 M'a kadar olan tuz konsantrasyonlarında yaşayan *Pseudomonas putida* S12'taki manitol ($N\alpha$ -asetilglutaminilglutamin amid ek olarak glutamat) üretimi bir istisnadır (Kets *et al.* 1996).
- 3) Glisin-betain dışında azot içeren tüm uyumlu çözünenler aminoasit biyosentezindeki glutamat veya aspartat metabolik yollarını kullanırlar.

4) Glutamat, β -glutamat, glutamat betain ve diğeri hiçbir zaman yüksek konsantrasyonlarda (ortalama 0,4 M) toplanmazlar.

5) 0,5 M ve üstünde kullanılan tüm uyumlu çözünenler polar, hiç yük taşımayan ve oldukça fazla çözülebilen moleküllerdir. Halofilik mikroorganizmaların farklı taksonomik gruplarında farklı osmotik çözünenlerin varlığı gösterilmiştir (Oren 2002).

2.7.3. Halofilik bakterilerin genetiği ve genomu

Halofilik bakterilerle ilgili genetik çalışmalar uzun süre ihmal edilmişlerdir. Bu gruba ait ilk çalışmalar *Halomonas* ve *Chromohalobacter* cinslerine ait 14 izolat *SpeI* ve *SwaI* enzimleriyle kesilerek bu cinslerin taksonomik pozisyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Söz konusu çalışmada *Halomonas* cinsine ait 1,450 ile 2,830 kbp ve *Chromohalobacter* 1,770 ile 2,295 kbp uzunluğunda fragmentler elde edilmiştir (Mellado *et al.* 1998). Son zamanlarda halofilik mikroorganizmalarla ilgili çalışmalar hız kazanmış olup halofilik Arkea ve bakteri gruplarına ait şu ana kadar tüm genom sekansı tamamlanan 23 örnek mevcuttur (Ukani *et al.* 2011).

Halofilik Bakterilerle ilgili yapılan genetik çalışmaların bir diğeri konusunu plazmitler oluşturmıştır. Şimdiye kadar incelenen halofilik bakterilerin çoğunda plazmit varlığı tespit edilmiştir (Ghosh and Chattopadhyay 2010). Halofilik bakterilerde ilk karakterize edilen pMH1 plazmiti 11.5 kbp uzunluğundadır ve *Halomonas elongata*'dan izole edilmiştir. Kanamisin, tetrasiklin ve neomisinlere karşı direnç sağlayan bu plazmit *Escherichia coli*'de kararlıdır. Bu plazmidin 3 özgün bölgesi vardır ve vektör klonlama çalışmaları için uygun olduğu gösterilmiştir. Aynı plazmit yakın akraba olan *Halomonas halmophila*, *Halomonas halophila* ve de *Salinivibrio costicola*'da tespit edilmiştir (Vargas *et al.* 1999). Diğeri bir plazmit *Halomonas elongata*'dan izole edilen pHE1'dir. Kendi replikasyonu ve replikasyonun devamlılığı için bilgi taşıyan 4.2 kbp büyüklüğündeki bu plazmit, 1.7 kbp büyüklüğünde bir replikasyon noktasına sahiptir. (Mellado *et al.* 1997; Ghosh and Chattopadhyay 2010).

Halofilik bakterilerde çeşitli mutasyon çalışmaları yapılarak elde edilecek mutantların tuz toleransları ve osmotik adaptasyonları hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır. Bu anlamda normalde %6 NaCl tuz konsantrasyonlarında büyüeyebilen *Salinivibrio costicola* UV radyasyonuna maruz bırakılıp ardından penisilin içeren ortamlara alındığında, %15-17,5 NaCl tuz konsantrasyonlarına dayanıklı mutantlar elde edilmiştir (Qvist *et al.* 2012).

Bazı halofilik bakterilerde tuz değişimlerinde spesifik proteinlerin ortaya çıkması ve mevcut proteinlerin ortadan kaybolması ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda yapılan ilk çalışmada *Pseudomonas halosaccharolytica*'da NaCl konsantrasyonu %5'den %12'ye çıkartıldığında 43 kDa majör dış membran proteinlerinde azalma olurken 50 kDa proteinlerinde artma tespit edilmiştir (Economou *et al.* 1989). Aynı organizmada %12 NaCl'den %17,5 NaCl tuz konsantrasyonuna ani bir yükseliş 50 kDa proteinlerinde bir azalma ve yeni 41 kDa proteinlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Feng *et al.* 2006).

2.7.4. Halofilik bakterilerin biyoteknolojik uygulamaları ve potansiyelleri

Halofilik bakterilerde oldukça ilginç uygulama alanları mevcuttur (Ventosa *et al.* 1998). Halofiliklerin birçoğu osmoprotektantlar, enzimler, polimerler gibi birçok endüstriyel bileşikler üretirler. Halofilik bakterilerin büyütülmesi genelde kolaydır ve besin gereksinimleri basittir. Birçok heterotrofik halofilik bakteri karbon ve enerji kaynağı olarak çok çeşitli bileşikler kullanır (Oren 2002).

Karakteristik bir halofilik bakteri florası ıslah edilmiş, tuzlanmış balıklarla ilişkilendirilmiştir. Uzakdoğuda halofilik bakterilerin geleneksel fermente edilmiş tuzlanmış ürünlerin üretimiyle ilişkili oldukları gösterilmiştir (Kuda *et al.* 2001).

Fermenteli tuzlanmış kirpi balığı yumurtalarının hazırlanmasından mikroorganizmaların sorumlu olduğu gösterilmiştir. Yine gıda endüstrisiyle ilgili olan ticari 5'-guanilik asit

(5'-GMP) ve 5'-inosinik asit gibi tatlandırıcı ürünlerin üretiminde *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* gibi mikroorganizmalar kullanılmıştır (Amoozegar *et al.* 2003).

2.7.4.a. Halofilik bakterilerin biyodegradatif potansiyelleri

Endüstriyel atık sular genelde hem yüksek konsantrasyonlarda toksik organik/inorganik bileşikler hem de yüksek tuz içerirler. Bu gibi yüksek tuzlu atık sular pestisitlerin ve farmasötiklerin üretilme süreçlerinden meydana gelirler. Bu tür suların geleneksel biyolojik uygulamalarla iyileştirilmesi mümkün değildir. Bu anlamda halofilik bakterilerin biyodegradatif potansiyelleri olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda halofilik mikroorganizmalar kullanılarak havalandırmalı süzgeçler veya dönen diskler gibi havalandırma artırıcı düzenekler yardımıyla lağım suları ve aşırı tuzlu atık suların iyileştirilebileceği gösterilmiştir (Kargi and Dincer 2000; Dincer and Kargi 2001). Benzer şekilde Japonya’da erik turşusu yapım sürecinde oluşan %15 tuz konsantrasyonlu atık suların temizlenmesinde kullanılan bir biyolojik arıtma sistemi geliştirilmiştir (Kubo *et al.* 2001).

Halofilik bakterilerin yüksek tuz konsantrasyonlarında parçalama işlemi yaptığı toksik organik bileşikler içinde formaldehit (Azachi *et al.* 1995; Oren *et al.* 1992), fenol ve diğer aromatik bileşikler, organofosfor bileşikleri bulunur.

Bazı halofilik bakteriler ilginç şekilde ağır metal iyonlarına karşı toleranslıdır (Nieto *et al.* 1993; Oren 2002). Hem yüksek tuz hem de ağır metal konsantrasyonlarına dayanan mikroorganizmaların kullanımıyla ağır metal içeren aşırı tuzlu ortamlardaki ağır metallerin uzaklaştırılması ve biyoremedasyonu mümkün olabilir. İspanya’da yapılan bir çalışmada; farklı bölgelerde izole edilen bakterilerin civa, kadmiyum, bakır, krom ve çinko metallerine tolerans gösterdiği rapor edilmiştir (Ventosa *et al.* 1998; Oren 2002). Halofilik bakteriler selenyum ve uranyumun biyotransformasyonunu ve bu elementlerin biyoremedasyonlarında görev aldıkları gösterilmiştir. Bu organizmalar selenit elementini toplar ve nispeten toksik olmayan dimetilselenit’e dönüştürürler (D'Souza *et al.* 2001).

2.7.4.b. Halofilik bakteri metabolitlerinin stabilizatör olarak kullanımı

Halofilik mikroorganizmaların ürettiği uyumlu çözünenlerin stabilizatör olarak kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışmada mevcut olup son zamanlarda özellikle ektoin ve hidroksiektoin hakkındaki araştırmalar dikkat çekmektedir. Ektoin ve hidroksiektoin; enzimleri, DNA'yı ve membranları koruma, hücreleri yüksek tuzluluk, termal denatürasyon, kuruma ve donma gibi stres faktörlerine karşı koruyarak stabilize etme özelliğine sahiptir (Da Costa *et al.* 1998; Margesin and Schinner 2001). Ektoin *in vitro* şartlarda enzimlerin raf ömrünü ve enzim hazırlıklarında enzim aktivitelerini artırır. Bu tür bileşikler proteinlerin stabilizasyonunda hem genel bir koruma hem de peptid omurgası üzerine etkilerine dayalı bir koruma sağlarlar. Bu etki söz konusu proteinden kısmen bağımsız ve hem uygulanan uyumlu çözünenlerle hem de solvent ve bazı çözünenlerin beraber uygulanması her bir amino asit zincirindeki etkileşim ile meydana gelen değişken etkilere bağlıdır. Uygulanan tüm çözünenler enzimler üzerinde sıcaklığa, donmaya ve kurumaya karşı koruma göstermiş olsalarda koruma derecesi seçilen çözünen ve kullanılan enzime bağlıdır (Lippert and Galinski 1992). Bu bileşiklerin koruyucu etkilerini araştırmada laktat dehidrogenaz ve fosfofruktokinaz gibi işaretli enzimler model olarak kullanılmaktadırlar (Knapp *et al.* 1999).

Ektoin ve türevleri kozmetik alanlarda yaşlanmış, kurumuş ve hasarlı ciltleri koruma ve nemlendirme gibi etkilerinden dolayı ilginç uygulama alanlara sahiptirler (Motitschke *et al.* 2000). Son yıllarda Almanya'da Merck firması, "RonaCare™ Ectoin" isimli ürünü tanıtmış ve bu ürünün langerhans hücrelerinin sıcaklık şok proteinlerinin oluşumunu düzenleme ve membran bütünlüğünü koruma gibi faydalarının olduğu rapor edilmiştir (Beyer *et al.* 2000).

2.7.4.c. Halofilik bakteriler tarafından biyopolimerlerin üretimi

Bakteriler yüzey aktifleyici aktiviteleri ve biyoasılıtlama özelliklerinden dolayı bunların eksopolimerleri zenginleştirilmiş yağ iyileştirme süreçlerinde oldukça önemlidirler. Pfiffner *et al.* (1986) 200'den fazla bakteriyal izolatu yağ kuyularından, yağ kuyu

topraklarından, kum akıntılarında anaerobik lağımlardan ve tuzlu sulardan izole etmişlerdir. Bu bakteriler %10 NaCl'de 50°C'de anaerobik şartlarda ekstraselüler olarak polisakkarit ürettikleri bildirilmiştir. Bu tür ortamlarda dominant olan organizmaların Gr (+), hareketli, çubuk sporlu bakteriler oldukları rapor edilmiştir. Bu izolatlardan birisinin %12 NaCl'de iyi büyüdüğü ve pseudoplastik davranışla bir polisakkarit ürettiği, kaymaya ve termal degradasyona karşı dirençliliği tespit edilmiştir.

Halomonas eurihalina'nin F2-7 izolatu çok miktarda ekstraselüler bir polianiyonik polisakkarit üretir. Bu polimer potansiyel bir asıltılaştırma ajanıdır, ki bu ajan pseudoplastik bir davranış gösterirken genelde asidik pH'da en yüksek vizkozitesine ulaşır ve jel kıvamındadır. Bundan dolayı bu polisakkaritin (EPS V2-7) farmasötiksel alanlarda, gıda sanayisinde ve biyodegradasyon alanlarında bir çok uygulaması vardır (Bejar *et al.* 1998). Bu polimer kanda anti-CD3 antikorunun varlığına cevap olarak insan lenfositlerinin poliferasyonlarını artırır (Pérez-Fernandez *et al.* 2000).

2.7.4.d. Halofilik bakterilerin enzimleri

Amilaz, nükleaz, fosfataz ve proteazı da içeren birkaç ekstra ve intraselüler halofilik bakteri enzimi karakterize edilmiştir (Jacob 2012). Danimarka'da pastırma iyileştirme tuzlarından izole edilen bir *Halomonas elongate*'den 3 intraselüler esteraz karakterize edilmiştir (Oren 2002).

2.7.5. Bakteri sistematğinde kullanılan klasik yöntemler

Mikroorganizmaların tanılanmasında daha çok fenotipik karakterleri hakkında bilgi veren morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve patolojik özelliklerinin belirlenmesi klasik yöntemler olarak adlandırılır. Mikrobiyoloji bilimi var olduğundan beri uygulanmaya başlanılan bu yöntemlerin bazı dezavantajları da vardır. Mesela klasik yöntemlerde daima alternatif tanı sistemlerine ve eğitilmiş araştırmacılara ihtiyaç duyulur, fazla işgücü gerektirir. Bunun yanı sıra klasik yöntemlerle az sayıda fenotipik özellik tespit edilebilmesi; mikroorganizmalar arasındaki farklılıkları ortaya koymada özellikle

tür ve tür altı taksonomik grupları belirlemede yetersiz kalması; alınan sonuçların farklı yorumlara açık olması gibi birçok dezavantajı da vardır (Miller and Joaquim 1993). Geçmişten günümüze kullanılmakta olan klasik yöntemlerin bazıları aşağıda verilmiştir. Bunlar, koloni morfolojisi, hücre morfolojisi, Gram özellik, fizyolojik özellikler (pH, sıcaklık, oksijen, tuz), biyokimyasal özellikler (katalaz, oksidaz, amilaz, nitrat), antibiyotik duyarlılık vb'dir.

2.7.6. Bakteri sistematğinde kullanılan moleküler yöntemler

Bakterilerin fenotipik özelliklerini belirleyen klasik yöntemler günümüzde de yaygın bir şekilde kullanılıyor olmalarına rağmen bakterilerin tanılamasında ve filogenetik akrabalıkların ortaya konulmasında tek başlarına yeterli değildir (Koike *et al.* 1999). Bu nedenle tanılananın mutlak doğrulukla yapılabilmesi için özellikle nükleik asitleri ve mikroorganizmaların moleküler içeriklerini araştırma materyali olarak kullanan moleküler yöntemlerin kullanılması zorunludur. Son yıllarda moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler, yeni mikrobiyal tanı tekniklerinin geliştirilmesini hızlandırmış ve kullanıma sunulmasını sağlamıştır. Araştırma materyali olarak organizmaların moleküler içeriklerini esas alan tekniklere moleküler yöntemler denilmektedir. Moleküler yöntemler, karbohidratları, lipitleri, proteinleri ve DNA-RNA nükleik asit materyallerini araştırma materyali olarak kabul etmektedir. Bu materyallerin kullanılması ile mikroorganizmaların cins, tür hatta alt tür seviyesinde sistematik tanımlarını yapmak mümkün olmaktadır. Bunlara ilave olarak güvenilir sonuçlar sağlama, pratikliği, kısa zamanda ve çok sayıda mikroorganizmanın tanısına imkân sağlamasından dolayı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Durmaz 2001).

2.7.6.a. Bakteri sistematğinde genotipik materyalin kullanılması

Genotipik materyalin kullanıldığı moleküler yöntemler nükleik asitleri yani DNA ve RNA moleküllerini araştırmalarında kullanır. Sistematikte kullanılan diğer hücre içi moleküllerden veya hücre dışına salgılanan maddelerden farklı olarak, nükleik asitlerin hücrenin büyüme ortamından etkilenme olasılığı çok daha düşüktür. Bu nedenle, RNA

ve DNA moleküllerinin sistematik çalışmalarda kullanılması çok daha sağlıklı sonuçlar doğurur (Vandamme *et al.* 1996). Bakteri sistematğinde kullanılan yöntemlerin bazıları aşağıda özetlenmiştir.

DNA baz içeriğinin belirlenmesi: DNA'nı yapısında bulunan adenin, timin, guanin ve sitozin nükleotidlerinin kompozisyonunun belirlenmesi sistematik çalışmalarda kullanılan bir yöntemdir. DNA'da adenin bazı timinle, guanin bazı sitozinle eşleşerek çift zincirli yapıyı oluşturduğu için A/T ve G/C her zaman '1' rakamına sabittir. Fakat G+C/A+T oranı mikroorganizmalar arasında değişmektedir. G+C içeriği yöntem olarak Lee ve ark. tarafından (1956) sistematikte kullanılan ilk moleküler tabanlı tekniktir. Bu yöntem sayesinde birbirleriyle fenotipik özellikleri aynı gözükten bakterilerin bile aralarındaki genotipik farklılıklar ortaya konulabilir. Prokaryotik mikroorganizmalar arasında G+C içeriği %20-80 arasında değişmektedir. Bu değer iki bakteri arasında ne kadar büyükse bu iki bakteri birbirinden filogenetik olarak o kadar uzaktır. Çoğu zaman aynı cins içindeki bakterilerin G+C içeriklerinin birbirlerinden %10'dan fazla farklı değilken aynı türe ait suşların arasındaki fark %5i aşmaz (Dülger 2003).

16S rDNA dizisinin belirlenmesi: Son yıllarda mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ribozomal RNA bilgisini taşıyan rDNA geni biyomarker olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. rDNA dizisinin araştırmacılar tarafından çok sık tercih edilmesinin birçok nedeni vardır. Ribozomal RNA'ların tüm canlılarda protein sentezi için gerekli olması; bu yapıların tüm canlılarda primer ve sekonder yapılarında ve fonksiyonel olarak korunmuş olması, rDNA'ların gen sıralarının kolay bir DNA izolasyonu, PCR ve sekans uygulamasıyla belirlenebiliyor olması; diğer prokaryotik genlerle yatay gen transferi göstermemeleri ve bu yüzden canlılar arasındaki evrimsel ilişkiyi gösterme potansiyeline sahip olmaları bu sebeplerden en önemlileridir. Mikroorganizmalar arasındaki filogenetik akrabalık derecesini belirlemek amacıyla 16S evrensel primerler kullanılarak 16S rDNA gen bölgesi PCR cihazında çoğaltılır ve bu bölgenin gen bankasındaki diğer 16S rDNA sıralarıyla karşılaştırmaları yapılarak analizleri yapılmaktadır. Bu gen yaklaşık olarak 1500 nükleotidden oluşmakta ve her mikroorganizma için belirli bir gen dizisi bulunmaktadır (Wang and Qian 2009).

2.7.6.b. Ekstrakromozomal elementlerin bakteri sistematğinde kullanılması

Ekstrakromozomal elementler plazmitler olarak ifade edilen halkasal yapıdaki genetik elementlerdir. Plazmitler bulundukları mikroorganizmaya kuraklık, radyasyon, antibiyotik gibi birçok olumsuz etkene o çevrede avantaj sağlayacak olan bir takım özellikler kazandırır. Ekstrakromozomal elementler transformasyon, transdüksiyon, konjugasyon gibi birçok doğal süreçle mikroorganizmadan mikroorganizmaya aktarılabilirler. Bu nedenle, sadece ekstrakromozomal elementlerin varlığı veya yokluğu ile bakteri sistematğinin belirlenmesi sağlıklı sonuçlar doğurmaz. Ancak, sahip olunan plazmitler birçok biyokimyasal ve fenotipik özellikleri sonradan kazandırabildiği için ekstrakromozomal elementlerin araştırılması ve diğer test sistemleriyle birlikte değerlendirilmesi daha sağlıklı sonuçların alınmasını sağlar (Dölger 2003).

DNA hibridizasyonu: Farklı mikroorganizmaların sahip olduğu nükleik asitlerin hibridizasyonu ile mikroorganizmalar arasındaki filogenetik ilişki aydınlatılabilir. Eğer bilinmeyen bir mikroorganizmanın gerçekleştirilen tüm fenotipik ve genotipik testlere rağmen teşhisi yapılamıyorsa veya elde edilen test verileri birbirlerini desteklemiyorsa kesin bir sonuca ulaşmak için bu yöntem uygulanır. Bir mikroorganizmanın DNA karışımı yavaş yavaş ısıtıldığında bazlar arasında bulunan hidrojen bağların çözünmesine ve iki polinükleotid iplikçığının birbirinden ayrılmasına DNA denatürasyonu denir. Eğer birbirinden ayrılmış polinükleotid iplikçiklerinden oluşmuş olan DNA karışımı yavaş yavaş soğutulursa bu iki iplikçik arasındaki bağlar yeniden kurulur ve DNA eski çift iplikçikli haline kavuşur ve bu olaya renatürasyon denir. Genomlar arasındaki DNA benzerliğine dayanan bu işlemin tüm aşamalarında spesifik DNA baz çiftlerine bağlanan ve 6-18 nükleotid uzunluğunda olan işaretli probalar kullanılır ve en son aşamada işaretli molekülün bağlandığı hibridizasyon bölgeleri saptanarak DNA hibridizasyon testi yapılır. İki mikroorganizma türü birbirlerine ne kadar yakın akrabaysa DNA+DNA hibridizasyon oranı da o derecede yüksektir (Kadayıfcılar 2007).

2.7.6.c. Bakteri sistematğinde genomik dna parmak izi analizlerinin kullanılması

Genomik DNA parmak izi analizleri yöntemi kullanılırken tüm genom çalışma materyali olarak kullanılır. Bu yöntem sayesinde referans organizmayla parmak izi analizi eşleşme sağladıysa bakterinin türünü ve hatta tür içindeki genotipik çeşitliliği de ortaya koyar. Genomik DNA parmak izi analizi; temel olarak genomik DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve PCR yöntemi kullanılarak genom içindeki tekrarlı dizilerin çoğaltılması yöntemleriyle gerçekleştirilir.

Genomik DNA'nın Restriksiyon Analizi ile Parmak İzinin Çıkartılması: Bu yöntemde mikroorganizmanın sahip olduğu tüm genetik materyal restriksiyon enzimleri ile kesilir. Restriksiyon enzimleri DNA'yı özel palindromik sıralardan tanıyarak kesen enzimlerdir. Düşük sıklıklı restriksiyon fragmenti analizi (LFRFA) olarak adlandırılan bu işlem sonucunda her bir mikroorganizma grubunun farklı restriksiyon fragmentlerinden oluşan parmak izi oluşur. Oluşan restriksiyon fragmentleri agaroz jel elektroforezinde ayıramayacak kadar büyük olduğundan, Pulse Fields Jel Elektroforezinde (PFGE) parçalar ayrılırlar (Tenover *et al.* 1995). Oluşan restriksiyon fragmentlerinin sayısal analiz yöntemleriyle karşılaştırılması sonucunda tür içindeki benzerlik grupları oluşturulur. Bu yöntem Southern Blot hibridizasyonu ile de etkin bir biçimde kullanılabilir (Rashidian and Goodfellow 2003).

PCR Yöntemi Kullanılarak DNA Parmak İzinin Çıkarılması: Son yıllarda mikroorganizmaların genomlarında bulunan korunmuş bölgelerin çoğaltılması sonucu oluşturulan genomik parmak izleri bir mikroorganizma karışımında bulunan her bir bireyin genetik çeşitliliği ile ilgili bilgi sağlamaktadır. Bu yöntemde, seçilen primerler ve reaksiyon şartları mikroorganizmanın cins, tür hatta alt tür seviyesinde ayrımının yapılmasını sağlamaktadır. Moleküler biyoloji ve özellikle de PCR teknolojisindeki gelişmeler, mikroorganizmaların genomik analizlerine bağlı olarak belirlenen bir popülasyondaki genetik çeşitliliğin saptanmasında, mikroorganizmaların sınıflandırılması ve karakterizasyonunda büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda, prokaryot ve ökaryotların büyük bölümünün

genomlarında birçok tekrarlı (repetitive) DNA dizisinin bulunduğu tespit edilmiştir. rep-PCR genomik parmak izi analiz yöntemi olarak adlandırılan bu yöntemde temel olarak çoğaltılan üç farklı tekrarlı dizi belirlenmiştir. Bunlar; 35-40 bp uzunluğundaki tekrarlı ekstrasjenik palindromik (REP) dizileri, 124-127 bp'lik enterobakteriyel tekrarlı genler arasındaki intergenik korunmuş (ERIC) dizileri ve 154 bp'lik BOX elementleridir (Waturangi *et al.* 2012). Bu elementler, genom etrafındaki intergenik bölgede veya kromozom üzerindeki oryantasyon bölgesinde görülebilirler. ERIC, REP ve BOX PCR metotları popülasyonlardaki genetiksel çeşitliliğin ortaya konulmasında önemli bilgiler vermektedir. rep-PCR hızlı bir yöntem olup, rep-PCR'ın çeşitleri olan REP, ERIC ve BOX PCR yöntemleri termal döngü cihazındaki şartlar ve primerlerdeki farklılıklar dışında özdeş yöntemlerdir (Louws and Cuppels 2001). İntergenik tekrarlı elementler ilk kez *E. coli* *tls* geninin 3' ucunun analizi esnasında tanımlanmıştır (Sharples and Lloyd 1990). Daha sonra gerçekleştirilen araştırmalar sonucunda, bu dizilere *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Vibrio cholerae* gibi enterobakteriyel türlerde de rastlanmış ve bu elementlere ERIC adı verilmiştir. Bu diziler nükleotid açısından iyi derecede korunan bölgeler olmalarına karşın, kromozomlardaki yerleri türden türe farklılık göstermektedir (Hulton *et al.* 1991; Waturangi *et al.* 2012). Aktinomisetlerin, Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin çoğunun genomlarında, sıraları büyük oranda korunmuş olan çok kopyalı tekrarlı diziler bulunmakta olup, rep-PCR primerleri bu dizilere göre tasarlanmıştır. Bu diziler, genomda farklı bölgelerde ve her iki oryantasyonda da bulunurlar ve bunların PCR reaksiyonları ile belirlenebilmesi için REP ve ERIC elementleri için birbirlerine ters yönde iki, BOX elementleri için tek bir primer tasarlanmıştır (Seurinck *et al.* 2003; Mkandawire *et al.* 2004). Bu primerler ve PCR yöntemleri kullanılarak REP, ERIC ve BOX elementleri arasında yerleşmiş olan farklı genomik bölgelerin seçici olarak amplifikasyonu gerçekleştirilmekte ve elde edilen profillerin karşılaştırılması ile aynı türe ait olan suşlar arasındaki farklılık ortaya çıkarılmaktadır. (Waturangi *et al.* 2012). İkinci bir yöntem Williams *et al.* tarafından ortaya çıkarılan ve AP-PCR olarak bilinen tek bir primer kullanılarak gerçekleştirilen rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniğidir (Yu *et al.* 2011; Waturangi *et al.* 2012).

Üçüncü yöntem çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) yöntemi ise saflaştırılan DNA'nın uygun bir veya iki restriksiyon enzimi kullanarak kesilmesi ve kesilen bu bölgenin çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Stead *et al.* 1998; Yu *et al.* 2011; Waturangi *et al.* 2012). Dördüncü yöntem PCR-RFLP yöntemidir. Bu yöntem; PCR ile çoğaltılan hedef DNA bölgelerinin restriksiyon enzimleriyle kesilip agaroz jelde yürütülerek boyanması ve oluşan bantların yer ve sayılarının mukayesesi ile elde edilen çeşitlilik esasına dayanmaktadır (Yu *et al.* 2011; Waturangi *et al.* 2012).

2.7.7. Bakteri sistematğinde kemotaksonomik yöntemlerin kullanılması

2.7.7.a. Bakteri sistematğinde mikrobiyal tanılama sistemi (MIS)

Yağ asitleri tüm bakterilerin hücre içeriklerinde, hücre membranlarında bulunan ve çeşitleri farklılık gösteren yapılardır. Bakteriyel yağ asidi kompozisyonunu kullanarak bakteri tanılanması, yağ asidi profillerine dayanan bakteriyel sınıflandırmaların ve nükleik asit homolojisine dayanan sınıflandırmalarla iyi karşılaştırıldığından uzun yıllardır kullanılmaktadır. Abel *et al.* (1963) hücrelerin yağ asitleri içeriklerini gaz kromatografisi ile belirlemelerinden sonra, Mikrobiyal identifikasyon sistemi (MIS) ilk defa 1985 yılında mikroorganizmaları yağ asitleri içeriklerine göre tanılamak üzere uygulamaya konulmuş bir sistemdir (Vauterin *et al.* 2000). Bu sistemle uygulanan yöntemde, genetik olarak aynı olan mikroorganizmaların çevre şartları aynı olursa hücrelerindeki yağ asitlerinin çeşitliliğinin ve bulunan çeşitli yağ asitlerinin % miktarlarının aynı olacağı farzedilir (Şahin 1999). Yağ asitleri bakteri sitoplazmalarında ve diğer hücresel organellerin çift tabakalı membranlarında, fosfolipid, glikolipid veya lipopolisakkarit formunda bulunan hidrokarbon yapısındaki makro moleküllerdir. Bu moleküller içerdikleri karbon (C) atomlarının sayısına, karbon atomları arasındaki çift bağ sayısına, hangi karbon atomları arasında çift bağ olduğuna ve karbonların hidrojen (H) atomları tarafından doyurulmuş olup olmamalarına göre farklı isimler almaktadırlar (Görmez 2011). Yani yağ asitleri profillerindeki farklılıklar, mikroorganizmalar arasındaki genetik akrabalıkların dolaylı bir göstergesidir (Sasser 1990). Yağ asitleri profillerinin filogenetik analizlerde kullanılmasını sağlayan MIS, bilgisayar kontrolünde

çalışmakta olup, gaz kromatografisi, bu kromatografiyi besleyen gaz tankları (hidrojen, azot ve hava), bilgisayar ünitesi, bilgisayar ünitesi ile uyumlu çalışan kütüphaneler ve yazıcı olmak üzere 5 kısımdan meydana gelmektedir (Lelliott and Stead 1987). Anaerobik ve aerobik bakterilerin, aktinomisetlerin, mayaların ve gelişmiş fungusların bu sistem sayesinde kolaylıkla sistematikleri yapılabilmektedir. Ancak yapılan sistematüğın sınıflandırmanın doğruluk derecesi sistemin sahip olduğu kütüphaneye ve kütüphanenin içindeki örneklerin çalışılan örneklerle eşleşme oranına bağılıdır. Bu yöntemin işlem basamakları, bakteriyal lipidlerin hidrolizasyonu ve ekstraksiyonuna dayanır. Karboksilik grupların metilasyonu yağ asitlerinin metil esterlerini (FAME) üretir ve bunlar gaz kromatografisi (GC) ile analiz edilir. Bu teknik yağ asiti metil esterin FAME şeklinde kısaltılması ile adlandırılır ve patojenlerin veya diğerk zararlı bakterilerin rutin olarak teşhisinin yapıldığı klinik tanı, halk sağığı, gıda ve suları inceleyen laboratuvarlarda geniş bir kullanım alanına sahiptir (Buyer 2006; Çetinkuş 2007; Madigan and Martinko 2010).

2.7.7. b. Bakteri sistematüğında biolog sisteminin kullanılması

Mikroorganizmaların çoğı heterotrof olduklarından yaşamlarını sürdürebilmeleri için çeşitli karbon ve azot kaynaklarına ihtiyaç duymaktadırlar. Organizmalar bünyelerinde bulunan çeşitli enzimlerin varlığına veya yokluğına bağılı olarak karbon kaynaklarını kullanabilirler. Bu esasa dayanarak ilk önce durham tüplerinde daha sonra API ismiyle geliştirilen sınırlı sayıda karbon kaynaklı kit sistemi ile yapılan tanı yöntemi yerini son yıllarda Biolog olarak isimlendirilen 95 farklı karbon kaynağına göre tanı yapan mikropate sistemine bırakmıştır (Miller *et al.* 1993; Konopka *et al.* 1998). 1989 yılında geliştirilen ve bilgisayar kontrollü çalışan Biolog sistemi; turbidimetre, kinetik okuyucu ve bilgisayar sistemi olmak üzere 3 ana parçadan oluşmaktadır (Kingler *et al.* 1992). Organizmalar kendi aralarında gruplandırılarak [(fungus, maya, anaerobik bakteri, Gram (-) bakteri, Gram (+) bakteri)], her bir mikroorganizma grubu için belirleyici karbon kaynaklarından oluşan farklı mikropatelerin üzerlerindeki mikro çukurculardan bir tanesine negatif kontrol olarak sadece su, diğerk 95 çukurcuğun her birisine ise farklı bir karbon kaynağı (basit şekerler, karbohidratlar, aminoasit ve benzeri

moleküller ile deterjanlar) kodlanarak, redoks indikatör boyası olarak da tetrazolium violet ilave edilmektedir (Garland 1996). Ticari olarak hazır bir şekilde alınan bu platelere turbidimetre de yoğunluğu ayarlanmış patojen süspansiyonu (%0.85 NaOH fluid çözeltisi + patojen) inokule edilmektedir. Organizmaların karbon substratlarını kullanımına bağlı olarak ortamda oluşturmuş olduğu organik asit içerikli metabolitlerin pH indikatörü boyalar ile reaksiyonu sonucunda renklenmeler gözlenmiştir. Kullanılan karbon substratlarında görülen renk değişikliğinden elde edilen metabolik profil, bilgisayar ortamında (Biolog, Microlog Inc, Hayward, CA. USA) mikroorganizmaların ait oldukları gruplar içerisinde, ticari kütüphaneleri bulunan MicroLog paket programında okutularak cins, tür veya da tür altı seviyede tanılanmaktadır (Fang *et al.* 2001). Analiz sonuçları, metabolik profil tablosu ve tanı sonucu yazılı rapor halinde verildiği gibi sistemin genel hafızasında da otomatik olarak kayıt edilmekte ve bu bilgilere istenilen zamanda ulaşılarak tekrar yeni bir çıktı alınabilmektedir (Şahin *et al.* 2003). Bu sistem sayesinde organizmanın hem tanısı hem karakterizasyonu yapılmakta aynı zamanda tür içi ve türler arası populasyon karakterleri de belirlenebilmektedir. Yine organizmada meydana gelen mutasyonların enzim süreçlerinde herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığı da test edilebilmektedir. Bu sistemin bir başka avantajı da, biyolojik aktivitenin belirlenmesine olanak sağlaması nedeniyle elde edilen profile göre hangi mikroorganizmaların biyolojik mücadelede veya çevre temizliğinde kullanılabileceğinin belirlenmesine imkân sağlamasıdır (Fisk *et al.* 2003). Biolog sisteminin kütüphanesi aerobik ve anaerobik olmak üzere birçok mikroorganizma türünün tanı ve karakterizasyonunun yapılmasını sağlamaktadır. Buna uygun şekilde ticari olarak hazırlanan plâtelere (GN2, GP2, FF, Yeast v.b gibi) mevcuttur (Connell and Garland 2002).

2.7.7. c. Bakteri sistematüğinde çözünebilir protein profillemesinin kullanılması

Tek yönlü poliakrilamid jel uygulaması (PAGE) çeşitli amaçlarla hücre içi ve hücre dışı birçok proteinin ayrıştırılmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin uygulanması sonucu ortalama otuz adet bant elde edilebilir. Birbirine filogenetik olarak yakın olan canlıların sahip oldukları proteinlerin çeşitleri birbirine yakın olması

gerektiğinden, bu yöntemle farklı mikroorganizmaların birbirleriyle karşılaştırılması yapılarak aralarındaki akrabalık dereceleri hakkında bilgi edinilir. Sonuç olarak farklı protein profillerine sahip mikroorganizmaların DNA parmak izi analizinde kullanılan ortak mantıkla hareket ederek birbirlerine uzak türler oldukları farzedilir (Osuna and Casamayor 2011).

2.7.7. d. Bakteri sistematüğinde serolojik tanı yöntemlerinin kullanılması

Serolojik yöntemler antijen-antikor ilişkisine dayanan testleri içerir. Serolojik testlerin arasında ELISA en hızlı sonuç veren ve uygulanabilirliğı en kolay olan yöntem olduğundan birçok alanda tanılama amaçlı kullanılmaktadır (Schloter 1995). ELISA bir zemin üzerine kodlanan antijenlerin enzim kodlanmış antikorlarla tespit edilerek substrat ile reaksiyona sokulması sonucu elde edilen pozitif reaksiyonların renklenmesi sonucunda okunmasına olanak veren bilgisayar kontrollü bir sistemdir. Aynı mikroorganizma türüne giren farklı suşlar arasındaki “antijenik farklılıklar” bu sistemle tespit edilmektedir. Özellikle kültürü yapılamayan virüs, viroid ve fitoplazma gibi mikroorganizmaların tanısında kullanılan serolojik metotlar, polimeraz zincir reaksiyon teknolojisi geliştirilinceye kadar tek alternatifsiz yöntem olarak uygulanmıştır (Schloter 1995).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan tuzlu topraklar Iğdır ilinden 3, Erzincan ilinden 4 ve Erzurum illerinde 9 ayrı noktadan 3'er farklı örnek alınmıştır. Tuzlu toprak örneklerinin alındığı kordinatlar Erzurum için 39° 58' 42.97"K -41° 18' 44.79" D, Erzincan için 39° 42' 00.56"K -39° 40' 06.28"D ve Iğdır için 39° 53' 19.39"K -44° 01' 08.38" D olarak belirlenmiştir. Toprak örnekleme kriterleri olarak, örnek alınacak alanın eğimi, fizyografyası ve ana materyalin çeşidi gibi özellikler değerlendirilmiştir ve yöreyi temsil eden genel özellikleri incelenerek çalışmanın amacına uygun olarak her bir lokasyonda 100 farklı noktadan 0-30 cm toprak derinliğinden örnekler alınmıştır. Araştırma konusu toprak örnekleri yörede toprak oluş faktör ve süreçleri değerlendirilerek bölgeyi en iyi temsil edecek şekilde saptanmıştır. Bakteri izolasyonu için gereken genel ve özel besiyerleri, izole edilen bakterilerin tanı ve karakterizasyon işlemlerinde kimyasallar, sarf malzemesi ve kitler kullanılmıştır. Ayrıca moleküler denemelerde çalışmaya özel primerler ve enzim preparatları kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında kullandığım alet ve cihazlar:

İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)

Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)

Mikroskop (Boeco BM 180, GERMANY)

Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)

Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)

Manyetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)

pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)

Derin Dondurucu (Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)

Hassas Terazı (Mettler Toledo AL204, CHINA)

Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)
 Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)
 Mikrodalga Fırın (Beko MD1505, TÜRKİYE)
 Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)
 Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)
 Dikey Tüp Karıştırıcı (GFL 3025, GERMANY)
 Santrifüj (Hettich Mikro 22R, GERMANY)
 Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIDI, Inc., Newark, GERMANY)
 PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)
 Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)
 Elektroforez Akım Sağlayıcı (OWL OSP300-2Q, U.S.A.)
 Jel Görüntüleme Sistemi (DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL)

3.1.2. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Çalışma süresince kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanma şekilleri aşağıda verilmiştir.

%8'lik NaCl çözeltisi (1000 mL için): 80 g NaCl 1000 mL saf suda çözöldü ve 121°C de 20 dk otoklavda steril edildi.

Moderate Halophile (MH) besiyeri (1000 mL için): 10 g maya ekstraktı, 5 g proteaz peptone, 1 g glikoz, 81 g NaCl, 7 g MgCl₃.6H₂O, 9,6 g MgSO₄.7H₂O, 0,36 g CaCl₂.2H₂O, 2 g KCl ve 0,06 g NaHCO₃, 0,026 NaBr, 20 g agar, 1000 mL su içerisinde çözöldü, pH 7.0'a ayarlanarak 121°C de 20 dk otoklavda steril edildi (Ventosa *et al.* 1982).

Stok Besiyeri (100 mL için): 0,65 g nutrient broth karışımına 20 mL gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edildi. Aseptik olarak steril 2 mL'lik eppendorf tüplerine 1,2 mL konularak hazırlandı (Adıguzel 2006).

%3'lük KOH çözeltisi (100 mL için): 3 g KOH 100 mL steril saf su içerisinde çözülerek hazırlandı.

Kristal violet (100 mL için): 2 g kristal violet, 20 mL %95'lik etil alkolde çözöldü ve son hacim steril saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002).

Lugol solüsyonu (100 mL için): 1 g iyot ve 0,5 g KI tartıldı, toplam hacim steril saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002).

Safranin (100 mL için): 1 g safranin, 10 ml %95'lik etil alkolde çözöldü ve son hacim steril saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002).

Malaşit yeşili (100 mL için): 5 g malaşit yeşili, 100 mL steril saf su içinde çözölerək hazırlandı. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi (Harley and Prescott 2002).

%5'lik H₂O₂ çözeltisi (100 mL için): 17 mL %30'luk H₂O₂'in hacmi steril saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Şekerlerin Fermantasyonu (500 mL için): 1 g pepton, 17,5 g NaCl, 5 g şeker, 1,5 µg timol mavisi, 150 µg K₂HPO₄, 5 g agar 500 mL saf su içinde konularak manyetik karıştırıcıda karıştırılan besiyerinin pH 7,2'ye ararlandıktan sonra 10 mL'lik cam tüplere 4-5 mL konularak 121°C de 20 dk otoklavda steril edildi (Winn *et al.* 2006).

Nutrient broth + agar (yarı katı nutrient agar): 13 g nutrient broth'a 6 g agar katılarak 1 L saf su içerisinde eklendi. Besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril deney tüplerine alınarak katılaşımaya bırakıldı (Harley and Prescott 2002).

Nişasta agar (1000 mL için): 10 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 35 g NaCl, 2 g nişasta, 10 g agar 1000 mL saf su içerisine konularak pH 7,0'a ayarlanır ve 121 °C de 20 dk otoklavda steril edildi. Sterilizasyon sonrası 45-50°C'ye kadar soğutulan besiyeri steril petrilere döküldü ve katılaşması sağlandı.

Jelatin agar (1000 mL için): 10 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 35 g NaCl, 4 g jelatin, 6 g agar 1000 mL saf su içerisine konularak pH 7,0'a ayarlanır, 10 mL'lik tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılır ve 121 °C de 20 dk otoklavda steril edildi.

Kazein agar (1000 mL için): 10 g pepton, 10 g maya ekstraktı, 35 g NaCl, 2 g kazein, 6 g agar 1000 mL saf su içerisine konularak pH 7,0'a ayarlanır, 10 mL'lik tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılır ve 121 °C de 20 dk otoklavda steril edildi (Gerhardt *et al.* 1994).

Neutral Red solüsyonu (20 mL için): 0,2 g Neutral Red 20 mL saf suda çözüldü (Wayne *et al.* 1974).

Solüsyon A (100 mL için): 0,908 g KH₂PO₄ 100 mL saf suda çözülür.

Solüsyon B (100 mL için): 0,238 g Na₂HPO₄ 100 mL saf suda çözülür.

Fosfat tamponu (200 mL için): 100 mL solüsyon A ile 100 mL solüsyon B Solüsyon A ve B birbirine karıştırılarak amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi.

Tween 80 solüsyonu (102,5 mL için): 100 mL fosfat tamponu, 2 mL Neutral Red ve 0,5 mL Tween 80 birbirine karıştırılarak pH'ı 7'ye ayarlanır ve 4 mL'lik tüplere dağıtılarak 121 °C de 20 dk otoklavda steril edildi (Wayne *et al.* 1974).

Eskülin agar (400 mL için): 17,4 g eskülin 400 mL saf su içerisinde konularak pH 7.0'a ayarlanır ve 10 mL'lik cam tüplere 4-5 mL konularak 121 °C de 20 dk otoklavda steril edildi (Chuard and Reller 1998).

Nitrat Broth (400 mL için): 0,8 g KNO₃, 8 g pepton, 2 g maya ekstraktı 400 mL saf su içerisinde konularak pH 7,2'ye ayarlanır ve 10 mL'lik cam tüplere 5-6 mL konularak 121 °C de 20 dk otoklavda steril edildi (Harley and Prescott 2002).

Nitrit Broth (400 mL için): 0,8 g KNO₂, 8 g pepton, 2 g maya ekstraktı 400 mL saf su içerisinde konularak pH 7,2'ye ayarlanır ve 10 mL'lik cam tüplere 5-6 mL konularak 121 °C de 20 dk otoklavda steril edildi (Harley and Prescott 2002).

Antibiyotik stok solüsyonu (5 mL için): 150 µg antibiyotik (Neomisin, kanamisin, tetrasiklin) 5 mL saf su içerisinde iyice çözöldü ve amber steril cam tüplere konularak +4 °C de buzdolabında saklandı (NCCLS, 2000).

Hücre parçalama (saponification) çözeltisi (300 mL için): 150 mL metil alkol ve 150 mL steril saf su 1 L'lik renkli çözelti şişesine ilave edildi. Daha sonra katı formdaki 45 g sodyum hidroksit eklenerek iyice çözölmüneye kadar karıştırılarak hazırlandı (MIS 2005).

Metilleştirme (methylation) çözeltisi (600 mL için): 325 mL hidroklorik asit (6 N) ve 275 mL metil alkol 1 L'lik renkli çözelti şişesi içerisinde iyice çözölmüneye kadar karıştırılarak hazırlandı (MIS 2005).

Saflaştırma çözeltisi (400 mL için): 200 mL metil-tert-butil-eter 200 mL hexan üzerine ilave edilerek 1 L'lik renkli çözelti şişesine katıldı iyice çözölmüneye kadar karıştırılarak hazırlandı.

Bazik yıkama (Base Wash) çözeltisi (900 mL için): 10,8 g katı formdaki sodyum hidroksit 900 mL steril saf su içerisinde iyice çözülünceye kadar karıştırıldıktan sonra 1 L'lik renkli çözelti şişesine aktarılarak hazırlama işlemi tamamlandı (MIS 2005).

TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) tamponu: 0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA saf su içerisinde çözüldü ve pH 8'e ayarlandı. Son hacim 250 mL'ye tamamlanarak otoklavda steril edildi (Wilson 1997).

%10'luk SDS çözeltisi (100 mL için): 10 g SDS'nin 100 mL steril saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlandı. Şişenin ağzı kapatılarak, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Wilson 1997).

Proteinaz K(1 mL için): 1 mL steril saf su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi (Wilson 1997).

5 M NaCl çözeltisi (100 mL için): 29,22 g NaCl'ün 100 mL saf su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Otoklavda steril edildi (Wilson 1997).

%10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide)-0,7 M NaCl çözeltisi (100 mL için): 80 mL saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl çözüldü. NaCl tamamen çözündükten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Wilson 1997).

%70'lik Etil alkol (100 mL için): 70 mL saf etil alkolün hacmi steril saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. -20 °C'de muhafaza edildi.

20X Dimetil sülfoksit (DMSO) (2 mL için): %100' lük DMSO 2mL'lik eppendorf tüplere aktarılarak, kullanılıncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi (Wilson 1997).

Primer çalışma konsantrasyonu: Ticari olarak liyofilize halde alınan primerler katoloğu doğrultusunda çözülerek $C1 \times V1 = C2 \times V2$ formülü kullanılarak son konsantrasyonu 50 μM olacak şekilde hazırlandı (Barış 2009).

1XTAE Tamponu (1000 mL için): 100 mL 10XTAE'nin hacmi steril distile su 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Ethidium bromür çözeltisi (100 mL için): 100 mL steril saf su içerisinde 1 g ethidium bromür manyetik karıştırıcı kullanarak iyice çözüldü. Amber şişede, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Barış 2009).

6X yükleme tamponu (100 mL için): 100 mL için %100'lük gliserolden 40 mL alıp, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırıldı ve hacmi 1x TAE ile 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon amber şişe içerisinde, +4 °C'de muhafaza edildi (Barış 2009).

3.2. Yöntem

3.2.1. Tuzlu topraklardan alınan bakterilerin izolasyonu ve muhafazası

Tuzlu topraklardan alınan örneklerin her birinden 1 gram tartılarak %8 NaCl içeren steril su içerisinde 24 saat 28 °C'de çalkalanarak homojenize edilmiş, süre sonunda her bir örnekten iki paralel olmak üzere 1 mL alınarak MH besiyerine yayma plak ekimleri yapılarak 28 °C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince petri plaklarında gözlemlenen farklı kolonilerden iğne öze yardımıyla tek koloniler alınarak tekrar MH besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. MH besiyerlerinde kolonilerin saflıkları kontrol edildikten sonra her bir izolatin 24-48 saatlik saf kültürlerinden bir öze dolusu alınarak içerisinde %18 gliserol içeren nutrient broth stok besiyerlerine alınmıştır. Elde edilen bu stok kültürler EM, EK, EN ve IG olarak kodlanmış ve daha sonraki karakterizasyon işlemlerinde kullanılıncaya kadar -78 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. İzolatların bazı fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.2.a. İzolatların tuz toleranslarının belirlenmesi

Bakteri izolatlarının tuz toleranslarının belirlenmesinde %10, 15 ve 20 NaCl içeren nutrient broth besiyerleri kullanılmıştır. İzolatlar bu besi ortamına inoküle edilmiş ve 28 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede OD₆₀₀’de yapılan ölçümler sonucunda izolatların tuz toleransları belirlenmiştir (Ventosa *et al.* 1982).

3.2.2.b. İzolatların gelişebildikleri pH aralıklarının belirlenmesi

İzolatların gelişebildikleri pH aralığının belirlenmesinde; %5 NaCl içeren ve farklı pH değerlerine (5; 7; 9; 11) sahip nutrient broth besiyerleri kullanılmıştır. İzolatlar, %5 NaCl içeren NB besiyerlerine inoküle edilmiş, inkübasyon sonrasında spektrofotometrede (OD₆₀₀’de) yapılan ölçümler sonucunda, izolatların gelişebildikleri pH aralıkları tespit edilmiştir (Ventosa *et al.* 1982).

3.2.3. İzolatların bazı morfolojik özelliklerin belirlenmesi

3.2.3. a. Hücre morfolojisi

Saflaştırılan bakteriler, çizgi ekimle MH besi ortamına ekildikten sonra 28°C’de inkübasyona bırakılmıştır. 24-48 saatlik bakteri kültürlerinden öze ile alınan hücreler, lam üzerine eklenen bir damla sdH₂O içerisine konulup lamın üzerinde eşit olarak yayılması sağlanmış daha sonra kuruma işlemi için bir süre bekletilmiştir. Kurumaya bırakılan preparat, kuruduktan sonra lamın alt yüzeyi alevden geçirilerek bakterilerin tespit işlemi yapılmıştır. Tespit işlemi uygulanan preparat; basit boyama için 1 -2 dk boyunca kristal viyolete içinde bekletilmiştir. Boyama işleminden sonra, mikroskop

altında hücre şekilleri (yuvarlak, çubuk veya spiral) belirlenerek kaydedilmiştir (Harley and Prescott 2002; Adıguzel 2006).

3.2.3.b. Gram reaksiyon testi

Bakteri hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi, amacıyla genç bakteri kültüründen temiz bir lam üzerine hazırlanan Smear, kristal violet ile 1 dk boyanır. Kristal violet boyasının hücreye nüfus etmesiyle, Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin her ikisi de mor renkle boyanır. 1 dk sonra preparat üzerindeki fazla boya preparatın musluk altında hafif bir şekilde su akımına bırakılmasıyla uzaklaştırılır. Bu işlemin hemen ardından preparatın üzerine lügol eklenerek 1 dk beklenir. Lügol bu safhada mordan olarak kullanılır. Bu preparat %96'lık etil alkol ile titizlikle yıkanır. Alkol ile yıkama sonrası Gram (+) bakteriler peptidoglikan tabakalarının kalın olması nedeniyle kristal violet-lügol kompleksini bırakmaz ve mor renkli kalırken, Gram (-) bakterilerin dış membranları bozulur ve ince peptidoglikan tabakası boyayı tutamadığı için renksizleşir. Alkol ile yıkamadan sonra preparat saf sudan geçirilip 20 saniye safranin ile boyanır. Yapılan bu son boyama muamelesi sonunda hafif su akımı ile yıkanan preparat kurumaya bırakılır. Kurutulan preparatın immersiyon objektifinde incelemesi yapılır. Mor renk Gram (+), pembe-kırmızı renk Gram (-) olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 2002; Özkan 2009).

3.2.3.c. Endospor varlığının ve hücre içindeki yerinin belirlenmesi

Endospor varlığı belirlenecek olan izolatlar, %5 NaCl içeren NA besiyerine ekilip endospor oluşumuna neden olacak stres şartlarına (sıcak-soğuk, yaşlanma, kuruma) maruz bırakılmıştır. Bu kültürlerden inceleme yapılması için smear hazırlanmıştır. Bu smear kaynayan su banyosu üzerine konularak preparatın üst yüzeyi malaşit yeşili ile tamamen boyandıktan sonra üzerine kurutma kâğıdı yerleştirilmiştir. 5-7 dk süren malaşit yeşili ile boyama işlemi boyunca kurutma kâğıdının sürekli olarak ıslak kalması sağlanmıştır.

Malaşit yeşili ile boyama işleminden sonra, kurutma kâğıdı kaldırılıp fazla boya hafif su akımı ile giderilmiştir. Preparat 20-30 saniye safranin ile boyanır. Yapılan karşıt boya muamelesinden sonra hafif su akımı ile yıkanan preparat kurumaya bırakılır. Kurutulan preparatın immersiyon objektifinde endospor durumları incelemesi yapılır (Harley and Prescott 2002; Adıguzel 2006).

3.2.3.d. Hareketlilik testi

İzolatlar %5 NaCl içeren NB + %0,6 agar içeren tüplere iğne öze yardımıyla ekilmiş ve bir günlüğüne inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerde oluşan ekim çizgisine göre gelişim gözlemlenerek hareketlilik durumu incelenmiştir (Barış 2009).

3.2.4. İzolatların bazı biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi

3.2.4.a. Katalaz testi

Elde edilen bakteri izolatlarının, katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla bu test sistemi kullanılmıştır. Katalaz enzimi, elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2)'i parçalayarak H_2O ve O_2 gazına dönüştürür. Bu esnada O_2 gazının oluşumu, kabarcıklar şeklinde gözlemlenebilir. Aerobik solunum yapan veya fakültatif olan mikroorganizmalarda katalaz enzimi vardır. Bu sebepten ötürü %5 NaCl içeren NA'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen, bir öze dolusu alınarak lam üzerine konulmuş ve üzerine bir damla %5'lik H_2O_2 damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif; oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 2002).

3.2.4.b. Oksidaz testi

Bu test sisteminin yardımıyla bakterilerin, elektron transferinde bulunan sitokrom c proteinine sahip olup olmadıkları belirlenmiştir. Sitokrom c proteini (oksidaz c),

solunum olayında görev almakta olup, elektron taşıma sisteminde, maddeleri birinden diğerine indirgeme reaksiyonuyla hücresel enerji (ATP) oluşumunu sağlamaktadır. Bu test sistemi; organizmanın sitokrom-c oksidaz enzimine sahip olması durumunda, bu enzimin reaksiyona girmesi sonucu mavi renk oluşturması prensibine dayanır. Bu testte %1 Tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride içeren kit halindeki diskler kullanılmıştır. Bu diskler 1 damla steril saf su ile doyurulmuş ve üzerine %5 NaCl içeren NA besiyerinde geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu eklenmiştir. Bakteride sitokrom c proteini varsa, bu diskte kodlu olan substratıyla reaksiyona girerek mavimsi mor bir renk oluşumuna sebep olur. Bu durum oksidaz pozitif olarak değerlendirilmiş, renk değişiminin görülmemesi ise oksidaz negatif olarak kaydedilmiştir (Harley and Prescott 2002; Acar 2009).

3.2.4.c. Amilaz testi

Bu test, bakterilerin nişasta molekülünü parçalayarak amilaz enzimini içerip içermediklerini tespit etmek için gerçekleştirilmiştir. Bu test için %5 NaCl içeren nutrient agar besi ortamında geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril iğne öze ile tek bir koloni alınarak, %5 NaCl içeren nişasta agar'a ekimleri yapılarak 28°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. 5 günlük inkübasyon süresinin sonunda, petrilere gelişen izolatların üzerine 5-6 damla lügol çözeltisi damlatılarak kolonisinin etrafında görülen renk değişimi (açık renk) amilaz pozitif olarak, renk değişiminin olmaması ise amilaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 2002).

3.2.4.d. Nitrat redüksiyon testi

Nitrat besiyeri anaerobik bir ortamda nitrifikasyon yapabilen obligat aerob bakterilerin ortamdaki nitratı kullanıp nitrit ve N_2 'ye indirgemesi ile gelişmeleri, nitrifikasyon yapamayanların ise gelişmemeleri esasına dayanır (Adıguzel 2006). %5 NaCl içeren nutrient broth besi ortamında geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril çubuk öze ile tek bir koloni alınarak, 5 mL nitrat besi ortamı içeren tüplere ekim yapılarak 28°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. 5 günlük inkübasyondan sonra her bir tüpe

Griess-Ilosvay ayırıcından 5 damla eklenir. Kırmızı rengin oluşması pozitif, herhangi renk değişiminin olmaması durumunda ise tüplere toz çinko eklenir ve çinko eklenen tüplerde renk kırmızı olursa negatif olarak değerlendirilirken renk değişiminin olmaması nitratın amonyağa kadar redükte olduğunu gösterir. Bu durumda ise söz konusu tüplere Neissler ayırıcı eklenerek amonyak varlığı belirlenir (Harley and Prescott 2002; Adıguzel 2006).

3.2.4.e. Nitrit redüksiyon testi

Bu test, nitrit içeren bir besi ortamında bakterilerin nitriti kullanıp NO, N₂O ve N₂'ye indirgemesi esasına dayanır (Harley and prescott 2002). %5 NaCl içeren nutrient agar'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril iğne öze ile tek bir koloni alınarak, 5 mL nitrat besi ortamı içeren tüplere ekim yapılarak 28°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. 5 günlük inkübasyondan sonra her bir tüpe Griess-Ilosvay ayırıcından 5 damla eklenir. Oluşan kırmızı renk ortamda bulunan nitritin Griess-Ilosvay ayırıcıyla reaksiyona girdiğini gösterdiğinden negatif, herhangi renk değişiminin olmaması ise ortamda bulunan nitritin NO, N₂O ve N₂ gibi bileşiklere dönüştüğünü gösterdiğinden pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 2002).

3.2.5. İzolatların bazı hidrolitik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.5. a. Farklı şekerlerden asit üretme yeteneğinin belirlenmesi

Bu test, mikroorganizmaların çeşitli karbohidratları kullanarak asit üretme yeteneklerini belirlemek amacı ile yapılmaktadır. Mikroorganizmanın karbohidratları kullanarak asit üretme yeteneklerini ortaya koyabilmek için besi ortamına üreme üzerine olumsuz etkisi olmayacak yoğunlukta bazı pH indikatörleri (andrade, brom krezol moru, brom timol mavisi, fenol kırmızısı, vs.) katılır. %5 NaCl içeren nutrient agar'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril iğne öze ile tek bir koloni alınarak, 5 mL %5 NaCl içeren şeker agar besi ortamına ekim yapılarak 28°C'de 5 gün inkübasyona

bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kullanılan pH indikatörü bağlı olarak tüplerde bir renk değişimi meydana gelir. Bu test kapsamında şeker fermantasyonu için brom timol mavisi kullanıldığı için sarı renk pozitif, yeşil ve mavi renk ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Winn *et al.* 2006).

3.2.5.b. Kazein hidrolizi

Bu test, sütün proteinini oluşturan koloidal karakterdeki kazeinin, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, proteolitik ve ekstrasellüler proteaz enziminin varlığını tespit etmek amacıyla yapılmaktadır. %5 NaCl içeren nutrient agar'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril iğne öze ile tek bir koloni alınarak, 5 mL kazein agar besi ortamı içeren tüplere ekim yapılarak 28°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. 5 günlük inkübasyondan sonra tüplerde meydana gelen şeffaflaşma proteaz enziminin varlığını gösterdiğinden pozitif, herhangi bir değişimin olmaması ise mikroorganizmanın proteaz enzime sahip olmadığını Gösterdiğinden Negatif Sonuç Olarak Değerlendirilmiştir (Gerhardt *et al.* 1994).

3.2.5.c. Eskülin hidrolizi

Bu test, bir glikozit olan eskülin'in, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, eskülinaz (β -glikosidaz) enziminin varlığını tespit etmek amacıyla yapılmaktadır. %5 NaCl içeren nutrient agar'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril iğne öze ile tek bir koloni alınarak, 5 mL eskülin agar besi ortamı içeren tüplere ekim yapılarak 28°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. 3 günlük inkübasyondan sonra tüplerde meydana gelen renk değişimi (kahverengi) eskülinaz enziminin varlığını gösterdiğinden pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Chuard and Reller 1998).

3.2.5.d. Jelatin hidrolizi

Bu test, mikroorganizmaların bir protein türü olan jelatini büyüme için tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneklerini belirlemek amacı ile yapılmaktadır. %5

NaCl içeren nutrient agar'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril iğne öze ile tek bir koloni alınarak, 5 mL jelatin agar besisi ortamı içeren tüplere ekim yapılarak 28°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. 5 günlük inkübasyondan sonra tüplerde meydana gelen şeffaflaşma jelatinaz enziminin bir göstergesi olduğundan pozitif, herhangi bir değişimin olmaması ise mikroorganizmanın jelatinaz enzimine sahip olmadığını gösterdiğinden negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Gerhardt *et al.* 1994).

3.2.5.e. Tween 80 hidrolizi

Bu test mikroorganizmaların lipaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Lipaz aktivitesinin belirlenmesi için %5 NaCl içeren nutrient agar'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril iğne öze ile tek bir koloni alınarak, 5 mL tween 80 solüsyonu içeren tüplere ekim yapılarak 28°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. 7 günlük inkübasyondan sonra besisi ortamındaki neutral red indikatör boyanın kırmızıdan pembeye renk değişimi lipaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Wayne *et al.* 1974).

3.2.6. Antibiyotik direnç özelliklerinin belirlenmesi

Çalışmada izole edilen bakteri izolatları, %5 NaCl içeren nutrient agar'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen steril eküvyon çubukları ile nutrient agar yüzeyine yayılmış ve antibiyotik diskleri steril koşullarda petrilere yerleştirilerek 28°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. 5 günlük inkübasyon sonrası her bir petride oluşan inhibisyon zonu cetvelle ölçülerek kaydedilmiştir (NCCLS 2000).

3.2.7. Moleküler testler

3.2.7.a. Bakteri izolatlarının yağ asit profillerinin belirlenmesi

Bakteri izolatlarından, yağ asit metil ester ekstraksiyonu (FAME) izolasyonu, saflaştırılması ve analizi; sistemin kullanma klavuzunda belirtilen protokole göre yapılmıştır.

Bilgisayar kontrollü gaz kromatografi sistemi olan Mikrobiyal Identifikasyon Sistemi (MIDI, Inc., Newark, DE) ile kültüre alınan izolatların yağ asit profilleri tespit edilmiş, test izolatları tanılanmaya çalışılmıştır. (Adıguzel 2006).

Tanılanacak Bakterilerin Standart Besiyerinde (TSA) Geliştirilmesi: Stoğa alınmış olan kültürlerden steril platin bir öze TSA katı besi yerine 4 fazlı çizgi ekim yapılmış, petriler 30°C'ye ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Yağ Asidi Metil Esterlerinin Saflaştırılması: Bakterilerin yağ asitlerini saf olarak elde etme amacıyla 4 farklı çözelti kullanılmıştır (Şahin 1999). Hazırlanan 4 çözelti ile izolatların yağ asit metil esterlerinin saflaştırılması işlemi aşağıda belirtilen şekilde yapılmıştır:

1-Standart besiyerlerinde geliştirilen izolatların genç kültürleri steril bir platin öze ile toplanılarak steril cam test tüplerine (5 ml) aktarıldı. Sonra tüplerin ağızları sıkıca kapatılarak, tüpler etiketlendi.

2-Bütün test tüplerine 1 ml çözelti 1'den ilave edildikten sonra 5-10 saniye çalkalandı ve 5 dk 100°C'lik su banyosunda bekletildi. Tekrar 5-10 saniye çalkalanan test tüpleri 25 dk boyunca 100 °C'lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Bu işlem ile canlı hücreler parçalanması ve yağ asitlerinin serbest kalması sağlandı.

3-Test tüplerine 2 ml çözelti 2 eklendi ve 5-10 saniyelik bir çalkalamadan sonra 80°C'de 10 dk süreyle su banyosunda bekletildi. Daha sonra 2 dk süreyle buz ya da soğuk su içerisinde hızlı bir şekilde soğutuldu. Bu işlemle, serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenmesi, yağ asitlerinden yağ asit metil esterlerinin elde edilmesi sağlandı. Bu olay yağ asitlerine yüksek sıcaklıklarda uçuculuk özelliği kazandırdı.

4-Soğutulan tüplere 1,25 ml çözelti 3 eklendi ve 10 dk boyunca çalkalandı. Bu safhada tüp içerisinde altta inorganik, üstte organik sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz meydana geldi. Yağ asit metil esterleri asidik fazdan ayrışarak organik faz bölgesinde toplandı. Bu sayede pastör pipeti kullanılarak tüplerin alt kısımlarındaki asidik faz atıldı ve organik faz muhafaza edildi.

5-En son safhada her tüpe 3 ml çözelti 4 eklenip, 5 dk süreyle çalkalandıktan sonra 10 dk süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Çözelti 4, bazik bir çözelti olduğundan, serbest yağ asit metil esterlerini daha saf elde etmemize olanak verdi.

6-Tüp içerisinde tekrar iki ayrı faz oluştu. Üst fazda toplanan ve yağ asit metil esterleri içeren faz pastör pipeti ile alınarak 2 ml'lik gaz kromatografisi tüplerine transfer edildi. Ağızları sıkıca kapatılan bu tüpler MIS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine yerleştirildi. Daha sonra MIS cihazı çalıştırılarak, sistem kılavuzunda belirtildiği gibi örnekler analiz edildi ve yüzde olarak en yüksek tanı sonucu verenler değerlendirildi (MIS 2005).

3.2.7.b. İzolatların bazı genetiksel özelliklerinin belirlenmesi

Bakteri Hücrelerinden Genomik DNA'ların İzolasyonu: Araştırmada kullanılacak olan bakteri izolatlarından DNA ekstraksiyonu, Adıguzel 2006 tarafından uyarlanan izolasyon metoduna göre aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

1. DNA'sı izole edilecek olan bakteriler NA besiyerine 3 faz halinde ekilmiş ve petriler 28-32°C'ye ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

2. Steril edilmiş, ağzı kapaklı 1,5 ml'lik ependorflara 1000 µl STE (hücre duvarını parçalayarak hücre içeriğinin serbest hale gelmesini sağlar) tamponu konularak içerisine 2-3 öze dolusu bakteri kültürü eklenmiştir.
3. Tüplerin 2500 rpm'de vortekslenerek homojenize olmaları sağlanmıştır.
4. Vortekslenen tüpler 10 000 rpm'de 10 dk süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alınarak atılmış ve peletin üzerine tekrar 1000 µl STE tamponu eklenerek, 10 dk 10 000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Bu işlem üst faz berrak olana kadar tekrar edilmiştir.
5. Santrifüj sonrası, oluşan üst faz atılarak pelletin üzerine 500 µl STE tamponu eklendikten sonra mikropipetle dikkatlice alıp vermek suretiyle tamponun pelletle iyice karışması sağlanmıştır.
6. Tüpler 75°C'ye ayarlı su banyosunda 30 dk süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 15. dk'da tüpler alınarak 4-5 kez alt üst edilerek tekrar inkübe edilmiştir.
7. Su banyosundan çıkartılan tüplere 50 µl %10'luk SDS (proteinler arasındaki disülfid bağlarını parçalar) ve 7 µl proteinaz K (proteinleri parçalar) eklenmiş ve 40°C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
8. İnkübasyon sonrası tüplere ortamdaki tuz konsantrasyonu 0,75-0,8 M olacak şekilde 5 M NaCl ve 0,1 hacim %10'luk CTAB/0,7 M NaCl (DNA'yı polisakkaritlerden ve ortamdaki diğer bileşiklerden arındırır) ilave edilmiştir.
9. Tüpler 65°C'ye ayarlı su banyosunda 15 dk inkübasyona bırakılmıştır.
10. Su banyosundan alınan tüplere eşit hacimde 25:24:1 fenol:kloroform:izoamilalkol (genellikle, nükleik asitlerden proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılır. Kloroform

proteinleri denatüre ederek, sıvı ve organik fazların ayrışmasını sağlar. İzoamilalkol ise ekstraksiyon esnasında meydana gelebilecek köpürmeyi engeller) eklenerek 15 dk oda sıcaklığında çalkalayıcıyla çalkalanmıştır.

11. Tüpler 16 000 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra oluşan üst faz yeni steril ependorf tüplere konulmuştur. Her bir tüpe 0,1 hacim %10CTAB / 0.7 M NaCl (ortamda bulunabilecek polisakkarit kalıntılarını elemine etmede kullanılır) ilave edilmiştir.

12. 65°C'ye ayarlı su banyosunda tüpler 15 dk bekletilmiştir.

13. Tüplere eşit hacimde 24:1 kloroform:izoamilalkol ilave edilmiş ve tüpler 15 dk oda sıcaklığında, çalkalayıcıyla karıştırılmıştır.

14. Tüpler bir daha 16 000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası oluşan üst faz tekrar yeni steril bir ependorfa konulmuştur.

15. Tüpler üzerine 0,6 hacim izopropanol (DNA'yı bağlayarak, iplikcikler halinde çökmesini sağlar) ilave edilmiştir.

16. Tüpler -20°C'de 1 gece süresince bekletilmiştir.

17. Buzdolabından çıkartılan tüpler 15 000 rpm de 15 dk santrifüjlenmiştir.

18. Üzerine -20°C'de bekletilen %70 lik etanolden (DNA'yı yıkamak amacıyla kullanılır) 500-600 µl eklenmiş ve 15 000 rpm de 15 dk süreyle santrifüjlendikten sonra süpernatant kısmı dikkatlice atılmıştır.

19. Peletin üzerine tekrar %70 lik etanolden 500-600 µl ilave edilerek, 15 000 rpm de 15 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılarak tüpler ağzı açık

bir şekilde etil alkolün uçması, DNA'nın kuruyarak şeffaf bir görünüm alması amacıyla 2-3 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir.

20. Kuruma işlemi gerçekleştikten sonra, DNA'lar 50-70 µl TE içinde oda sıcaklığında 30 dk bekletilerek, iyice çözünmeleri sağlanmış ve üzerlerine 2-3 µl RNase eklenmiştir.

21. DNA'lar %0,6'lık agaroz jelinde yürütülmüş ve jelde tek parça bant veren örnekler + 4°C'ye kaldırılarak sonraki çalışmalar için saklanmıştır.

Bakteri İzolatlarının 16S rDNA Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu: Test izolatlarından elde edilen genomik DNA'lardan, bakteri sistematigi için önemli olan 16S rRNA bölgesi evrensel primerler (forward ve reverse primerler) kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltılmıştır (Adıguzel *et al.* 2009).

Reaksiyonun (Master mix'in) Hazırlanması: PCR'ı yapılacak her bir örnek için 3 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, %0.01 jelatin pH: 8.3), 0.6 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10mM), 3 µl UNI 16S-L (forward ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA), 3 µl 16S-R (reverse ATG GTA CCG TGT GAC GGG GGG TGT GTA), 1.2 µl DMSO, 0.6 µl MgCl₂(50 µM), 0.3 µM / ml *Taq* DNA polimeraz ve 15.3 µl sdH₂O ile 27 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmış ve karışıma son olarak 3 µl template DNA (100 ng/µl) ilave edilerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır. Master mix ve template DNA içeren ependorf tüplerin üzerine buharlaşmayı engellemek için 15 µl mineral yağ eklenmiştir.

PCR Programı: PCR için hazırlanan örnekler, 95 °C'de 2 dk ön denetürasyon, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dk denatürasyon, 54 °C'de 1 dk bağlanma ve 72 °C'de 2 dk uzama basamakları ve son olarak 72 °C'de 5 dk uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü cihazına konuldu. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapıldı.

16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektrophorezi: 1.50 gr agaroz üzerine 150 ml 0.5X TBE (%1'lik agaroz jel) tamponu eklenerek karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye dek kaynatılmıştır. 50 °C'ye kadar soğutulan agaroz jelle 0.8 µg/ml olacak miktarda ethidium bromür eklenerek içerisinde tarak yerleştirilmiş olan elektrophorez jel küvetine dökülmüştür. 30-35 dk beklenerek jelin donması sağlanmış, donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılmış ve içerisinde 0.5X TBE tamponu bulunan elektrophorez tankının içine yerleştirilmiştir. Jeldeki ilk çukura, 10 kb DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl yüklenmiştir. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 2.5 µl 6X yükleme tamponu, 10 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiştir. Elektrophorez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 2 saat yürütülmüştür. Jel üzerinde bulunan ve ethidium bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenmiş ve bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edilmiştir.

16S rDNA Sekans Analizi: 16S rDNA PCR yöntemi ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin baz dizilerinin analizi, Hollanda'da bulunan MacroGen firmasına gönderilerek yapılmıştır. Elde edilen 16S rDNA dizileri Gen Bankasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) var olan diğer bakteriyal dizilerle karşılaştırılmıştır (BLAST analizi). Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilmiş ve gen bankası kabul numaraları alınmıştır (Acar 2009).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bakteri izolasyonu Sonuçları

Bu çalışmada Erzurum, Erzincan ve Iğdır illerindeki tuzlu topraklardan alınan örnekler, MH besiyerlerine ekilmiştir. Her bir ilden alınan toprak örneklerindeki izolatlar MH besiyerlerinde gelişen bakteriyal kolonilerden farklı olduğu tespit edilen toplam 63 adet bakteri izole edilmiştir. Erzurum tuzlu topraklarından alınan izolatlar “EM” ve ‘EK” Erzincan tuzlu toprak örnekleri “EN” ve Iğdır tuzlu toprak örnekleri ise “I” olarak kodlanmıştır.

4.2. İzolatların fizyolojik test sonuçları

Tez çalışmasında araştırılan izolatların Tuz toleransları ve pH aralıkları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Tüm izolatlar %10 NaCl’de gelişirken, artan tuz konsantrasyonlarında izolat sayısının azaldığı belirlenmiştir. Çalışmamızda araştırılan izolatların pH aralıklarının değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. İzolatların Fizyolojik Test Sonuçları

Tuz aralıkları (% NaCl)				pH aralıkları				
İzolat kodu	10	15	20	5	7	9	11	12
EM1	+	-	-	-	+	+	-	-
EM2	+	-	-	-	+	+	-	-
EM3	+	+	-	-	+	+	-	-
EM4	+	+	-	-	+	+	+	-
EM7	+	+	+	-	+	+	+	-
EM8	+	+	-	-	+	+	*	-
EM9	+	-	-	-	+	+	-	-
EM10	+	-	-	-	-	+	*	-
EM11	+	-	-	*	+	+	+	-
EM12	+	+	-	-	-	+	+	-
EM13	+	-	-	-	+	+	*	-
EM14	+	+	+	-	-	*	+	-
EM15	+	+	*	+	+	+	*	-
EM16	+	-	-	-	-	+	+	-
EM17	+	*	-	-	+	+	-	-
EM18	+	*	-	-	+	+	*	-
EM19	+	*	-	+	+	+	-	-
EM20	+	+	-	-	+	*	-	-
EM21	+	-	-	-	+	+	*	-
EM22	+	+	*	-	+	+	+	-
EM23	+	+	*	-	+	+	+	-
EM24	+	-	-	-	-	+	+	-
EM25	+	+	*	-	*	+	+	-
EM26	+	*	-	-	*	+	*	-
EM28	+	*	-	-	+	+	+	-
EM29	+	-	-	-	+	+	+	-
EM30	+	-	-	-	+	+	*	-
EM31	+	-	-	-	+	+	-	-
EM32	+	*	-	-	+	+	*	-
EM33	+	*	-	-	+	+	*	-
EM34	+	-	-	-	+	+	-	-
EK1	+	*	-	+	+	+	+	-
EK2	+	+	*	+	+	+	+	-
EK3	+	-	-	+	+	+	*	-
EK4	+	+	*	-	+	+	+	-
EK5	+	+	*	+	+	+	*	-

*: Az

Çizelge 4.1. (devam)

EK6	+	-	-	+	+	+	*	-
EK7	+	+	*	+	+	+	+	-
EK8	+	*	-	-	+	+	+	-
EK9	+	*	-	-	*	*	+	-
EK10	+	*	-	*	*	*	*	-
EK12	+	+	-	+	+	+	+	-
EK13	+	*	-	+	+	+	+	-
EK14	+	-	-	+	+	+	+	-
EK15	+	-	-	+	+	+	+	-
EN1	+	*	-	+	+	+	+	-
EN2	+	+	*	-	+	+	*	-
EN3	+	*	-	+	+	+	+	-
EN4	+	*	-	+	+	+	+	-
EN5	+	*	-	+	*	+	*	-
EN6	+	*	-	+	+	+	*	-
EN7	+	+	*	+	+	+	*	-
EN8	+	+	*	*	+	+	+	-
EN9	+	-	-	-	+	+	+	-
EN10	+	+	-	*	+	+	+	-
EN11	+	+	*	-	+	+	+	-
EN12	+	*	-	+	+	+	+	-
IA	+	+	*	+	+	+	+	-
IB	+	+	*	-	+	+	+	-
IC	+	+	*	-	+	+	+	-
ID	+	+	*	-	+	+	+	-
IE	+	+	*	-	+	+	+	-
IF	+	+	*	-	+	+	+	-

*: Az

4.2. İzolatların Morfolojik Test sonuçları

Tuz toleransları belirlenen bakterilerin bazı morfolojik (hücre şekli, Gram özelliği, endospor durumları, hareketlilik,) özellikleri belirlenerek sonuçlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. İzolatların Morfolojik Test Sonuçları

İzolat kodu	Gram	Endospor	Hareketlilik	Morfoloji
EM-1	+	Terminal	+	Çubuk
EM-2	+	-	-	Kısa çubuk
EM-3	+	Terminal	+	Çubuk
EM-4	+	-	-	Kısa çubuk
EM-7	+	Terminal	+	Kokoid
EM-8	+	-	+	Çubuk
EM-9	+	Subterminal	+	Çubuk
EM-10	+	Terminal	+	Çubuk
EM-11	+	Subterminal	+	Çubuk
EM-12	+	Subterminal	+	Çubuk
EM-13	+	Terminal	+	Çubuk
EM-14	+	Terminal	+	Çubuk
EM-15	+	Terminal	-	Çubuk
EM-16	+	Terminal	+	Çubuk
EM-17	+	-	-	Kok
EM-18	+	-	-	Kok
EM-19	+	Terminal	-	Çubuk
EM-20	+	Subterminal	+	Çubuk
EM-21	+	-	+	Çubuk
EM-22	+	Terminal	+	Çubuk
EM-23	-	-	+	Çubuk
EM-24	+	Terminal	+	Çubuk
EM-25	+	Terminal	+	Çubuk
EM-26	+	Terminal	+	Çubuk
EM-28	+	Subterminal	+	Çubuk
EM-29	+	Terminal	+	Çubuk
EM-30	+	-	-	Çubuk
EM-31	+	Terminal	+	Çubuk
EM-32	+	-	+	Kok
EM-33	+	Terminal	+	Kısa çubuk
EM-34	+	Subterminal	+	Çubuk
EK-1	+	Subterminal	+	Kısa çubuk
EK-2	+	-	-	Kok
EK-3	+	Subterminal	+	Çubuk
EK-4	+	Terminal	+	Kısa çubuk
EK-5	+	Subterminal	+	Çubuk
EK-6	+	-	+	Kısa çubuk

Çizelge 4.2. (devam)

EK-7	+	-	-	Çubuk
EK-8	+	Terminal	+	Kısa çubuk
EK-9	+	-	+	Kok
EK-10	+	Subterminal	+	Çubuk
EK-12	+	-	+	Kısa çubuk
EK-13	+	Terminal	+	Çubuk
EK-14	+	Terminal	+	Çubuk
EK-15	+	Subterminal	+	Çubuk
EN-1	+	Subterminal	+	Çubuk
EN-2	+	Terminal	+	Kısa çubuk
EN-3	+	-	-	Kısa çubuk
EN-4	+	-	-	Kok
EN-5	+	Terminal	+	Kısa çubuk
EN-6	+	Subterminal	+	Çubuk
EN-7	+	-	-	Kok
EN-8	+	Subterminal	+	Çubuk
EN-9	+	-	+	Kısa çubuk
EN-10	+	Subterminal	+	Çubuk
EN-11	+	Terminal	+	Çubuk
EN-12	+	-	-	Kısa çubuk
IA	+	-	+	Kısa çubuk
IB	+	Terminal	+	Çubuk
IC	+	Terminal	+	Çubuk
ID	+	Subterminal	+	Çubuk
IE	+	Subterminal	-	Çubuk
IF	+	-	-	Çubuk
EN-2	+	Terminal	+	Kısa çubuk
EN-3	+	-	-	Kısa çubuk
EN-4	+	-	-	Kok
EN-5	+	Terminal	+	Kısa çubuk
EN-6	+	Subterminal	+	Çubuk
EN-7	+	-	-	Kok
EN-8	+	Subterminal	+	Çubuk
EN-9	+	-	+	Kısa çubuk
EN-10	+	Subterminal	+	Çubuk
EN-11	+	Terminal	+	Çubuk
EN-12	+	-	-	Kısa çubuk
IA	-	-	+	Kısa çubuk
IB	+	Terminal	+	Çubuk
IC	+	Terminal	+	Çubuk
ID	+	Subterminal	+	Çubuk
IE	+	Subterminal	-	Çubuk
IF	+	-	-	Çubuk

4.3. İzolatların Biyokimyasal Test sonuçları

İzolatların biyokimyasal test (Oksidaz, Katalaz, Nitrat indirgeme, nitrit indirgeme) sonuçları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları

İzolat kodu	Oksidaz	Katalaz	Nitrat indirgeme	Nitrit indirgeme
EM-1	-	+	-	-
EM-2	-	+	-	-
EM-3	+	+	-	-
EM-4	-	+	-	-
EM-7	-	+	-	-
EM-8	-	+	-	-
EM-9	-	+	-	-
EM-10	-	+	-	-
EM-11	-	+	-	-
EM-12	-	+	-	-
EM-13	-	+	-	-
EM-14	-	+	-	-
EM-15	-	+	-	-
EM-16	-	+	-	-
EM-17	-	+	-	-
EM-18	-	+	-	-
EM-19	-	+	++	-
EM-20	+	+	+	-
EM-21	-	+	-	-
EM-22	-	+	-	-
EM-23	+	+	++	-
EM-24	-	+	-	-
EM-25	-	+	-	-
EM-26	-	+	-	-
EM-28	-	+	-	-
EM-29	-	+	-	-
EM-30	-	+	-	-
EM-31	-	+	++	-
EM-32	-	+	-	-
EM-33	-	+	-	-
EM-34	-	+	++	-

Çizelge 4.3. (devam)

İzolat kodu	Oksidaz	Katalaz	Nitrat indirgeme	Nitrit indirgeme
EK-1	-	+	-	-
EK-2	-	+	-	-
EK-3	-	+	+	-
EK-4	-	+	-	-
EK-5	+	+	+	-
EK-6	-	+	-	-
EK-7	-	+	-	-
EK-8	-	+	+	-
EK-9	-	+	-	-
EK-10	-	+	-	-
EK-12	+	+	-	-
EK-13	-	-	+	-
EK-14	+	+	-	-
EK-15	-	+	-	-
EN-1	+	+	+	-
EN-2	-	+	-	-
EN-3	-	+	-	-
EN-4	-	+	-	-
EN-5	-	+	+	-
EN-6	+	+	-	-
EN-7		+	-	-
EN-8	+	+	-	-
EN-9	-	+	+	-
EN-10	+	+	-	-
EN-11		+	-	-
EN-12	-	+	-	-
IA	+	+	+	-
IB	-	+	-	-
IC	+	+	-	-
ID	-	+	+	-
IE	+	+	-	-
IF	-	+	-	-

4.4. İzolatların Hidroliz Test sonuçları

İzolatların hidroliz test (Kazein, Nişasta, jelatin, Eskülin, Tween80) sonuçlar Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. İzolatların Hidroliz Test Sonuçları

İzolat kodu	Kazein	Nişasta	Jelatin	Eskulin	Tween 80
EM-1	-	-	+	-	-
EM-2	-	+	-	+	-
EM-3	++	-	+	++	-
EM-4	-	-	-	-	-
EM-7	-	-	-	-	-
EM-8	++	-	+	++	-
EM-9	+	-	-	-	+
EM-10	-	-	-	-	-
EM-11	+	-	-	-	+
EM-12	-	-	-	-	-
EM-13	-	-	-	-	-
EM-14	-	-	-	-	-
EM-15	-	-	+	-	-
EM-16	++	-	-	-	-
EM-17	-	-	-	++	-
EM-18	-	-	-	-	-
EM-19	++	-	+	++	-
EM-20	-	-	-	++	-
EM-21	++	-	-	-	-
EM-22	++	+	-	++	-
EM-23	++	-	-	-	-
EM-24	-	-	+	-	+
EM-25	++	-	-	-	-
EM-26	+	-	+	-	-
EM-28	-	-	-	-	-
EM-29	-	-	+	-	-
EM-30	-	+	-	-	-
EM-31	-	-	-	-	-
EM-32	-	-	-	-	-
EM-33	-	-	-	-	-
EM-34	-	-	-	-	-

Çizelge 4.4. (devam)

İzolât kodu	Kazein	Nişasta	Jelatin	Eskulin	Tween 80
EK-1	++	-	+	++	+
EK-2	-	-	+	-	-
EK-3	+	-	+	++	-
EK-4	-	-	+	-	-
EK-5	++	+	+	++	-
EK-6	-	-	-	++	-
EK-7	+	-	-	-	-
EK-8	-	-	-	-	-
EK-9	-	-	-	-	-
EK-10	-	+	-	+	+
EK-12	++	-	-	++	-
EK-13	-	-	-	-	-
EK-14	++	-	+	+	-
EK-15	-	-		++	+
EN-1	-	+	-	++	-
EN-2	-	-	-	-	-
EN-3	-	+	-	-	-
EN-4	-	-	-	++	-
EN-5	-	-	+	++	-
EN-6	-	+	+	+	-
EN-7	-	-	-	++	-
EN-8	-	-	-	++	-
EN-9	-	-	-	++	-
EN-10	-	+	+	++	-
EN-11	+	-	-	-	-
EN-12	-	+	-	-	-
IA	-	-	-	-	-
IB	-	-	-	-	-
IC	+	-	+	+	-
ID	-	-	-	-	-
IE	-	-	-	-	-
IF	-	-	-	-	-

4.5. İzolatların Şeker Fermentasyon Test sonuçları

İzolatların şeker fermentasyon test (glikoz, fruktoz, sükroz, sorbitol, laktoz, maltoz, manitol, manoz, glaktoz, inositol) sonuçlar Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. İzolatların Şeker Fermentasyon Test Sonuçları

İzolat kodu	Glikoz	Fruktoz	Sükroz	Sorbitol	Laktoz	Maltoz	Manitol	Manoz	Galaktoz	İnositol
EM-1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
EM-2	+	+	+	-	++	++	-	-	-	+
EM-3	++	+	++	-	-	-	-	+	-	-
EM-4	+ ^z	++	+	-	++	++	-	-	++	+
EM-7	-	+	-	-	-	-	-	++	-	-
EM-8	++	+	++	-	-	-	+	-	-	-
EM-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-12	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EM-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-15	++	-	++	-	-	-	+	-	-	-
EM-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-17	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EM-18	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++
EM-19	++	++	++	-	-	++	-	+	-	+
EM-20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-22	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-
EM-23	+	++	+	++	++	++	-	-	++	++
EM-24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-26	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
EM-28	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EM-29	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-30	+	-	+	+	++	++	-	+	-	+
EM-31	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
EM-32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-33	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EM-34	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

Çizelge 4.5. (devam)

İzolat kodu	Glikoz	Fruktoz	Sükroz	Sorbitol	Laktoz	Maltoz	Manitol	Manoz	Galaktoz	İnositol
EK-1	++	+	++	-	-	-	-	+	-	-
EK-2	++	++	+	++	+	+	++	++	++	+
EK-3	++	++	++	+	-	+	++	++	+	+
EK-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK-5	++	++	++	++	-	-	+	++	+	+
EK-6	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-
EK-7	+	-	+ ^z	-	-	+	-	++	-	+
EK-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK-10	++	-	+	-	+	+	-	-	-	-
EK-12	++	-	++	-	-	-	+	+	-	-
EK-13	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EK-14	++	+	++	-	-	-	++	++	+	-
EK-15	++	++	++	+	+	+	++	++	++	+
EN-1	++	+	++	++	-	++	++	++	++	++
EN-2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EN-3	+	+	+	-	++	++	-	-	-	+
EN-4	++	+	++	+	++	++	+	++	++	++
EN-5	+	-	+	+	++	++	-	-	-	++
EN-6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EN-7	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
EN-8	+	-	+	+	++	++	++	+	++	-
EN-9	+	-	+ ^z	-	-	-	-	+	-	-
EN-10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EN-11	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
EN-12	+	-	+	+	++	++	-	+	+	++
IA	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
IB	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IC	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
ID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IE	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
IF	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

4.6. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Tez çalışmasında kullanılan antibakteriyellerin (neomisin, kanamisin, tetrasiklin) etki derecelerine göre inhibisyon zonları milimetre (mm) olarak ölçülmüş ve Çizelge 4.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. İzolatların Antibiyotik Direnç Test Sonuçları

İzolat kodu	Antibiyotiklerin zon çapları (mm)		
	Neomisin	Kanamisin	Tetrasiklin
EM-1	22	22	34
EM-2	22	19	24
EM-3	20	19	28
EM-4	23	20	19
EM-7	14	Dirençli	21
EM-8	18	19	19
EM-9	17	Dirençli	22
EM-10	45	42	15
EM-11	25	24	20
EM-12	21	20	26
EM-13	26	26	24
EM-14	35	36	32
EM-15	32	30	24
EM-16	38	36	24
EM-17	34	24	17
EM-18	24	18	8
EM-19	25	25	Dirençli
EM-20	36	34	33
EM-21	29	28	28
EM-22	27	19	23
EM-23	22	20	Dirençli
EM-24	25	25	25
EM-25	28	10	18
EM-26	25	24	23
EM-28	28	29	10
EM-29	29	22	21
EM-30	10	Dirençli	12
EM-31	34	31	28
EM-32	20	20	12
EM-33	42	40	39
EM-34	35	26	27

Çizelge 4.6. (devam)

	Antibiyotiklerin zon çapları (mm)		
İzolat kodu	Neomisin	Kanamisin	Tetrasiklin
EK-1	18	18	11
EK-2	16	17	14
EK-3	20	20	11
EK-4	41	39	40
EK-5	29	24	25
EK-6	18	Dirençli	14
EK-7	12	Dirençli	13
EK-8	30	32	19
EK-9	20	18	14
EK-10	35	35	24
EK-12	22	23	19
EK-13	28	28	28
EK-14	18	18	Dirençli
EK-15	17	21	Dirençli
EN-1	25	23	Dirençli
EN-2	30	28	19
EN-3	Dirençli	Dirençli	Dirençli
EN-4	23	19	9
EN-5	27	28	10
EN-6	23	17	17
EN-7	20	23	10
EN-8	28	26	15
EN-9	24	24	20
EN-10	22	18	18
EN-11	22	18	19
EN-12	Dirençli	Dirençli	12
IA	18	16	9
IB	40	40	33
IC	26	19	19
ID	30	24	24
IE	28	28	28

4.7. İzolatların Yağ Asit Profillerine Göre Analiz ve Tanı Sonuçları

Tez çalışmasında elde edilen izolatların yağ asit profil (FAMES) analizleri ve % tanı değerleri Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. İzolatların Yağ Asidi Tanı Sonucu ve Yüzde Tanı Değerleri

İzolat kodu	İzolatın Tanısı	Tanı yüzdesi
EM-1	<i>Bacillus psychrophilus</i>	45
EM-2	<i>Arthrobacter globiformis</i>	68
EM-3	<i>Bacillus pumilis</i>	73
EM-4	<i>Bacillus sp.</i>	24
EM-7	Tanılanamadı	-
EM-8	<i>Bacillus pumilis</i>	65
EM-9	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	65
EM-10	<i>Bacillus psychrophilus</i>	15
EM-11	Tanılanamadı	-
EM-12	<i>Bacillus megaterium</i>	45
EM-13	Tanılanamadı	-
EM-14	Tanılanamadı	-
EM-15	<i>Breibacterium epidermidis</i>	58
EM-16	<i>Bacillus megaterium</i>	65
EM-17	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	34
EM-18	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	59
EM-19	<i>Bacillus subtilis</i>	76
EM-20	<i>Bacillus atrophaeus</i>	38
EM-21	Tanılanamadı	-
EM-22	<i>Brevibacillus chosinensis</i>	36
EM-23	Tanılanamadı	-
EM-24	Tanılanamadı	-
EM-25	<i>Bacillus sp.</i>	42
EM-26	<i>Paenibacillus validis</i>	53
EM-28	<i>Bacillus megaterium</i>	40
EM-29	Tanılanamadı	-
EM-30	<i>Arthrobacter globiformis</i>	55
EM-31	<i>Bacillus sp.</i>	23
EM-32	<i>Brevibacillus centroporus</i>	29
EM-33	<i>Bacillus atrophaeus</i>	50
EM-34	<i>Bacillus atrophaeus</i>	58

Çizelge 4.7. (devam)

İzolât kodu	İzolâtın Tanısı	Tanı yüzdesi
EK-1	<i>Bacillus pumilis</i>	69
EK-2	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	70
EK-3	<i>Bacillus subtilis</i>	63
EK-4	<i>Bacillus sp.</i>	44
EK-5	<i>Kocuria rhizophila</i>	45
EK-6	<i>Bacillus coagulans</i>	50
EK-7	Tanılanamadı	-
EK-8	<i>Bacillus viscosus</i>	60
EK-9	<i>Brevibacillus centroporus</i>	28
EK-10	<i>Bacillus megaterium</i>	92
EK-12	<i>Bacillus megaterium</i>	48
EK-13	<i>Paenibacillus alvei</i>	31
EK-14	<i>Bacillus pumilis</i>	63
EK-15	<i>Bacillus licheniformis</i>	51
EN-1	<i>Bacillus pumilis</i>	44
EN-2	<i>Bacillus horikoshii</i>	59
EN-3	<i>Breibacterium epidermidis</i>	64
EN-4	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	69
EN-5	<i>Bacillus megaterium</i>	63
EN-6	<i>Bacillus megaterium</i>	62
EN-7	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	68
EN-8	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	22
EN-9	Tanılanamadı	-
EN-10	<i>Arthrobacter mysorens</i>	73
EN-11	Tanılanamadı	-
EN-12	<i>Breibacterium epidermidis</i>	80
IA	<i>Halomonas aquamarina</i>	44
IB	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	31
IC	<i>Brevibacillus chosinensis</i>	29
ID	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	62
IE	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	21
IF	<i>Bacillus atrophaeus</i>	63

Çizelge 4.8. Sherlock 6.0 Kütüphanelerine Göre İzolatların Yağ Asit Profilleri

	İzolatlar							
Yağ asitleri	EM1	EM2	EM3	EM4	EM7	EM8	EM9	EM10
C 11:0 iso				0,17				
C 12:0	1,93	2,43						
C 13:0 iso			0,24	0,40		0,35		0,17
C 13:0 anteiso				0,11				
C 14:0 iso	4,20	0,49	0,67	4,52	0,30	0,66	0,50	3,75
C 14:0	1,05		0,27	0,10	0,13	0,28	0,40	0,47
C 15:0 iso	9,35		47,34	37,86	1,68	49,22	10,51	4,96
C 15:0 anteiso	57,19		27,42	15,84	30,09	31,07	59,82	52,07
C 15:1 iso G					0,48			
C 15:1 anteiso A				0,42	0,58		0,13	
C 16:1 w7c alcohol	6,00		0,26	10,70		0,18		7,10
C 16:0 N alcohol				0,18				0,12
C 16:0 iso	5,15		2,69	8,49	7,40	2,39	7,02	6,13
C 16:1 w11c	2,16		0,31	0,47		0,15		1,85
C 16:0	1,73		2,04	0,36	1,85	1,61	1,87	1,70
C 16:1 iso G					5,52			
C 17:1 iso w10c			1,15	3,09		0,42		0,36
C 17: 0				0,56				0,25
C 17:0 iso	0,77		9,82	8,05	1,30	7,29	1,62	0,94
C 17:0 anteiso	7,29		6,55	4,10	38,73	5,82	17,41	12,63
C 17:1 anteiso w9c				0,41	11,05			0,18
C 17:0 10-methyl				0,25				
C 18:1 2OH							0,25	0,32
C 18:0			0,86	0,12		0,40	0,19	0,21
C 18: 0 iso				1,21	0,16		0,12	0,39
C 19: 0 iso				0,65				
C 19:0 anteiso				0,20	0,51		0,13	0,20
C 20:0 iso				0,14				
C Summed Feature 3					0,23			
C Summed Feature 4	3,19		0,37	1,49				6,20
C Summed Feature 8						0,16		

Çizelge 4.8. (devam)

	İzolatlarda							
Yağ asitleri	EM11	EM12	EM13	EM14	EM15	EM16	EM17	EM18
C 11:0 iso							0,59	0,17
C 11:0 anteiso								0,15
C 12:0	3,86	3,85			0,79	2,01	2,22	0,25
C 12:0 iso								0,13
C 13:0 iso	1,13		0,54				18,46	13,36
C 13:0 anteiso				0,18	0,24		13,88	10,34
C 14:0 iso	1,54	8,05	1,77	6,23	1,18	4,67	0,44	0,49
C 14:0		0,88	0,28	3,06	0,75	1,01	1,34	0,66
C 14:0 iso 3OH							0,70	0,16
C 14:0 iso 2OH							0,50	0,13
C 15:0 iso	46,50	51,85	44,29	6,89	10,61	15,81	13,45	16,43
C 15:0 anteiso	7,72	24,08	7,78	21,26	61,14	59,91	28,72	33,63
C 15:1 anteiso A				0,46				
C 16:1 w7c alcohol	5,37	3,61	5,40	4,14		3,62		
C 16:0 N alcohol	1,05		0,34	11,35				
C 16:0 iso	2,40	1,89	3,93	9,56	2,67	1,90	0,83	0,63
C 16:1 w11c	2,93	0,77	1,98	4,33		1,67		
C 16:0	1,67		0,95	20,18	1,87	1,19	1,12	1,08
C 16:1 iso G								
C 17:1 iso w10c	10,26					0,55	1,28	0,17
C 17: 0				1,83				
C 17:0 iso	2,39	2,19	4,08	2,09	1,17	0,68	5,57	9,48
C 17:0 anteiso	3,74	1,84	6,31	4,00	18,66	3,66	6,65	6,57
C 17:1 anteiso w9c								0,45
C 17:1 iso w10c			13,95					
C 17:0 10-methyl				0,15				
C 18:1 w9c			0,62		0,43		0,99	
C 18:1 2OH				0,26				
C 18:0	1,12		0,34	1,69	0,51		0,71	1,48
C 18: 0 iso				0,29				0,20
C 18:3 w6c(6,9,12)				0,72				
C 19: 0 iso							0,85	2,31
C 19:0 anteiso							0,45	0,98
C 20:1 w9c							0,37	0,21
C 20:2 w6,9c								0,55
C Summed Feature 3				0,95				
C Summed Feature 4	8,32	0,99	7,44	0,38		3,32	0,87	

Çizelge 4.8. (devam)

Yağ asitleri	İzolatlarda							
	EM19	EM20	EM21	EM22	EM23	EM24	EM25	EM26
C 10:0					0,62			
C 10:0 3 OH					0,15			
C 12:0				2,28	1,59			
C 12:0 3 OH					10,28			
C 13:0 iso						0,48	0,14	
C 13:0 anteiso		0,21		0,57				
C 14:0 iso	1,28	0,74	0,20	8,38		0,91	3,58	4,12
C 14:0		0,21		0,47	0,72	0,26		1,19
C 15:0 iso	33,15	5,45	3,35	1,78		33,95	36,33	12,98
C 15:0 anteiso	37,62	55,52	21,31	74,97	0,17	9,34	20,31	51,00
C 15:1 iso G			0,48					
C 15:1 iso w9c							0,23	
C 15:1 anteiso A			0,35				0,17	
C 15:0 iso 3 OH	0,48							
C 16:1 w7c alcohol	0,60	2,72		0,74		5,97	11,49	3,91
C 16:0 N alcohol		2,72				0,39		
C 16:0 iso	2,44		8,14	3,07		4,48	5,95	6,12
C 16:1 w11c	0,86	1,10				2,51	0,62	2,33
C 16:1 w5c					0,17	1,21		
C 16:0	1,09	1,12	2,26	0,86	21,34		0,28	2,98
C 16:1 iso G			4,34					
C 17:1 iso w10c		0,76				13,24	3,71	
C 17: 0			0,29		0,30		0,60	
C 17:0 iso	7,82	1,93	3,00		0,22	5,02	6,56	1,70
C 17:0 anteiso	8,41	20,21	44,79	6,46	0,20	10,17	5,14	9,17
C 17:0 10-methyl						0,28	0,27	
C 17:1 anteiso w9c			10,27				0,70	
C 17:1 iso w10c	4,54							0,39
C 17: 0 cyclo					7,86			
C 18:1 w9c						0,45		0,30
C 18:1 2OH								0,80
C 18:0					0,34			0,68
C 18: 0 iso			0,23				0,57	
C 18:1 w7c 11-methyl					0,32			
C 19:0 anteiso		0,14	0,64				0,14	
C 19:0 cyclo w8c					13,52			
C 19:0					0,17			
C 19: 0 iso							0,39	
C 20:2 w6,9c					0,25			
C Summed Feature 3			0,35		9,18			
C Summed Feature 4	1,70	7,18		0,43		11,35	2,85	2,32
C Summed Feature 8					32,34			

Çizelge 4.8. (devam)

	İzolatlarda						
Yağ asitleri	EM28	EM29	EM30	EM31	EM32	EM33	EM34
C 10:0					0,72		
C 12:0	3,67		3,19		0,53		
C 13:0 iso		0,22		0,28		0,16	
C 13:0 anteiso				0,21			
C 14:0 iso	6,24	1,50		2,64	9,69	0,50	0,82
C 14:0	0,74	0,30	0,64	2,35	0,80	0,15	0,22
C 15:0 iso	53,65	45,09	7,87	17,34	9,77	3,73	10,95
C 15:0 anteiso	20,69	8,20	71,15	37,17	33,58	53,70	54,00
C 16:1 w7c alcohol	2,55	5,54		1,59	9,77	1,57	2,96
C 16:0 N alcohol		0,50					
C 16:0 iso	2,51	4,83	3,56	2,43	8,45	2,65	4,49
C 16:1 w11c	0,91	2,42		9,82	2,67	0,57	0,79
C 16:0	1,19	1,13	1,08	11,58	2,39	1,36	1,47
C 17:1 iso w10c	0,72	12,60		0,41		0,55	
C 17: 0				2,67	2,37		
C 17:0 iso	4,22	4,13	0,69	1,42	3,04	1,99	2,64
C 17:0 anteiso	2,29	6,10	11,82	6,48	3,99	27,03	16,96
C 17:1 anteiso A							1,60
C 17:1 anteiso w9c				0,64			
C 17:1 iso w10c					1,41		0,15
C 17:0 10-methyl		0,16			0,49		
C17:1 w9c					3,51		
C 18:1 w9c		0,38		0,24	1,69		0,19
C 18:1 2OH				1,00			0,17
C 18:0		0,44		0,74	1,27		
C 18: 0 iso					1,30		
C 19:0				0,21			
C 19:0 anteiso						0,25	
C Summed Feature 2							0,20
C Summed Feature 3							0,68
C Summed Feature 4	0,62	6,47		0,78	2,57	5,77	1,71

Çizelge 4.8. (devam)

Yağ asitleri	İzolatlarda							
	EK1	EK2	EK3	EK4	EK5	EK6	EK7	EK8
C 11:0 iso		0,23						
C 11:0 anteiso		0,19						
C 12:0 iso		0,23						3,91
C 12:0		0,30			5,57			
C 13:0 iso	0,51	13,50	0,58	0,30				
C 13:0 anteiso	0,20	9,41						
C 14:0 iso	0,91	0,52	1,24	11,31	1,32	0,36		4,92
C 14:0	0,33	0,79		0,50		0,12		1,35
C 14:0 iso 2OH		0,17						
C 14:0 iso 3 OH		0,25						
C 15:0 iso	48,27	15,25	36,71	31,30	20,08	4,95	2,15	11,77
C 15:0 anteiso	28,21	31,74	37,75	23,79	56,24	37,07	12,07	62,12
C 15:1 iso G							0,30	
C 15:1 anteiso A						0,26	0,21	
C 15:0 iso 3 OH	0,12							
C 16:1 w7c alcohol	0,15		0,84	15,62				3,51
C 16:0 iso	3,24	0,97	2,33	4,29	2,04	6,58	7,72	1,70
C 16:1 w11c	0,17		0,80	2,75				2,35
C 16:0	1,68	1,04	0,89	0,95	1,75	1,19	1,21	1,36
C 16:1 iso G							3,40	
C 17:1 iso w10c	0,48		3,89	1,26				
C 17: 0							0,48	
C 17:0 iso	9,57	9,57	6,39	2,52	2,45	5,65	4,31	
C 17:0 anteiso	5,97	7,24	7,06	2,73	8,87	43,08	54,72	4,05
C 17:1 anteiso w9c							11,45	
C 17:1 iso w10c		0,20						
C 17: 0 3OH							0,15	
C 18:1 w9c		0,55						
C 18:1 2OH				0,53		0,14		
C 18:0		1,54				0,20	0,21	
C 18: 0 iso		0,35		0,24		0,15	0,67	
C 19: iso		3,10						
C 19:0 anteiso		1,54				0,26	0,95	
C 20:1 w9c		0,33						
C 20:0		1,00						
C Summed Feature 4	0,18		1,52	1,91	1,71			2,95

Çizelge 4.8. (devam)

	İzolatlار							
Yağ asitleri	EK9	EK10	EK12	EK13	EK14	EK15	EN1	EN2
C 10:0	0,56							
C 12:0	0,36		5,08	1,52				2,62
C 13:0 iso		0,79	1,75		0,42			
C 13:0 anteiso			1,22					
C 14:0 iso	8,63	6,54	1,53	0,77	0,61	0,68	0,72	0,54
C 14:0	0,55	1,76	1,52	1,78	0,22		0,20	0,82
C 15:0 iso	9,67	38,60	45,50	20,57	58,04	40,85	42,81	37,27
C 15:0 anteiso	34,41	41,40	33,32	42,79	26,32	27,28	25,61	6,16
C 15: 0 iso 3OH						0,43		
C 15:0 2OH						0,41		
C 16:1 w7c alcohol	8,89	0,81			0,16	0,38	0,34	2,99
C 16:0 N alcohol							3,36	1,05
C 16:0 iso	8,89	1,62	2,24	1,70	1,77	3,54	0,28	2,92
C 16:1 w11c	2,44	1,85		2,06	0,17			5,08
C 16:0	1,61	2,61	1,31	10,76	1,04	1,95	1,65	2,92
C 17:1 iso w10c	1,51			0,98	0,53	1,17	1,11	12,98
C 17: 0	2,98							
C 17:0 iso	3,67	1,42	2,90	4,55	6,76	12,00	12,78	5,95
C 17:0 anteiso	4,78	2,59	3,65	8,07	3,80	9,94	9,42	6,87
C 17:1 anteiso w9c	3,52							
C 17:0 10-methyl	0,58							
C 18:1 w9c	1,17			2,45				1,04
C 18:0	0,65			1,14		0,67	0,23	0,72
C 18: 0 iso	1,81							
C 18:3 w6c(6,9,12)								0,83
C 19: iso	0,31							
C 19:0 anteiso	0,41							
C Summed Feature 4	2,46			0,87	0,16	0,70	0,52	9,26

Çizelge 4.8. (devam)

	İzolatlar							
Yağ asitleri	EN3	EN4	EN5	EN6	EN7	EN8	EN9	EN10
C 11:0 iso		0,21			0,21		0,63	
C 11:0 anteiso		0,18			0,15			
C 12:0		0,58			0,24			2,60
C 12:0 iso		0,23			0,24		4,30	
C 13:0 iso		11,61	0,47		11,47	0,21	13,83	0,36
C 13:0 anteiso		7,66	0,63	0,51	6,88		18,78	0,42
C 14:0 iso	0,40	0,50	5,60	3,50	0,52	8,03	0,87	4,35
C 14:0	0,27	0,95	2,35	1,52	0,72	0,16	0,45	2,16
C 15:0 iso	6,74	14,83	28,03	14,18	15,65	30,14	15,93	18,88
C 15:0 anteiso	54,72	32,21	44,27	59,75	33,18	30,41	1,73	56,88
C 14:0 iso 3OH					0,13			
C 14:0 2OH					0,09			
C 16:1 w7c alcohol			1,12		0,07	0,59	1,13	
C 16:0 N alcohol							0,30	
C 16:0 iso	3,78	1,20	3,87	5,56	1,32	9,77	3,81	4,11
C 16:1 w11c			1,63		0,16		2,98	
C 16:0	2,23	1,64	3,16	6,22	1,12	1,69	5,94	4,62
C 17:1 iso w10c		0,75			0,88	0,18	4,52	
C 17:0 iso	1,80	10,35	1,29	1,62	10,93	8,55	18,65	1,28
C 17:0 anteiso	29,24	8,67	7,13	6,67	8,63	10,07	3,76	3,89
C 17:0 10-methyl		0,15						
C 18:0 iso		0,38					0,31	
C 18:1 w9c		1,34		0,47	1,24	0,21	0,84	
C 18:1 2OH	0,29							
C 18:0	0,40	1,58			1,12		0,64	
C 19: iso		2,24			2,11			
C 19:0 anteiso	0,33	1,17			1,02			
C 20:1 w9c		0,80			0,76			
C 20:0		0,57			0,46			

Çizelge 4.8. (devam)

Yağ asitleri	İzolatlar							
	EN11	EN12	IA	IB	IC	ID	IE	IF
C 10:0			0,26					
C 10:0 3OH			0,13					
C 11:0 3OH			0,16					
C 12:0			0,63	4,05	3,91	2,27	5,10	
C 12:0 3OH			9,54					
C 13:0			0,24					
C 13:0 iso	0,69					0,47		0,15
C 13:0 anteiso					1,22	0,43		
C 14:0 iso	1,10	0,20		23,65	10,82	12,32	17,03	1,84
C 14:0	0,42	0,28	4,80	0,52		0,66		0,22
C 15:0 iso	42,30	8,53	0,09	5,84	2,39	15,52	16,67	5,33
C 15:0 anteiso	4,63	57,21		31,76	66,90	39,26	33,80	49,53
C 15:1 w8c			0,10	6,05	2,69	8,67	4,10	
C 15:1 anteiso A								0,11
C 16:1 w7c alcohol	2,93							3,06
C 16:0 N alcohol	0,62			3,47		0,44	5,64	1,00
C 16:0 iso	4,57	4,27		11,07	2,57	7,87	6,68	7,41
C 16:1 w11c	3,37			0,81	0,72	1,67	0,91	0,99
C 16:1 w15c			0,12					
C 16:0		1,79	16,85	1,46	0,89	1,42	1,59	2,70
C 17:1 iso w10c	15,95							0,21
C 17:0 iso	7,25	1,80	0,21	1,48		1,57	2,03	2,73
C 17:0			0,99	5,32	5,93	3,20	3,58	0,20
C 17:0 anteiso	6,66	25,14		0,68		0,98		21,46
C 17:1 w8c			0,47					
C 17:1 w6c			0,46					
C 17:1 anteiso A								0,33
C 18:0 iso		0,09						0,15
C 18:1 w9c	0,44							
C 18:1 2OH		0,26						0,18
C 18:0	0,25	0,23	0,25					0,18
C 19:0 anteiso		0,21		0,98				
C Summed Feature 1			0,22					
C Summed Feature 2				0,65		0,97		
C Summed Feature 3		13,79				1,47		0,15
C Summed Feature 4	6,33			0,95	1,29	0,83		2,08
C Summed Feature 8			50,70					

4.9. İzolatların 16S rRNA BLAST Sonuçları

Tuz toleransları belirlenen 63 bakteri izolatının 16S rDNA genlerinin baz dizileri belirlenmiş ve diziler Gen bankasında var olan 16S rDNA gen dizileri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar sonucunda elde edilen tanı sonucu, yüzdesi, Genbank numarası ve nükleotid sayısı Çizelge 4.9’de verilmiştir. Ayrıca bu izolatların 16S rRNA gen bölgelerinin baz sıraları da EK 1-63’te verilmiştir.

Çizelge 4.9. İzolatların 16S rRNA BLAST Sonuçları

İzolat kodu	Gen Bank Numarası	Nükleotit Sayısı*	Benzerlik Oranı (%)**	En Yakın Filogenetik Grup
EM-1	KF495094	1110	99	<i>Marinibacillus sp.</i>
EM-2	KF495095	1109	99	<i>Zhihengliuella halotolerans</i>
EM-3	KF495096	1078	99	<i>Bacillus pumilus</i>
EM-4	KF499273	877	99	<i>Nesterenkonia xinjiangensis</i>
EM-7	KF499274	1037	99	<i>Halobacillus sp.</i>
EM-8	KF499275	711	99	<i>Promicromonospora sp.</i>
EM-9	KF499276	1085	99	<i>Bacillus horikoshii</i>
EM-10	KF499277	941	99	<i>Bacillus sp.</i>
EM-11	KF499278	1150	99	<i>Bacillus horikoshii</i>
EM-12	KF499279	1163	99	<i>Bacillus patagoniensis</i>
EM-13	KF499280	1300	98	<i>Bacillus sp.</i>
EM-14	KF499281	1037	99	<i>Halobacillus sp.</i>
EM-15	KF499282	1190	98	<i>Terribacillus saccharophilus</i>
EM-16	KF499283	1028	100	<i>Jeotgalibacillus campisalis</i>
EM-17	KF499284	1136	99	<i>Staphylococcus succinus</i>
EM-18	KF499285	920	96	<i>Staphylococcus succinus</i>
EM-19	KF499286	1020	99	<i>Bacillus sp.</i>
EM-20	KF499287	1114	99	<i>Oceanobacillus picturae</i>
EM-21	KF499288	1056	99	<i>Bacillus sp.</i>
EM-22	KF499289	1104	99	<i>Virgibacillus picturae</i>
EM-23	KF499290	1102	99	<i>Halomonas neptunia</i>
EM-24	KF499291	1107	100	<i>Bacillus sp.</i>
EM-25	KF499292	701	99	<i>Halobacillus sp.</i>
EM-26	KF499293	1100	99	<i>Oceanobacillus profundus</i>
EM-28	KF499294	1109	100	<i>Bacillus patagoniensis</i>
EM-29	KF499295	1175	99	<i>Bacillus sp.</i>
EM-30	KF499296	1088	99	<i>Zhihengliuella salsuginis</i>
EM-31	KF499297	1284	99	<i>Gracilibacillus sp.</i>

* Eşleştirme için kullanılan 16S rRNA nükleotid sayısı

** En yakın filogenetik türün 16S rRNA dizisi ile benzerlik oranı

Çizelge 4.9. (devam)

İzolat kodu	Gen Bank Numarası	Nükleotit Sayısı*	Benzerlik Oranı (%)**	En Yakın Filogenetik Grup
EM-32	KF499298	803	99	<i>Planococcus sp</i>
EM-33	KF499299	1100	99	<i>Halobacillus sp.</i>
EM-34	KF499300	1001	99	<i>Thalassobacillus devorans</i>
EK-1	KF499301	1217	100	<i>Bacillus pumilus</i>
EK-2	KF499302	1000	99	<i>Staphylococcus succinus</i>
EK-3	KF499303	733	99	<i>Bacillus atrophaeus</i>
EK-4	KF499304	867	98	<i>Bacillus sp.</i>
EK-5	KF499305	1236	99	<i>Bacillus subtilis</i>
EK-6	KF499306	1066	99	<i>Microbacterium sp.</i>
EK-7	KF499307	1059	99	<i>Nesterenkonia sp.</i>
EK-8	KF499308	702	98	<i>Jeotgalibacillus sp.</i>
EK-9	KF499309	911	99	<i>Planococcus sp.</i>
EK-10	KF499310	1085	99	<i>Bacillus megaterium</i>
EK-12	KF499311	1004	99	<i>Promicromonospora sp.</i>
EK-13	KF499312	1083	99	<i>Bacillus agaradhaerens</i>
EK-14	KF499313	1406	99	<i>Bacillus pumilus</i>
EK-15	KF499314	792	99	<i>Bacillus sp.</i>
EN-1	KF514117	898	98	<i>Bacillus sp.</i>
EN-2	KF514118	824	99	<i>Bacillus sp.</i>
EN-3	KF514119	992	99	<i>Zhihengliuella halotolerans</i>
EN-4	KF514120	967	99	<i>Staphylococcus succinus</i>
EN-5	KF514121	1288	99	<i>Bacillus sp.</i>
EN-6	KF514122	960	99	<i>Bacillus gibsonii</i>
EN-7	KF514123	1045	99	<i>Staphylococcus succinus</i>
EN-8	KF514124	1080	99	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>
EN-9	KF514125	1039	99	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>
EN-10	KF514126	722	100	<i>Bacillus gibsonii</i>
EN-11	KF514127	1009	99	<i>Bacillus atrophaeus</i>
EN-12	KF514128	1080	99	<i>Zhihengliuella sp.</i>
IA	KF514129	1062	99	<i>Halomonas sp.</i>
IB	KF514130	941	98	<i>Virgibacillus picturae</i>
IC	KF514131	1000	99	<i>Oceanobacillus sp.</i>
ID	KF514132	1108	99	<i>Thalassobacillus sp.</i>
IE	KF514133	1060	99	<i>Halobacillus sp.</i>
IF	KF514134	1113	99	<i>Halobacillus sp.</i>

* Eşleştirme için kullanılan 16S rRNA nükleotit sayısı

** En yakın filogenetik türün 16S rRNA dizisi ile benzerlik oranı

5. TARTIŞMA

Tarımsal arazi olarak kullanılan toprakların giderek azalması ciddi bir problem olup bu problemin çözülmesi hayati önem arz etmektedir. Toprakta sorun teşkil eden faktörler birbirinden farklı olmakla birlikte genellikle toprakların içeriğine, orijinine, bölgenin eğimine, yeraltı sularının seviyesine, iklimine ve jeolojik faktörlere bağlıdır. Endüstriyel uygulamalar veya tarımsal uygulamalar, toprakların çok asidik, alkali veya tuzlu olmalarına neden olur. Günümüz toprak sorunlarının başında ise tuzluluk ve sodiklik gelir. Bu sorun sulanan alanların genelinde mevcut olup son yıllarda tarım alanı olarak kullanılmadığı için sulanmayan alanlarda da oluşmaya başlamıştır. İyileştirilmesi gereken yüksek tuz içerikli alkali ve asidik topraklarda en çok kullanılan kimyasal maddelerden birisi jipstir (Sandoval *et al.* 2013). Bu kimyasal madde geçmişte olduğu gibi günümüzde de kullanılmaya devam edilmekte olup, son dönemde Şili'nin tuzlu bir bölgesinde yapılan bir çalışmada jips ve CaCO_3 bileşikleri tuzlu toprakların iyileştirilmesinde kullanılmışlardır. Söz konusu çalışmada jips'in CaCO_3 bileşiğinden daha etkili olduğu belirlenmiş ve jips'in uygulandığı toprakların Na^+ içeriğini ve EC değerini düşürdüğü, diğer taraftan pH değerini 4,83'ten 6,27'ye çıkarttığı rapor edilmiştir (Sandoval *et al.* 2013).

Benzer şekilde İran da tuzlu toprakların iyileştirilmesinde jips uygulanarak sorunlu topraklarda ekilen buğday bitkisinin azot, fosfor, kalsiyum, potasyum ve demir içeriğinin arttığı görülmüştür (Rasouli *et al.* 2013). Sri Lanka'da ise jips, dolomit, pirinç sapı-tarçın kökleri gibi farklı uygulamalarla tuzlu toprakların iyileştirilmesi amaçlanmış ve uygulama sonucunda jips ve pirinç sapı-tarçın kökleri karışımının ürün veriminde kaydadeğer iyileştirme sağladıkları gözlemlenmiştir (Reichenauer *et al.* 2013). Diğer taraftan, kimyasal iyileştirici olarak jips kullanımının bazı dezavantajlarının olduğu belirlenmiştir. Örneğin, toprağa uygulanan jipsin düşük eriyebilirliği nedeniyle etkinliğinin sınırlandığı, ayrıca uygulama sonrasında yüksek miktarlarda sulama suyuna ihtiyaç duyulduğu ve iyileştirme sürecinin çok uzun bir periyotta gerçekleştiği belirlenmiştir (Silveira *et al.* 2008). Jipsin topraktaki çözünürlüğünün arttırılması için toprağa sülfürik asit, hidroklorik asit ve nitrik asit gibi kimyasal maddelerin eklenmesi

gerektiğinden, bu işlemler sonrası toprakların bolca yıkanması gerekmektedir. Bu uygulamaların çok yüksek maliyet gerektirmesi, sınırlı bütçeleri olan çiftçilerin benzer kimyasal maddeleri etkin kullanımlarını engellemektedir. Sorunlu toprakların iyileştirilmesinde kimyasal maddelerin tercih edilmeme sebeplerinden biri de toprağa eklenen her kimyasal maddenin toprak ekosistemine zarar vermesidir (Chen 2006).

Tuzlu toprakların ıslahında kullanılan yöntemlerinden bir diğeri ise yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı toleranslı halofit bitkilerin kullanılmasıdır. Bu bitkiler, tuzlu topraklarda hayatta kalmak için dış çevrelerinde fazla miktarda bulunan Na^+ ve Cl^- iyonlarını alıp yapraklarında biriktirerek tuzluluğa karşı önlem alırlar. Topraktan aldıkları iyonları hücre vakuollerinde tutarak hem sitoplazma ve organellerinin tuzdan etkilenmesini engellerler hem de dış ortamdaki düşük osmotik potansiyel sonucu oluşan şartlarda bünyelerine su alımını kolaylaştırırlar (Munns and Tester, 2008). Yapılan birçok çalışmada *Nitraria*, *Kalidium foliatum*, *Suaeda salsa* L. *Atriplex centralasi* ve *Lycium barbarum* bitki türlerinin topraktan tuzları absorbe edebildikleri gösterilmiştir (Zhao *et al.* 2002; Luo 2005). Sen and Kasera (2001) yaptıkları bir çalışmada yüksek tuzluluk koşullarında büyüyen bazı bitki türlerinin yapraklarında biriktirdikleri iyonların analizini yapmışlardır. Bu analizlerde incelenen bitki türlerinin gram yaprak başına biriktirilen miligram Na^+ iyon içeriklerinin birbirlerinden farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (*Aeluropus lagopoides* (55-100 mg/gr), *Cressa cretica* (20-110 mg/gr), *Salsola baryosma* (44-291 mg/gr), *Sesuvium sesuvioides* (16-100 mg/gr), *Sporobolus helvolus* (7-70 mg/gr), *Suaeda fruticosa* (43-313 mg/gr), *Trianthema triquetra* (29-115 mg/gr) ve *Zygophyllum simplex* (42-105 mg/gr). Bitki temelli toprak iyileştirme yaklaşımları son yıllarda da çalışılmaktadır. Buna örnek olarak İsrail’de ateş topu (*Bassia*) bitkisiyle yapılan bir çalışma gösterilebilir. Söz konusu çalışmada topraktaki aşırı miktarlardaki Na^+ ve K^+ gibi iyonların ateş topu bitki yapraklarında toplandığı rapor edilmiştir (Shelef *et al.* 2012).

Benzer şekilde Çin’nin batı bölgesinde yapılan bir çalışmada *Alfalfa* bitkisinin tuzlu bir bölgeye ekimi yapılmış ve 5 yıl süreyle toprak profili analiz edilmiştir. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde 5 yıl boyunca toprak profilindeki tuz içeriğinin kademeli olarak

azaldığı rapor edilmiştir (Coa *et al.* 2012). Almanya’da yapılan bir çalışmada ise darı (*Panicum*) bitkisinin orta derecede tuzlu toprakların iyileştirilmesinde kullanılabileceği rapor edilmiştir (Koyro *et al.* 2013). Tayland’ın tuzlu bir bölgesinde soya (*Glycine max*), uzun zambak (*Typha angustifolia*) ve ayı pençesi (*Acanthus ebracteatus*) bitkilerinin tuzu topraktan uzaklaştırma potansiyelleri araştırılmış ve söz konusu bitkilerden iyileştirme potansiyelleri anlamında kayda değer sonuçlar elde edilmiştir (Boonsaner and Haweker 2012).

Tuzlu ortamlara uyum sağlayan halofit bitkilerin bir diğer özelliği ise metabolizmaları sonucu oluşturdıkları CO₂’tir. Oluşan CO₂ ortamda bulunan CaCO₃ gibi bileşiklerin çözünmesini sağlayarak toprağın fiziksel olarak iyileştirilmesine neden olmaktadır. Bu amaçla kireçli-sodik topraklarda yapılan bir çalışmada arpa (*Hordeum vulgare*), yonca (*Medicago sativa*), pamuk (*Gossypium hirsutum*), uzun buğday otu (*Agropyron elongatum*) ve sorgum-sudan otu (*Sorghum sudanense*) bitkilerinin toprağı iyileştirme yetenekleri test edilmiş ve çalışma sonucunda bu bitkilerin topraktaki nispi CO₂’i arttırdıkları gösterilmiştir (Ma *et al.* 2013). Benzer şekilde yapılan başka bir çalışmada, uzun otlak ayrığının ve uzun buğday otunun (*Agropyron elangatum*) güçlü köksel gelişimi sayesinde toprağın fiziksel olarak iyileştirilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Ma *et al.* 2013).

Kimyasal uygulamalarda gözlemlenen dezavantajlara benzer şekilde halofit bitkilerin kullanımında da, tarımsal alanlara istenilen ürünlerin ekilememesi ve ekilebilir türlerin sınırlı olması gibi dezavantajlar söz konusudur. Bundan dolayı mevcut problemlerin daha hızlı ve etkili şekilde çözülmesi, olası toprak bağlantılı diğer problemlerin de çözülmesini kolaylaştıracaktır. Bu amaçla birçok hayati konuda kilit rol oynayan mikroorganizmaların kullanımı önem arz etmektedir.

Toprak mikroorganizmaları toprak verimliliğinin ve dolayısıyla bitki besinlerinin sağlanmasında hayati öneme sahiptir (Jeffries *et al.* 2003). Toprak mikroorganizmaları ayrıştırma yapmalarının yanı sıra, besinleri immobilize etme, mineralizasyon, besinlerin alınımı ve döngüsü gibi birçok aktiviteyle besinlerin kullanılabilirliğini önemli derecede

etkilerler. Farklı birçok bakteri ve küfün çözünemeyen besin maddelerini çözünebilir forma dönüştürdükleri ve besinlerin bitkiler tarafından alınımını artırdıkları bilinmektedir (Rodriguez and Fraga 1999; Zahir *et al.* 2004; Vassilev *et al.* 2012). Ayrıca mikroorganizmalar hücre materyalleri ve salgılarıyla yaptıkları yapıştırma ve ayrıştırma özellikleriyle toprak agregat kararlılığında rol oynadıkları için toprağın fiziksel özelliğini de iyileştirirler (Wright and Upadhyaya 1998; Miller and Jastrow 2000; Ghany *et al.* 2010). Toprak mikroorganizmaları bitki gelişimini engelleyen organik ve inorganik maddeleri detoksifiye etmeleriyle de bitki gelişimini olumlu yönde etkilerler (Bollag *et al.* 1992; Dalal 1998; Meryem and Yasmin 2013).

Tuzluluğun bitki büyümesi ve gelişimi üzerine inhibitör etkisinin bakteriler tarafından azaltıldığı konusunda birçok çalışma mevcuttur (Parida and Das 2005; Turan *et al.* 2009). Tuzluluk gibi birçok çevresel faktörün farklı bitki çeşitlerinde etilen seviyesini artırdığı bilinmektedir (Parida and Das 2005; Zhang *et al.* 2011). Tuzlu şartlarda büyüyen bitkilerle normal şartlarda büyüyen bitkiler karşılaştırıldığında, tuz stresi altındaki bitkilerin fizyolojilerinin önemli ölçüde tuz stresiyle değiştiği ve gözlemlenen bu değişimlerin (osmolitlerin ve antioksidantların üretimi) artan etilen seviyesinin ikincil etkileri olabileceği düşünülmektedir (Parker *et al.* 2006; Turan *et al.* 2009). Yapılan bir çalışmada tütün bitkisinde etilen genini kodlayan reseptörün tuz tarafından belirgin şekilde teşvik edildiğinin gösterilmesi de bu görüşü güçlendirmektedir (Zhang *et al.* 2001; Cao *et al.* 2006). Eğer etilen gerçekten bir stres sinyali olarak bitkideki tuz stresi ile ilgili genleri aktive edebiliyorsa tuz stresi altındaki bitkinin etilen seviyesi azaltılarak bitkinin tuz stresi cevabını ayarlamak mümkün olabilir (Mayak *et al.* 2004; Chen *et al.* 2013). Bu anlamda, ACC deaminaz enzimine sahip bakterilerin tüm stres faktörlerine maruz kalmış bitkilerin etilen seviyesini düşürerek aynı zamanda etilenin engelleyeceği diğer inhibisyonları önleyebileceği sonucuna varılabilir (Mayak *et al.* 2004; Marques *et al.* 2010). Mayak *et al.* (2004) İsrail’de kuruyan bir nehirden aldığı toprak örneklerindeki bakterileri karakterize etmiş ve ACC deaminaz enzimine sahip *Achrobacter piechaudii* izolatını, tuz stresi nedeniyle etilen seviyesi artmış domates bitkisine uygulamışlardır. Bu çalışma sonucunda, uygulamanın etilen seviyesini

azalttığını ve 200 mM yoğunluğundaki tuz şartlarında büyüyen bitkide kök ve gövde büyümesini önemli derecede arttırdığını tespit etmişlerdir.

Daha sonraki yıllarda Hindistan, Çin ve Kanada gibi ülkelerde birçok bilim insanı ACC deaminaz enzimine sahip bakterilerin yüksek tuz şartlarındaki mısır, yer fıstığı, pamuk kanola gibi bitkilerin büyümesini teşvik etmedeki rolünü laboratuvar şartlarında yaptıkları denemelerle rapor etmişlerdir (Saravanakumar and Samiyappan 2006; Cheng *et al.* 2007; Nadeem *et al.* 2007; Yue *et al.* 2007). Sonraki araştırmalarda ise ACC deaminaz aktivitesine sahip bakterilerin bu teşvik edici etkisinin sadece laboratuvar şartlarında değil, aynı zamanda tarla ve sera şartlarında da geçerli olduğu gösterilmiştir (Cheng *et al.* 2007). Son zamanlarda yapılan bir çalışmayla tuz şartlarındaki domates bitkisinin etilen seviyesinin artışı engellemek için CoCl_2 ve NiCl_2 gibi etilen inhibitörleri kullanılmış fakat yüksek tuz konsantrasyonunun oluşturduğu negatif etkilerin ve diğer fizyolojik parametrelerin kullanılan kimyasal etilen inhibitörleriyle giderilemediği tespit edilmiştir (Shibli *et al.* 2007). Söz konusu çalışmada etilen inhibitörleri ile bakterilerin ACC deaminazın oluşturduğu farklı etkinin, bakterilerle bitki mikrokökleri arasındaki ilişkiyle bağlantılı olduğu sonucuna varılmıştır. PGPR bakterileriyle yapılan başka çalışmalarda *Azospirillum lipoferum* ve *Azospirillum brasilense* bakterilerinin tuzlu şartlarda buğday, mısır, fasulye, marul gibi bitkilerde oluşan zararlı etkileri ACC deaminaz enziminin aktivitesiyle değil de IAA aktivitesiyle azalttıkları gösterilmiştir (Rabie and Almadini 2005; Barassi *et al.* 2006). Bu durum; kimyasal etilen inhibitörlerinin tuz stresine yeterince cevap verememe nedenlerini açıkça ortaya koymaktadır.

Hindistan'da hiroponik ve toprak şartlarında yapılan bir çalışmada *Bacillus amylolquefaciens* NBRISN13 izolatının tuz şartlarında pirinç bitkisinin büyümesini, tuz toleransını ve 14 genin ekspresyonunu arttırması mikroorganizmaların bu problemin çözümündeki yerini sağlamlaştırmaktadır (Nautiyal *et al.* 2013).

Halofilik bakterilerin toprak veya bitki büyümesini iyileştirmesinde kullanımı ile ilgili mevcut çalışmalar değerlendirildiğinde ilginç sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Örneğin, bu

Çalışmaların biri halofilik bakterilerin tuz şartlarına tolerans göstermelerini sağlayan ektoin bileşiğiyle ilgilidir. Söz konusu çalışmada ektoin maddesini sentezleme yeteneğindeki *Halomonas elongata* bakterisinin ektoin sentezleme geni tütün bitkisine aktarılmış ve tütün bitkisinin tuz toleransını arttırdığı rapor edilmiş ve abiyotik streslere adaptasyonlarını arttırdığını gösterilmiştir.

Bitkilerdeki tuz stresinin ya da toprak sodikliğinin en efektif çaresi olarak görülen halofilik mikroorganizmalarla ilgili literatürde birçok veri bulunmakla beraber, bu literatürlerin çoğu halofilik mikroorganizmaların izolasyon ve karakterizasyonla ilgilidir. Örneğin; son zamanlarda yapılan bir çalışmada *Cynodon dactylon* halofit bitki rizosfer bölgesinden alınan toprak örneklerinin, yüksek oranda tuz bulunduran NA besiyerlerine ekimleri yapılarak 9 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak tanılanması yapılmış ve bu bakterilerden birinin *Bacillus cereus* olduğu tespit edilmiştir. *B. cereus*, *Vigna radiata*, *Cicer arietinum* ve *Oryza sativa* olmak üzere 3 farklı bitki tohumu ile inkübe edildiğinde, bu bakterinin bitki boy uzaması, yaprak sayısı, yaprak uzunluğu, kök ve gövde biyokütlesi artışına olumlu etki ettiği rapor edilmiştir (Chakraborty *et al.* 2011).

Benzer şekilde Hindistan'ın tuzlu bölgelerinde izole edilen 84 bakteri izolatından 5'inin %20 tuz konsantrasyonunda büyüyebilme yeteneğinde olduğu saptanmıştır. Bu yüzden, bu izolatlar IAA, HCN, siderofor retimi, ACC deaminaz aktivitesi ve fosfat çözme yetenekleri bakımından incelenerek 16S rDNA sekansları yapılmıştır. Sekans verileri değerlendirildiğinde bu bakterilerin *Bacillus* ve *Hallobacillus* cinslerine ait türler oldukları tespit edilmiştir. *Bacillus* ve *Hallobacillus* olarak tanılanan bu bakteriler tuzlu şartlarda buğday bitkisiyle inoküle edilmiş ve inokülasyon sonucunda kontrole göre bu 5 izolatın bitki kök gelişimini %71.7 oranında arttırdığı tespit edilmiştir (Ramadoss *et al.* 2013).

Dolayısıyla ister işlenmeyen ister tarımsal üretim yapıldığı topraklar olsun, ekosistemlerin sürdürülebilirliği genel olarak mikroorganizmalarının aracılık ettiği besin akışına bağlıdır (Chen *et al.* 2003).

Sorunlu bir toprağın iyileştirilmesinde toprağa kendi yapısında olan mikroorganizmaların kullanımının iyileştirmede hangi yöntem kullanılıyorsa kullanılsın avantaj sağlayacağı şüphe götürmeyen bir gerçektir. Çünkü kullanılan yöntem ister kimyasal bir yöntem ister bitki olsun her iki yöntemin etkinliği mikroorganizma temelli yaklaşımlarla arttırılacaktır. Tanımlanarak literatüre kazandırılacak her yeni mikroorganizma; bilinçli kullanımla beraber bahsi geçen problemlerin çözümüne yardımcı olacaktır.

Çalışmada bu hipotez üzerinde durulmuş; Erzurum, Erzincan ve Iğdır illerindeki tuzlu topraklardan örnekler alınarak, bu topraklardaki mikroorganizmalar izole edilmiştir. Alınan toprak örneklerinin ılımlı halofilik bakterilerin izolasyonunda kullanılan MH besiyerindeki inkübasyonlarından sonra 63 bakteri izolatu elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatların çeşitli konvensiyonel ve moleküler teknikler kullanılarak tanıları yapılmıştır.

MH besiyerinde gelişebilen bakteri izolatları, yapılan konvensiyonel tekniklerle morfolojik ve kültür özelliklerinin belirlenmesi için katı ve sıvı besiyerlerine inoküle edilmiştir. İlk olarak, oluşan genç kültürlerin boyamaları yapılarak morfolojik özellikleri ortaya konulmuştur. Elde edilen veriler sonucunda EM7, EM17, EM18, EM32, EK2, EK9, EN4 ve EN7 kodlu izolatların hücre şeklinin kok, EM2, EM4, EM33, EK1, EK4, EK6, EK8, EK12, EN2, EN3, EN5, EN9, EN12 ve IA kodlu izolatların hücre şekillerinin kısa çubuk, geriye kalan 38 bakterinin ise çubuk formunda olduğu tespit edilmiştir. 63 izolatın EM2, EM4, EM8, EM17, EM18, EM21, EM23, EM30, EM32, EK2, EK6, EK7, EK9, EK12, EN3, EN4, EN7, EN9, IA ve IF kodlu izolatların endospor oluşturmadıkları bunun dışındaki izolatların ise ya terminal ya da subterminal şeklinde endospor oluşturdukları gözlenmiştir. EM2, EM4, EM15, EM17, EM18, EM19, EM30, EK2, EK7, EN3, EN4, EN7, EN12, IE ve IF kodlu bakterilerinin hareketsiz diğerlerinin ise oldukça hareketli oldukları gözlemlenmiştir. Biyokimyasal test verileri değerlendirildiğinde EM3, EM20, EM23 EK5, EK12, EK14, EN1, EN6, EN8, EN10 IA, IC ve IE kodlu izolatların oksidaz pozitif diğer izolatları ise oksidaz negatif olduğu tespit edilmiştir. Katalaz testinde ise EK13 kodlu izolat hariç tüm izolatların katalaz pozitif olduğu tespit edilmiştir. Nitrat indirgemede EM19, EM20,

EM23, EM31, EM34, EK3, EK5, EK8, EK13, EN1, EN5, EN9, EN12 ve ID kodlu izolatların pozitif olduğu gözlenmiştir. Nitratı nitrite dönüştürme yeteneğinde olan herhangi bir izolat tespit edilmemiştir.

İzolatların NaCl toleransları değerlendirildiğinde tüm izolatların %10 NaCl konsantrasyonunda geliştiği gözlenmiş olup, EM3, EM4, EM7, EM8, EM12, EM14, EM15, EM20, EM22, EM23, EM25, EK2, EK4, EK5, EK7, EK12, EN2, EN4, EN7, EN8, EN10, EN11 IA, IB, IC, ID, IE ve IF kodlu izolatların %15 NaCl tuz konsantrasyonunda geliştikleri gözlenmiştir. %20 NaCl konsantrasyonunda gelişen izolatların ise EM7 ve EM14 kodlu izolatlar olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca %15 tuz konsantrasyonunda gelişen çoğu izolatın %20 NaCl tuz konsantrasyonunda az da olsa gelişim gösterdikleri belirlenmiştir. İzolatların pH toleransları değerlendirildiğinde ise genel olarak asidik pH'tan ziyade bazik pH'ta büyüdükleri tespit edilmiştir. pH 5'te sadece 22 izolat (EM15, EM17, EM18, EM19, EK1, EK2, EK3, EK5, EK6, EK7, EK12, EK13, EK14, EK15, EN1, EN3, EN4, EN5, EN6, EN7, EN12 ve IA) büyüebilirken; pH 11'de 36 izolat (EM4, EM7, EM11, EM12, EM14, EM16, EM22, EM23, EM24, EM25, EM28, EM29, EK1, EK2, EK4, EK7, EK8, EK9, EK13, EK14, EK15, EN1, EN3, EN4, EN8, EN9, EN10, EN11, EN12, IA, IB, IC, ID, IE ve IF) büyümeye göstermiştir.

Antibiyotik duyarlılık testleri değerlendirildiğinde EM7, EM9, EM30, EK6 ve EK7 kodlu izolatların sadece kanamisine; EM19, EM23, EK14, EK15 ve EN1 kodlu izolatların sadece tetrasikline; EN12 kodlu izolatın hem neomisin hem de kanamisine; EN3 kodlu izolatın ise üç antibiyotiğe birden dirençli olduğu tespit edilmiştir. 63 izolatın neomisin, kanamisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine duyarlılık sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Biyokimyasal testlerden biri olan şeker fermentasyonu verileri, izolatların glikoz ve sükroz gibi şekerlerden asit oluşturmalarının, test edilen fruktoz, sorbitol, laktoz, maltoz, mannitol, mannoz, galaktoz ve inositol gibi şekerlerden daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu şekerlerin fermentasyonlarına bakıldığında glikoz 38, sükroz 30, maltoz 24, fruktoz ve mannoz 23, sorbitol 21, inositol 19, laktoz 18, galaktoz 16 ve

mannitol'ün ise 14 izolat tarafından fermente edildiği tespit edilmiştir. Şekerlerden asit oluşumu bu çalışmada tanısı yapılan *Nesterenkonia*, *Halobacillus*, *Promicromonospora*, *Jeotgalibacillus*, *Staphylococcus*, *Planococcus*, *Virgibacillus*, *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Halomonas*, *Gracilibacillus*, *Terribacillus*, *Bacillus Zhihengliuella*, cinslerinin türleri arasında farklılık gösterdiği literatürlerdeki verilerle uyumaktadır (Jiang *et al.* 2009; Sánchez-Porro *et al.* 2010; Mykytczuk *et al.* 2012).

Hidrolizi test edilen maddelerden eskülinin 24, kazeinin 19, jelatinin 18, nişastanın 10 ve tween 80'in ise 6 izolat tarafından parçalandığı tespit edilmiştir. Eskülin, kazein, jelatin, nişasta, tween 80 gibi maddelerin hidrolizide şekerlerden asit oluşturmada olduğu gibi *Nesterenkonia*, *Halobacillus*, *Promicromonospora*, *Jeotgalibacillus*, *Staphylococcus*, *Planococcus*, *Virgibacillus*, *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Halomonas*, *Gracilibacillus*, *Terribacillus*, *Bacillus Zhihengliuella*, cinslerinin türleri arasında farklılık gösterdiği literatürlerdeki verilerle desteklenmiştir (Jiang *et al.* 2009; Chen *et al.* 2010).

Bu çalışmada izolatların tanı ve karakterizasyonu amacıyla kullanılan konvensiyonel testlere ek olarak moleküler yöntemlerde kullanılmıştır. Bu anlamda kullanılan ilk yöntem, rutin çalışmalarda da sıklıkla tercih edilen mikrobiyal identifikasyon sistemidir.

MIS tekniği ile tanısı yapılan bakteriler genellikle TSA besiyerlerinde büyütülmeleri dikkate alınarak bu çalışmada da %3 NaCl içeren TSA besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. MIS tekniğinin tanı sonuçlarına göre izolatların yağ asit profilleri incelendiğinde; izolatların genel olarak en yüksek oranda $C_{15:0}$ iso ve $C_{15:0}$ anteiso yağ asitlerini, nispeten daha az oranda $C_{17:0}$ ve $C_{17:0}$ anteiso yağ asitlerini içerdikleri tespit edilmiştir. İzolatlar arasında farklılıklar olmakla beraber $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{16:1}$ w7c alcohol, $C_{16:0}$ iso, $C_{16:0}$ N alcohol gibi yağ asitlerinin de sık rastlanan yağ asitleri olduğu tespit edilmiştir.

Sekans sonuçlarına göre *Staphylococcus* olarak tanımlanan izolatların MIS tekniğinde tür düzeyinde olmasa da cins düzeyinde uyduğu gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, *Bacillus*

olarak tanılanan izolatların MIS tekniğiyle ya hiç tanılanmadığı ya da *Staphylococcus*'ta olduğu gibi uyuşmanın sadece cins düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. Sekans sonuçlarına göre *Halobacillus* olarak tanılanan izolatların ya hiç tanılanmadığı ya da *Bacillus* olarak tanılandığı tespit edilmiştir. Sekans verilerine göre 63 izolat'tan 2'sinin *Halomonas* olduğu tespit edildiği halde MIS tekniği ile aynı izolatlardan birinin hiç tanılanmadığı diğer izolatın ise cins düzeyinde uyuştugu tespit edilmiştir. Sekans verilerine göre *Nesterenkonia* (EM4 ve EN7) ve *Halobacillus* (EM7, EM14, EM33, IE ve IF) olarak tanılanan izolatlarda dominant olması gereken yağ asitlerinin çalışmamızda elde edilen verilerle nispeten uyuştugu gözlemlenmiştir.

Halomonas cinsi genellikle membran lipitlerinde düz-zincirli doymuş, tek çift bağ taşıyan doymamış yağ asitleri ($C_{16:0}$, $C_{16:1}$ ve özellikle $C_{18:1}$) içerirler. Çalışmamızda sekans verilerine göre *Halomonas* olarak değerlendirilen 2 izolattan biri olan EM23 kodlu izolat'ta $C_{16:0}$ yağ asidinin bulunması mevcut literatür tarafından desteklemektedir (Franzmann and Tindall, 1990; Skerratt *et al.* 1991; Long *et al.* 2013). *Halomonas* cinsinde spesifik sayılabilecek bir diğer yağ asidi olan siklopropan yağ asidinin bizim çalışmamızda da tespit edilmiş olması literatür bilgileriyle uyumaktadır (Franzmann and Tindall 1990; Monteoliva-Sanchez *et al.* 1988; Skerratt *et al.* 1991 Sánchez-Porro *et al.* 2010; Long *et al.* 2013).

Bu çalışmada MIS tekniği ile tanısı yapılan izolatların optimum isteklerinden daha az konsantrasyonlardaki tuz şartlarında büyütölmelerinden dolayı %100 eşleşme olmaması beklenen bir durumdur. Çünkü mevcut literatürler incelendiğinde değişen tuz şartlarında yağ asidi içeriğinin değiştiğı görölmektedir. Mesela *Halomonas halophila*'da artan tuz miktarı siklopropan yağ asidi içeriğinde bir artışa ve beraberinde tek çift bağı doymamış yağ asitlerinde bir azalışa neden olur. Artan tuz miktarının siklopropan yağ asit sentezini teşvik ettiğı ifade edilmektedir (Monteoliva-Sanchez *et al.* 1988; Sánchez-Porro *et al.* 2010). Tuz konsantrasyonu %5'den %15'e çıkartıldığında $C_{17:0}$ cyc miktarı %0'dan %8,5' ve $C_{19:0}$ cyc miktarı %4,2'den %14,9'a çıkar ve dallanmış zincirli doymuş yağ asitlerinin içeriğı ($C_{15:0}$ iso yağ asidi için) %42,9'dan %31,9'a düşer (Monteoliva-Sanchez and Ramos-Cormenzana, 1986). Benzer şekilde *Nesterenkonia*, *Marinococcus*

ve *Halobacillus* cinslerinde yüksek oranlarda bulunan C_{15:0} ve C_{17:0} yağ asitleri miktarı tuzlulukla değişir. Mesela tuz konsantrasyonu %5'den %15'e çıkartıldığında C_{16:1} yağ asidinin miktarı %40,9'dan %48,8'e çıkar (Luo *et al.* 2009; Chen *et al.* 2009; Sanchez-Porro *et al.* 2009).

İzolatların moleküler tanısı amacıyla, 16S rDNA bölgeleri PCR yardımıyla çoğaltılmış ve çoğaltılan ampikonların sekans analizleri yaptırılmıştır. Sekans analizleri sonucunda; izole edilen 63 izolattan 11 tanesi *Bacillus* sp. (EM10, EM13, EM19, EM21, EM24, EM29, EK4, EK15, EN1, EN2 ve EN5), 3 tanesi *Bacillus pumilus* (EM3, EK1 ve EK14), 1 tanesi *Marinibacillus* sp.(EM1), 2 tanesi *Zhihengliuella halotolerans* (EM2 ve EN3), 1 tanesi *Zhihengliuella* sp. (EN12), 1 tanesi *Zhihengliuella salsuginis* (EM30), 1 tanesi *Nesterenkonia xinjiangensis* (EM4), 1 tanesi *Nesterenkonia* sp. (EK7), 6 tanesi *Halobacillus* sp. (EM7, EM14, EM25, EM33, IE ve IF), 1 tanesi *Halomonas neptunia* (EM23), 1 tanesi *Halomonas* sp. (IA), 1 tanesi *Oceanobacillus picturae* (EM20), 1 tanesi *Oceanobacillus profundus* (EM26), 1 tanesi *Oceanobacillus oncorhynchi* (EN8), 1 tanesi *Oceanobacillus* sp. (IC), 1 tanesi *Gracilibacillus* sp. (EM31), 2 tanesi *Planococcus* sp. (EM32 ve EK9), 1 tanesi *Thalassobacillus devorans* (EM34), 1 tanesi *Thalassobacillus* sp. (ID), 2 tanesi *Promicromonospora* sp. (EM8 ve EK12), 2 tanesi *Bacillus horikoshii* (EM9 ve EM11), 2 tanesi *Bacillus patagoniensis* (EM12 ve EM28), 1 tanesi *Terribacillus saccharophilus* (EM15), 1 tanesi *Jeotgalibacillus campisalis* (EM16), 1 tanesi *Jeotgalibacillus* sp. (EK8), 5 tanesi *Staphylococcus succinus* (EM17, EM18, EK2, EN4 ve EN7), 2 tanesi *Bacillus atrophaeus* (EK3 ve EN11), 1 tanesi *Bacillus subtilis* (EK5), 1 tanesi *Microbacterium* sp. (EK6), 1 tanesi *Bacillus megaterium* (EK10), 1 tanesi *Bacillus agaradhaerens* (EK13), 2 tanesi *Bacillus gibsonii* (EN6 ve EN10), 1 tanesi *Exiguobacterium aurantiacum* (EN9), 2 tanesi *Virgibacillus picturae* (EM22 ve IB) olarak belirlenmiştir.

Nesterenkonia cinsine ait 2 izolat %99 tanı değeri verirken bu tanı değeri bir izolat için cins düzeyinde (EK7), diğer izolat (EM4) için ise tür düzeyinde olmuştur. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Tiago *et al.* 2004; Li *et al.* 2008; Luo *et al.* 2009).

Halomonas olarak tanımlanan 2 izolat (EM23 ve IA) %99 tanı değeri verirken bunlardan EM23 izolatı *Halomonas neptunia*, IA izolatı ise *Halomonas* sp. olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Sanchez-Porro *et al.* 2010; Long *et al.* 2013).

Halobacillus olarak tanımlanan 6 izolat'ın (EM7, EM14, EM25, EM33, IE ve IF) tamamında tanı değerleri %99 bulunmuş olup Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Sanchez-Porro *et al.* 2009; Chen *et al.* 2009).

Zhihengliuella olarak tanımlanan 4 izolat'ın (EM2, EM30, EN3 ve EN12) tanı değeri yine %99 olup bunlardan bir tanesi *Zhihengliuella* sp. (EN12) sadece cins seviyesinde diğer 3 izolat *Zhihengliuella halotolerans* (EM2), *Zhihengliuella salsuginis* (EM30) ve *Zhihengliuella halotolerans* (EN3) ise tür seviyesinde tanı değeri göstermişlerdir. *Zhihengliuella* olarak tanımlanan 4 izolatın 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır 16S rDNA değeri literatürce de desteklenmektedir (Chen *et al.* 2010; Jha *et al.* 2012).

Oceanobacillus olarak tanımlanan 4 izolat'ın (EM20, EM26, EN8 ve IC) tanı değeri %99 olup bunlardan 3 izolat tür seviyesinde *Oceanobacillus picturae* (EM20), *Oceanobacillus profundus* (EM26), *Oceanobacillus oncorhynchi* (EN8) ve 1 izolat ise sadece cins seviyesinde tanımlanabilmiştir. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Lee *et al.* 2010; Yang *et al.* 2010).

Planococcus olarak tanımlanan 2 izolat (EM32 ve EK9) sadece cins düzeyinde tanı değeri verirken bu izolatların tanı değeri ise %99 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Suresh *et al.* 2007; Yoon *et al.* 2010).

Promicromonospora olarak tanılanan 2 izolat (EM8 ve EK12) sadece cins düzeyinde tanı değeri vermişken bu izolatların tanı değeri ise %99 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Jiang *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2011).

Thalassobacillus olarak tanılanan 2 izolattan (EM34 ve ID) biri tür düzeyinde *Thalassobacillus devorans* (EM34) ve diğeri ise cins (ID) düzeyinde %99 tanı değeri vermişlerdir. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Lee *et al.* 2010; Sanchez-Porro *et al.* 2011).

Marinobacillus olarak tanılanan 1 izolat (EM1) cins düzeyinde tanılanmış olup çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Rusznayak *et al.* 2008; Chen *et al.* 2010).

Staphylococcus olarak tanılanan 5 izolattan 4'ü *Staphylococcus succinus* (EM17, EK2, EN4 ve EN7) %99 oranında tür seviyesinde tanı değeri verirken 1 izolat (EM18) ise %96 oranında tanı değeri vermiştir. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Ravyts *et al.* 2010).

Terribacillus olarak tanılanan 1 izolat (EM15) %98 oranında *Terribacillus saccharophilus* türüne benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Krishnamurthi and Chakrabarti 2008; Liu *et al.* 2010).

Jeotgalibacillus olarak tanılanan 2 izolattan (EM16 ve EK) biri tür düzeyinde %100 tanı değeri ile *Jeotgalibacillus campisalis* (EM16) ve diğeri ise cins (EK8) %99 tanı değeri ile cins düzeyinde tanılabilmışlerdir. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Yoon *et al.* 2010; Chen *et al.* 2010).

Virgibacillus olarak tanılanan 2 izolattan (EM22 ve IB) biri %99 (EM22) diğeri (IB) ise %98 tanı değeri ile *Virgibacillus picturae* türüne benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Zhang *et al.* 2012).

Gracilibacillus olarak tanılanan 1 izolat (EM31) %99 tanı değeri ile cins düzeyinde tanılanmış olup çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Huo *et al.* 2010; Chamroensaksri *et al.* 2010).

Cins düzeyinde tanılanan diğer bir izolat (EK6) *Microbacterium* %99 tanı değeri ile tanılanmış olup sekans verisi mevcut literatürle uyumaktadır (Kim *et al.* 2011).

Exiguobacterium olarak tanılanan 1 izolat (EN9) %99 tanı değeri ile *Exiguobacterium aurantiacum* türüne benzerlik gösterdiği tespit edilmiş olup çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Chaturvedi and Shivaji 2006; Singh *et al.* 2013).

EM10 %99, EM13 %98, EM19 %99, EM21 %99, EM24 %100, EM29 %99, EK4 %98, EK15 %99, EN1 %98, EN2 %99 ve EN5 %99 tanı değeri ile cins düzeyinde tanılanmış olup çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Deng *et al.* 2011; Earl *et al.* 2012; Mohamadou *et al.* 2013). Bu çalışmada 3 izolat (EM3) %99, (EK1) %100 ve (EK14) %99 tanı değeri ile *B. pumilus*, türüne benzerlik göstermiş olup sekans çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Todorova and Kozhuharova 2010; Earl *et al.* 2012).

1 izolat (EK10) %99 tanı değeri ile *B. megaterium*, 1 izolat (EK5) *B. subtilis*, 2 izolat (EN6 %99 ve EN10 %100) tanı değeri ile *Bacillus gibsonii* türüne benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Kim *et al.* 2010; Kang *et al.* 2011).

2 izolat, EK3 ve EN11 %99 tanı değeri ile *Bacillus atrophaeus*, benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Ruiz-Garcia *et al.* 2005; Porob *et al.* 2013).

1 izolat (EK13) %99 tanı değeri ile *Bacillus agardhaerens* türüne benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen 16S rDNA sekans analizi sonuçları, diğer verilerle ve literatürlerle uyumaktadır (Chen *et al.* 2009; İbrahim *et al.* 2010).

Uzun vadede genetik mühendislik ve bitki ıslahı ile tuz toleranslı bitki varyetelerinin elde edilmesi mümkün olmasına rağmen, halofilik mikroorganizmaların ekilen bir ürünle inokülasyonu kısa vadede bitki stresini azaltacağından ayrıca bu yaklaşımın hem çevre dostu hem de daha az maliyetli olması bu yöntemin kullanılabilirliğini artırmaktadır. Tuzlu topraklarda bazı mikroorganizmaların bitki büyümesi üzerine olumlu etkileri iyi bilinmesine rağmen söz konusu bu etkilerin altında yatan fizyolojik ve moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamadığı için olumlu etkileri olan mikroorganizmaların tarım uygulamaları için optimize edilmesi gerekir.

Ilımlı halofilik bakteriler çeşitli tuz konsantrasyonlarında birçok uyumlu bileşik üretebildikleri ve bazı bileşikleri parçalayabildiklerinden dolayı biyoteknolojik uygulamalarda oldukça önemli bir yer tutarlar. Halofilik mikroorganizmaların çeşitliliği ve karakterizasyonu ile ilgili birçok çalışma bulunmasına karşın biyoteknolojik uygulamaları ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Mevcut durum göz önünde bulundurulduğunda bu ekstremofillerin endüstriyel süreçlerde kullanımları için gelecekte bu konu üzerine daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Ilımlı halofilik mikroorganizmaların en ilginç uygulamalarından birisi ürettikleri uyumlu çözünen maddelerin, biyomakromoleküllerin ve hücrelerin dış çevre tarafından meydana getirilen zararlardan korunmasıdır. Ilımlı halofilik mikroorganizmaların bir diğer ilginç uygulama alanı ise tuz şartlarında biyodegradasyon süreçlerinde kullanılmalarıdır.

Bu tez kapsamında yaptığımız çalışma Türkiye sınırları içindeki tuzlu topraklardan ılımlı halofilik bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanısı amacıyla yapılmış ilk

Çalışma olması sebebiyle büyük bir öneme sahiptir. Mikroorganizmaların toprak verimliliği üzerine rolleri düşünüldüğünde ve özellikle halofilik bakterilerin tuz şartlarına uyumları göz önüne alındığında çalışmamızda elde ettiğimiz bakterilerin önemli bir sorun olan tuzlu toprakların ıslahı çalışmalarına ciddi katkı sağlayacağı açıktır. Bu bakterilerin PGPR zelliklerinin araştırılması sadece sahip oldukları uyumlu çözünen olarak adlandırılan bileşiklerin ve yüksek tuz konsantrasyonlarında fonksiyonel olan enzimlerin zirai alanlardaki uygulamaları için değil tıp, eczacılık ve biyoremediasyon gibi birçok muhtemel kullanım alanı bakımından da son derece önemlidir.

KAYNAKLAR

- Acar, S., 2009. Hasanabdal Köyü Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisan Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Sahin, F., 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods*, 79, 321-8.
- Adıguzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Amoozegar, M. A., Malekzadeh, F., and Khursheed, A. M., 2003. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2, *Journal of Microbiological Methods*, 52 353-359.
- Anjos, A. R. M., and Mattiazzo, M. E., 1998. Evaluation of the leaching of magnesium, calcium and potassium in soils treated with sewage sludge. XV International Congress of Soils Science, Scientific Presentation No. 2214, Symposium No. 40, Montpellier, France.
- Anonymous, 2005. Management of Irrigation-Included Salt-Affected Soils. <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/salinity-brochure-eng.pdf>.
- Ashaf, M., Berge, S. H., Mahmood, O. T., 2004. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stres. *Biology and Fertility of Soils*, 40, 157-162.
- Azachi, M., Oren, A., Gurevich, P., Sarig, S., and Henis, Y., 1995. Transformation of formaldehyde by a *Halomonas* sp. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 548-553.
- Bailey, V. L., Smith, J. L., Bolton, H., 2002. Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 997-1007.
- Barassi, C. A., Ayrault, G., Creus, C. M., Sueldo, R. J., and Sobrero, M. T., 2006. Seed inoculation with *Azospirillum mitigates* NaCl effects on lettuce. *Scientia Horticulture*, 109, 8-14.
- Bardhan, G., Chaudhari, S. K., Mohapatra, P. K., 2007. Effect of Irrigation Water Quality on Saturated Hydraulic Conductivity of Typic Haplustert, Vertic Haplustept, and Lithic Ustorthent Soils. *Journal of Agricultural Physics*, 7, 38-46.
- Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatışı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Béjar, V., Llamas, I., Calco, C., and Quesada, E., 1998. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *Journal of Biotechnology*, 61,135-141.
- Bell, D. T., 1999. Australian trees for the rehabilitation of waterlogged and salinity-damaged landscapes. *Australian Journal of Botany* 47, 697-716.

- Beyer, N., Driller, H., and Bunger, J., 2000. Ectoine an innovative, multi-functional active substance for the cosmetic industry. *Seiden ole Fette Wachse*, 126, 26-29.
- Bianco, C., and Defez, R., 2009. *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. *Journal of Experimental Botany*, 60, 3097-4107.
- Bollag, J. M., Myers, C. J., and Minard, R. D., 1992. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *Science of Total Environmental*, 123/124, 205-217.
- Boonsaner, M., and Haweker, D., 2012. Remediation of saline soil from shrimp farms by three different plants including soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 47, 558-564.
- Bresler, E., Neal, B. L. M., Carter, D. L., 1982. Saline and Sodic Soils. Principles-Dynamics-Modelling. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 236.
- Broadbent, F. E., Nakashima, T., 1971. Effect of added salts on nitrogen mineralization in three California soils. *Soil Science Society of America Journal* 35, 457-460.
- Brown, A. D., 1976. Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, 40, 803-846.
- Brown, A. D., 1990. Microbial water stress physiology. Principles and perspectives. John Wiley and Sons, Chichester.
- Brown, A. D., and Simpson, J. R., 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Journal of General Microbiology*, 72, 589-591.
- Buyer, J. S., 2006. Rapid and sensitive FAME analysis of bacteria by cold trap injection gas chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 187-190.
- Bylund, J. E., Dyer, J. K., Fecly, D. E., and Martin, E. L., 1990. Alkaline and acid phosphatases from the extensively halotolerant bacterium *Halomonas elongata*. *Current Microbiology*, 20, 125-131.
- Cao, J., Xianting, Li., X., Kong, X., Zed, R., and Dong, L., 2012. Using alfalfa (*Medicago sativa*) to ameliorate salt-affected soils in Yingda irrigation district in Northwest China. *Acta Ecologica Sinica*. 32: 68-73.
- Cao, J., Li, X., Kong, X., Zed, R., and Dong, L., 2012. Using alfalfa (*Medicago sativa*) to ameliorate salt-affected soils in Yingda irrigation district in Northwest China. *Acta Ecologica Sinica*, 32, 68-73.
- Chaiyanan, S., Chaiyanan, S., Maugel, T., Huq, A., Robb, F. T., and Colwell, R. R. 1999. Polyphasic taxonomy of a novel *Halobacillus*, *Halobacillus thailandensis* sp. nov. isolated from fish sauce. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 360-365.
- Chakraborty, U., Roy, S., Chakraborty, A. P., Dey, P., and Chakraborty, B., 2011. Plant growth promotion and amelioration of salinity stress in crop plants by a salt-tolerant bacterium. *Recent Researc in Science and Technology*, 3, 61-70.
- Chamroensaksri, N., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., Visessanguan, W., Kudo, T. Itoh, T., 2010. *Gracilibacillus thailandensis* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 944,948.

- Chang, P., Gerhardt, K. E., Huang, X. D., Yu, X. M., Glick, B. R., Gerwing, P. D., Greenberg, B. M., 2013. Plant growth-promoting bacteria facilitate the growth of barley and oats in salt-impacted soil: Implications for phytoremediation of saline soils. *International Journal of Phytoremediation*, Doi:10.1080/15226514.2013.82144.
- Chaturvedi, P., and Shivaji, S., 2006. *Exiguobacterium indicum* sp. nov. a psychrophilic bacterium from the Hamta glacier of the Himalayan mountain ranges of India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2765-2770.
- Chen, G., Zhu, H., and Zhang, Y., 2003. Soil activities and carbon and nitrogen fixation. *Research in Microbiology* 154: 393-398.
- Chen, J., 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. *International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use, Thailand*. 16-20.
- Chen, L., Dodd, I. C., Theobald, J. C, Belimov, A. A., and Davies, W. J., 2013 The rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2, containing ACC deaminase, promotes growth and development of *Arabidopsis thaliana* via an ethylene-dependent pathway. *Journal of Experimental Botany*. 64, 1565-1573.
- Chen, Y. G, Peng, D. J., Chen, H. Q., Zhang, Y. Q., Tang, S. K., Zhang, D. C., Peng, Q. Z, Li, W. J., 2010. *Jeotgalibacillus soli* sp. nov., isolated from non-saline forest soil, and emended description of the genus *Jeotgalibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 98,415-421.
- Chen, Y.-G., Cui, X-L., Wang, Y-X., Zhang, Y-Q., Tang, S-K., Li, W-J., Liu, Z-X., Wen, M-L. and Peng, Q. 2009. *Virgibacillus sediminis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt lake in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2058-2063.
- Chen, Y-G., Tang, S-K., Zhang, Y-Q., Liu, Z-X., Chen, Q-H., He, J-W., Cui, X-L. and Li, W-J. 2010. *Zhihengliuella salsuginis* sp. nov., a moderately halophilic actinobacterium from a subterranean brine. *Extremophiles* 14, 397-402.
- Chen, Y-G., Zhang, Y-Q., Liu, Z-X., Zhuang, D-C., Klenk, H-P., Tang, S-K., Cui, X-L. and Li, W-J., 2009. *Halobacillus salsuginis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a subterranean brine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2505-2509.
- Chen, Y-G., Zhang, Y-Q., Wang, Y-X., Liu, Z-X., Klenk, H-P., Xiao, H-D., Tang, S-K., Cui, X-L., and Li, W-J., 2009. *Bacillus neizhouensis* sp. nov., a halophilic marine bacterium isolated from sea anemone. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 3035–3039.
- Cheng, Z., Park, E., and Glick, B. R., 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 912-918.
- Chhabra, R., 1996. Soil salinity and water quality. A. A. Balkema Brookfield, USA.
- Chookietwattana, K. and Maneewan, K., 2012. Selection of efficient salt-tolerant bacteria containing ACC deaminase for promotion of tomato growth under salinity stress. *Soil Environment*, 31, 30-36.

- Chookietwattana, K., and Maneewan, K., 2012. Screening of efficient halotolerant phosphate solubilizing bacterium and its effect on promoting plant growth under saline conditions. *World Applied Science Journal*, 16, 1110-1117.
- Chuard, C., and Reller, L. B., 1998. Bile-esculin test for presumptive identification of Enterococci and Streptococci: Effects of bile concentration, inoculation technique, and incubation time. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1135-1136.
- Connell, S. P., and Garland, J. L., 2002. Dissimilar response of microbial communities in Biolog GN and GN2 plates. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 413-416.
- Cummings, S. P., Williamson, M. P., and Gilmour, D. J., 1993. Turgor regulation in a novel *Halomonas* species. *Archives of Microbiology*, 160: 319-323.
- Curtin, D., Naidu, R., 1998. Fertility constraints to plant production, In: Sumner, M.E., Naidu, R. (Eds.), *Sodic Soil: distribution, management and environmental consequences*. Oxford University Press: New York, pp. 107-123.
- Çetinkuş, K., 2007. Çamaltı Tuzlası Halofilik Mikroorganizmalarının İzolasyonu Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Da Costa, M. S., Santos, H., and Galinski, E. A., 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*, pp. 117-153 In: Antranikian, G. (Ed.), *Biotechnology of extremophiles*. Springer-Verlag, Berlin.
- Dalal, R. C., 1998. Soil Microbial biomass: What do the numbers really mean? *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38, 649-665.
- Deng, Y., Zhu, Y., Wang, P., Zhu, L., Zheng, J., Li, R., Ruan, L., Peng, D. Sun, M., 2011. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Journal of Bacteriology*, 193, 2070-2071.
- Devi, G. R, Pandiyarajan, V., Gurusaravanan, P., 2012. Alleviating effect of IAA on salt stressed *Phaseolus mungo* (L.) with reference to growth and biochemical characteristics. *Recent Research in Science and Technology*, 4, 22-24.
- Dimkpa, C., Weinand, T and Ash, F., 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment*, 32, 1682-1694.
- Dincer, A. R., and Kargi, F., 2001. Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater. *Process Biochemistry*, 36, 901-906.
- Dohrmann, A-B., and Müller, V., 1999. Chloride dependence of endospore germination in *Halobacillus halophilus*. *Archives of Microbiology*, 172, 264-267.
- D'Souza, M. P., Amini, A., Dojka, M. A., Pickering, I. J., Dawson, S. C., Pace, N. R., and Terry, N., 2001. Identification and characterization of bacteria in a selenium-contaminated hypersaline evaporation ponds. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3785-3794.
- Dubey, S. K., Mondal, R. C., 1993. Sodic soil reclamation with saline water in conjunction with organic and inorganic amendments. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 7, 219-231.
- Durmaz, R., 2001. Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji* (2. Baskı), Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şirketi, s.139-147, İstanbul.

- Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin kaplıcalarından termofilik bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve tanımlanması. Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Earl, A. M., Eppinger, M., Fricke, W. F., Rosovitz, M. J., Rasko, D. A., Daugherty, S., Losick, R., Kolter, R., and Ravel, J., 2012. Whole-genome sequences of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology*, 194, 2378-2379.
- Economou, A., Roussis, A., Milioni, D., and Katinakis, P., 1989. Patterns of protein synthesis in the moderately halophilic bacterium *Deleya halophila* in response to sudden changes in external salinity. *FEMS Microbiology Ecology*, 62, 103-110.
- Egamberdiyeva, D., and Hoflich, G., 2004. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. *Journal of Arid Environments*, 56, 293-301.
- Errabii, T., Gandonou, C., Hayat, E., Abrinl, J., Idaomar, M., Nadia, S., 2006. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. *African Journal of Biotechnology*, 15, 1488-1493.
- Eynard, A., Schumacher, T. E., Lindstrom, M. J., Malo, D. D., 2005. Effects of agricultural management systems on soil organic carbon in aggregates of Ustolls and Usterts. *Soil and Tillage Research* 81, 253-263.
- Fang, C., Radosevich, M. and Fuhrmann, J. J., 2001. Characterization of rhizosphere microbial community structure in five similar grass species using fame and biologi analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 679-682.
- Feng, D. Q., Zhang, B., Lu, W. D., and Yang, S. S., 2006. A protein expression analysis of moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T under salt stress conditions. *The Journal of Microbiology*, 44,369-374.
- Ferguson, L., Grattan, S. R., 2005. How salinity damages citrus: osmotic effects and specific ion toxicities. *HortTechnology*, 15,95-99.
- Fisk, M. C., Ruether, K. F. and Yavitt, J. B., 2003. Microbial activity and functional composition among northern peatland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 591-602.
- Fitzpatrick, R.W., Rengasamy, P., Merry, R.H., Cox, J.W., 2001. Is dryland soil salinisation reversible. National Dryland Salinity Program. Web site <http://www.ndsp.gov.au>.
- Franzmann, P. D., and Tindall, B. J. 1990. A chemotaxonomic study of members of the family *Halomonadaceae*. *Systematic and Applied Microbiology*,13: 142-147.
- Gabbay-Azaria, R., and Tel-Or, E. 1993. Mechanisms of salt tolerance in cyanobacteria, pp. 123-132 In: Gresshoff, P.M. (Ed.), *Plant responses to the environment*. CRC Press, Boca Raton.
- Galinski, E. A., 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 37, 273-328.
- Galinski, E. A., and Louis, P., 1999. Compatible solutes: ectoine production and gene expression, pp. 187-202 In: Oren, A. (Ed.), *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*. CRC Press, Boca Raton.
- Garcia, C., Hernandez, T., 1996. Organic matter in bare soils of the Mediterranean region with a semiarid climate. *Arid Land Research and Management* 10, 31-41.

- Garland, J. L., 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential carbon source utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 213-221.
- Ghaly, F. M., 2002. Role of natural vegetation in improving salt affected soil in northern Egypt. *Soil and Tillage Research* 64,173-178.
- Ghany, A, Bouthaina F., Arafa, R. A. M., Tomader, A. E. R., Morsy, E. S. M., 2010. Effect of Some Soil Microorganisms on Soil Properties and Wheat Production under North Sinai Conditions. *Journal of Applied Sciences Research*, 4, 559-579.
- Ghollarata, M., Raiesi, F., 2007. The adverse effects of soil salinization on the growth of *Trifolium alexandrinum* L. and associated microbial and biochemical properties in a soil from Iran. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1699-1702.
- Ghosh, R., Chattopadhyay, P. K., 2010. Antibiotic resistance profile of halophilic microorganisms isolated from tannery effluent. *Indian Journal of Biotechnology*, 9, 80-86.
- Glick, B. R., 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, 251, 1-7.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., and Li, J., 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190, 63-68.
- Görmez, A., 2011. Erzurum ilinde kayısı ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas* türlerinin tanısı, karakterizasyonu ve çeşit reaksiyonları. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Grichko, V. P., and Glick, B. R., 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 11-17.
- Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., and Venkateswarlu, B., 2011. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.27, 1231-1240.
- Haque, M. A., and N. J. Russell., 2004. Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiology*, 150,1397-1404.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition New York: The McGraw-Hill Companies.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. and Ahmed, I., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60, 579-598.
- Horikoshi, K., and Bull, A. T., 2011. *Extremophiles Handbook*.
- Hulton, C. S., Higgins, C. F., Sharp, P. M., 1991. ERIC Sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other Enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 5, 825-834.
- Huo, Y. Y., Xu, X., Cui, H., Wu, M., 2010. *Gracilibacillus ureilyticus* sp. nov., a halotolerant bacterium from a saline-alkaline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1383-1386.

- Ibekwe, A. M., Poss, J.A., Grattan, S. R., Grieve, C. M., Suarez, D., 2010. Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 567-575.
- Imhoff, J. F., Tindall, B. J., Grant, W. D., and Trüper, H. G., 1991. *Ectothiorhodospira vacuolata* sp. nov., a new phototrophic bacterium from soda lakes. *Archives of Microbiology*, 130, 238-242.
- Indiragandhi, P., Anandham, R., Kim, K., Yim, W., Madhaiyan, M., and Sa, T. M., 2008. Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1037-1045.
- İbrahim, A. S. S., Tayeb, M. A. E., Salamah, A. A. A., 2010. Characterization of immobilized alkaline cyclodextringlycosyltransferase from a newly isolated *Bacillus agaradhaerens* KSU-A11. *African Journal of Biotechnology*, 9, 7550-7559.
- Jacob, J. H., 2012. Classification of Halophilic Heterotrophic Bacteria Thriving in the Jordan Dead Sea Littoral Zone, *Journal of Biological Science*, 2, 1-7.
- Jadhav, G., Salunkhe, D., Nerkar, D., Bhadekar, R., 2010. Isolation and characterization of salt-tolerant nitrogen-fixing microorganisms from food. *EurAsian Journal of Bioscience*, 4, 33-40
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. and Barea, J. M., 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 37, 1-16.
- Jenkinson, D. S., 1988. Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil, In: Wilson, J.R. (Ed.), *Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems*. Commonwealth Agricultural Bureau, International. Wallingford, 368-386.
- Jha, B., Gontia, I., and Hartmann, A., 2011. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant and Soil*, 356, 265-277.
- Jiang, Y., Wiese, J., Cao, Y-R., Xu, L-H., Imhoff, J. F. and Jiang, C-L., 2009. *Promicromonospora flava* sp. nov., isolated from sediment of the Baltic Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1599-1602.
- Kadayıfçılar, P., 2007. Klinik Tanıya Yönelik Dna Hibridizasyonuna Dayalı Elektrokimyasal Genosensör Tasarımı. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kang, J-Y., Kim, S-Y., Kim, D., Kim, D-H., Shin, S-M., Park, S-H., Kim, K-H., Jung, H-C., Pan, J-G., Joung, Y-H., Chi, Y-T., Chae, H-Z., Ahn, T., Yun, C-H., 2011. Characterization of diverse natural variants of CYP102A1 found within a species of *Bacillus megaterium*. *AMB Express*, 1, 1-12.
- Kargi, F., and Dinçer, A. R. 2000. Use of halophilic bacteria in biological treatment of saline wastewater by fedbatch operation. *Water Environment Research*, 72, 170-174.
- Kelly, J., Rengasamy, P., 2006. *Diagnosis and Management of Soil Constraints: Transient Salinity, Sodicity and Alkalinity*, The University of Adelaide and Grains Research and Development Corporation, Canberra, Australia, 1-32.

- Keren, R., 2000. Salinity, In: Sumner, M.E. (Ed.), Handbook of Soil Science. CRC Press, Boca Raton. G3-G25.
- Kets, E. P. W., Galinski, E. A., de Wit, M., de Bont, J. A. M., and Heipieper, H. J., 1996. Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *Journal of Bacteriology*, 178, 6665-6670.
- Killham, K., 1994. Soil Ecology. Cambridge, Cambridge University Press.
- Kim, D. H., Kim, K. H., Kim, D., Jung, H. C., Pan, J. G., Chi, Y. T., Ahn, T., Yun, C. H., 2010. Oxidation of human cytochrome P450 1A2 substrates by *Bacillus megaterium* cytochrome P450 BM3. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzym*, 63, 179-187.
- Kim, Y. J, Roh, S. W., Jung, M. J, Kim, M. S., Park, E. J., Bae, J. W., 2011. *Microbacterium mitrae* sp. nov., isolated from salted turban shell. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 399-403.
- Kingler, J. M., Stowe, R. P., Obenhuber, D. C., Groves, T. O., Mishra, S. K. and Pierson, D. L., 1992. Evaluation of the biolog automated microbial identification system. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2089-2092.
- Knapp, S., Ladenstein, R., and Galinski, E. A., 1999. Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes and betaine. *Extremophiles*, 3, 191-198.
- Koiike, S. T., Barak, J. D., Henderson, D. M. and Gilbertson, R. L., 1999. Bacterial blight of leek: a new disease in California caused by *Pseudomonas syringae*. *Plant Disease*, 83, 165-170.
- Konopka, A., Oliver, L., and Turco, R. F., 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial Ecology*, 35, 103-115.
- Koyro, H. W., Hussain, T., Huchzermeyer, B., Khan, M. A., 2013. Photosynthetic and growth responses of a perennial halophytic grass *Panicum turgidum* to increasing NaCl concentrations. *Environmental and Experimental Botany* 91, 22-29.
- Kreuzwieser, J., and Gessler, A., 2010. Global climate change and tree nutrition: influence of water availability. *Tree Physiology*, 30, 1221-1234.
- Krishnamurthi, S., Chakrabarti, T., 2008. Proposal for transfer of *Pelagibacillus goriensis* Kim et al. 2007 to the genus *Terribacillus* as *Terribacillus goriensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2287-2291.
- Kubo, M., Hiroe, J., Murakami, M., Fukami, H., and Tachiki, T., 2001. Treatment of hypersaline-containing wastewater with salt-tolerant microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 222-224.
- Kuda, T., Miyamoto, H., Sakajiri, M., Ando, K., and Yano, T., 2001. Microflora of fish nukazuke made in Ishikawa, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 67, 296-301.
- Kumar, M., Joshi, A., Kashyap, R., Khanna, S., 2011. Production of xylanase by *Promicromonospora* sp MARS with rice straw under non sterile conditions. *Process Biochemistry*, 46, 1614-1618.
- Kushner, D. J., 1993. Growth and nutrition of halophilic bacteria, pp. 87-103 In: Vreeland, R.H., and Hochstein, L.I. (Eds.), *The biology of halophilic bacteria*. CRC Press, Boca Raton.

- Ladiero, B., 2012. Saline Agriculture in the 21st Century: Using Salt Contaminated Resources to Cope Food Requirements. Hindawi Publishing Corporation Journal of Botany, 310705.
- Lee, K. Y., Wahl, R., Barbu, E., 1956. Content of purine and pyrimidine base in desoxyribonucleic acid of bacteria. Annales de l'Institut Pasteur, 91, 212-224.
- Lee, S.Y., Oh T. K., Kim, W., and Yoon, J. H., 2010. *Oceanobacillus locisalsi* sp. nov., isolated from a marine solar saltern of the yellow sea, Korea International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 2758-2762.
- Lee, S-Y., Oh, T-K. Yoon, J-H., 2010. *Thalassobacillus hwangdonensis* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 2108-2112.
- Lelliott, R. A., and Stead, D. E., 1987. Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blacwell Scientific Publications. 216.
- Li, A., Lu, W., Ling, H. M. Qiu, D.Y., and Zhao, Y., 2008. Effect of different green-cover patterns on soil secondary salinification in Qinwangchuan irrigated area, Pratacultural Science 25, 20-23.
- Li, W-J., Zhang, Y-Q., Schumann, P., Liu, H-Y., Yu, L-Y., Zhang, Y-Q., Stackebrandt, E., Xu, L-H. and Jiang, C-L., 2008. *Nesterenkonia halophila* sp. nov., a novel moderately halophilic and alkalitolerant actinobacterium isolated from a saline soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 1359-1363.
- Ling, H. M., Jia, H. X., Zhang, Y. F., 2003. Effect of salt restraint on *Vicia villosa* in secondary salinization land. Acta Prataculturae Sinica, 12, 58-62.
- Liu, W. Y., Jiang, L. L., Guo, C. J., and Yang, S. S., 2010. *Terribacillus aidingensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from Xinjiang, China International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 2940-2945.
- Long, M. R., Zhang, D. F., Yang, X. Y., Zhang, Y. M., Zhang, Y. G., Zhang, Y. M., Zhu, H., Li, W. J., 2013. *Halomonas nanhaiensis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a sediment sample from the South China Sea. Antonie van Leeuwenhoek, 103, 997-1005.
- Louws, F. J., and Cuppels, D. A., 2001. Appendix A; Molecular Techniques. Pages 321-333 in Schaad NW, Jones JB and Chun W. editors. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third edition. American Phytopathological Society Press, St Paul Minnesota USA.
- Luo, H. Y., Wang, Y. R., Miao, L. H., Yang, P. L., Shi, P. J., Fang, C. X., Yao, B., Fan, Y. L., 2009. *Nesterenkonia albas* sp. nov., an alkaliphilic actinobacterium isolated from the black liquor treatment system of a cotton pulp mill. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 863-868.
- Ma, J., Wang, Z., Stevenson, B. A., Zheng, X., Li, Y., 2013. An inorganic CO₂ diffusion and dissolution process explains negative CO₂ fluxes in saline/alkaline soils. Scientific Reports, 3, 2025.
- Maas, E.V., 1990. Crop salt tolerance, Agricultural Salinity Assessment and Management, American Society of Civil Engineers, 262-304.
- Mace, J. E., Amrhein, C., Oster, J. D., 1999. Comparison of gypsum and sulfuric acid for sodic soil reclamation. Arid Soil Research and Rehabilitation, 13, 171-188.

- Madigan, M., T., Martinko, J., M., 2010. Brock Biology of Microorganisms. Southern Illinois University Carbondale, 992.
- Margesin, R., and Schinner, F., 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5, 73-83.
- Marschner, H., 1995. Functions of mineral nutrients: macronutrients, Mineral nutrition of higher plants. Academic Press Limited; London.
- Martins, L. F., and Peixoto, R. S., 2012. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Hypersaline Environments. *Brazilian Journal of Microbiology*, 865-872.
- Mayak, S., T. Tirosh, and Glick, B. R., 2004. Plant growthpromoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 565-572.
- Meli, S. M., Porta, V. L., Puglisi, E., Del Re, A. A. M., and Gennaril, M., 2006. Description of Chemical and Biological Soil Characteristics of Two Fields Subjected to Different Agricultural Management under Mediterranean Conditions. *Italian Journal of Agronomy*, 3,379-3863.
- Mellado, E., Garcia, M. T., Nieto, J. J., Kaplan, S., and Ventosa, A., 1997. Analysis of the genome of *Vibrio costicola*: pulsed-field gel electrophoretic analysis of genome size and plasmid-content. *Systematic and Applied Microbiology*, 20, 20-26.
- Mellado, E., Garcia, M. T., Roldan, E., Nieto, J. J., and Ventosa, A., 1998. Analysis of the genome of the gramnegative moderate halophiles *Halomonas* and *Chromohalobacter* by using pulsed-field gel electrophoresis. *Extremophiles* 2, 435-438.
- Meryem, S. S., Yasmin, A., 2013. Effects Of Lead Resistant Bacteria On The Early Growth Of *Vigna Mungo* L. (Hepper) Under Lead Stress. *Pakistan Journal of Botany*, 45, 481-485.
- MIS, 2005. MIS Operating Manual. 125 Sandy Dr. Newark, DE.
- Miller, J. M., James, W., Biddle, W., Virginia, K., Quenzer, K. and James, C. Mc., 1993. Evaluation of biolog for identification of members of the family Micrococcaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 3170-3173.
- Miller, R. M. and Jastrow, J. D., 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. In: Kapulnik, Y., Douds, D. (Eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: physiology and function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 4-18.
- Mkandawire, A. B. C., Mabagala, R. B., Guzman, P., Gepts, P., Gilbertson, R. L., 2004. Genetic Diversity and Pathogenetic Variation of Common Blight Bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoil* var. *fuscans*) Suggests Pathogen Coevolution with the Common Bean. *Phytopathology*, 94, 593-603.
- Mohamadou, B-A., Mbofung, C. M., Barbier, G., 2013. Genotypic and phenotypic diversity among *Bacillus* species isolated from Mbuja, a Cameroonian traditional fermented condiment. *African Journal of Biotechnology*, 12, 1335-1343.
- Monteoliva-Sanchez, M., and Ramos-Cormenzana, A. 1987. Cellular fatty acid composition in moderately halophilic Gram-negative rods. *Journal of Applied Bacteriology*, 62, 361-366.

- Monteoliva-Sanchez, M., Ferrer, M. R., Ramos-Cormenzana, A., Quesada, E., and Monteoliva, M. 1988. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*: effect of growth temperature and salt concentration. *Journal of General Microbiology*, 134, 199-203.
- Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., 1986. Effect of growth temperature and salt concentration on the fatty acid composition of *Flavobacterium halmephilum* CCM2831. *FEMS Microbiology Letters*, 33, 51-54.
- Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., and Russell, N. J., 1993. The effect of salinity and compatible solutes on the biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Pseudomonas halosaccharolytica*. *Journal of General Microbiology*, 139, 1877-1884.
- Monteoliva-Sanchez, M., Ventosa, A., and Ramos-Connenzana, A., 1989. Cellular fatty acid composition of moderately halophilic cocci. *Systematic and Applied Microbiology*, 12, 141-144.
- Moreno, M. L., Pérez, D., García, M. T., Mellado, E., 2013. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*, 3,38–51.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25, 239-250.
- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651-681.
- Mykytczuk, N. C., Wilhelm, R. C., Whyte, L. G., 2012. *Planococcus halocryophilus* sp. nov., an extreme sub-zero species from high Arctic permafrost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1937-1944.
- Nautiyal, C. S., Srivastava, S., Chauhan, P. S., Seem, K., Mishra, A., Sopory, S. K., 2013. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 1-9.
- NCCLS, 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 7th ed. NCCLS document M2-A7. NCCLS, Wayne, Pa.
- Nelson, D. R., Mele, P. M., 2007. Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 340-351.
- Nieto, J. J., Fernandez-Castillo, R., Garcia, M. T., Mellado, E., and Ventosa, A., 1993. Survey of antimicrobial susceptibility of moderately halophilic eubacteria and extremely halophilic aerobic archaeobacteria: utilization of antimicrobial resistance as a genetic marker. *Systematic and Applied Microbiology*, 16, 352-360.
- Niu, G., and Rodriguez, D. S., 2010. Rapid Screening for Relative Salt Tolerance among Chile Pepper Genotypes. *Hortscience* 45, 1265-1269.
- Nourbakhsh, F., and Sheikh-Hosseini, A. R., 2006. A kinetic approach to evaluate salinity effects on carbon mineralization in a plant-residue amended soil. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7, 788–793.
- Oren, A., 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 334-348.
- Oren, A., 2002. *Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer, Dordrecht.

- Oren, A., and Mana, L., 2002. Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. *Extremophiles*, 6, 217-223.
- Oren, A., Gurevich, P., Azachi, M., and Henis, Y., 1992. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. *Biodegradation*, 3, 387-398.
- Oster, J. D., Shainberg, I., Abrol, I. P., 1996. Reclamation of salt affected soil, In: Agassi, M. (Ed.), *Soil erosion, conservation and rehabilitation*. Marcel Dekker, New York, 315–352.
- Osuna, M. B., Casamayor, E. O., 2011. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel protein electrophoresis of freshwater photosynthetic sulfur bacteria. *Current Microbiology*, 62, 111-6.
- Özkan, H., 2009. Erzurum Çevresinde Biyolojik Bozulmaya Neden Olan Heterotrofik Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Pankhurst, C. E., Yu, S., Hawke, B. G., Harch, B. D., 2001. Capacity of fatty acid profiles and substrate utilization patterns to describe differences in soil microbial communities associated with increased salinity or alkalinity at three locations in South Australia. *Biology and Fertility of Soils* 33, 204-217.
- Parida, A. K., and Das, A. B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324-349.
- Parker, R., Flowers, T. J., Moore, A. L., Harpham, N. V. J., 2006. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1109-1118.
- Pastor, J. M., Salvador, m., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., Iborra, J. L., Vargas, C., Nieto, J. J., Cánovas, M., 2010. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances*, 28, 782-801.
- Paul, E. A., Clark, F. E., 1989. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Pérez-Fernandez, M. E., Quesada, E., Galvez, J., and Ruiz, C., 2000. Effect of polysaccharide V2-7, isolated from *Halomonas eurihalina*, on the proliferation in vitro of human peripheral blood lymphocytes. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 22, 131-141.
- Pfiffner, S. M., McInerney, M. J., Jenneman, G. E., and Knapp, R. M., 1986. Isolation of halotolerant, thermotolerant, facultative polymer-producing bacteria and characterization of the exopolymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 1224-1229.
- Porob, S., Nayak, S., Fernandes, A., Padmanabhan, P., Patil, B. A., Meena, R. M., and Ramaiah, N., 2013. PCR screening for the surfactin (*sfp*) gene in marine *Bacillus* strains and its molecular characterization from *Bacillus tequilensis* NIOS11. *Turkish Journal of Biology*, 37, 212-221.
- Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme, K. J. and Jansen, M. A. K., 2007. Stress-induced morphogenic responses, growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12, 98-105.
- Qadir M., Qureshi R. H., Ahmad N., Ilyas, M., 1996. Salt-tolerant forage cultivation on a saline-sodic field for biomass production and soil reclamation, *Land Degradation & Development*, 7 11–18.

- Qadir, M., Oster, J. D., Schubert, S., Noble, A. D., Sahrawat, K. L., 2007. Phytoremediation of sodic and saline-sodic soils. *Advence in Agronomy*, 96,197-247.
- Qadir, M., Tubeileh, A., Akhtar, J., Larbi, A., Minhas, P. S., Khan, M. A., 2008. Productivity enhancement of salt-affected environments through crop diversification, *Land Degradation and Development* 19, 429-453.
- Qvist, J., Ortega, G., Tadeo, X., Millet, O., Halle, B., 2012. "Hydration dynamics of a halophilic protein in folded and unfolded states," *The journal of Physical Chemistry B*,116, 3436-3444.
- Rabie, G. H., Almadini, A. M., 2005. Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* under salinity stress. *African Journal of Biotechnology*, 4, 210-222.
- Ramadoss, D., Lakkineni, V. K., Bose, P., Ali, S., and Annapurna, K., 2013. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*, 2, 1-6.
- Rashidian, E., and Goodfellow, M., 2003. Sequence-based differentiation of strains in the *Streptomyces cyaneus* species-group. *Iran Journal of Biothecnology*, 1, 224-234.
- Rasouli, F., Pouya, A. K., Karimian, N., 2013. Wheat yield and physico-chemical properties of a sodic soil from semi-arid area of Iran as affected by applied gypsum. *Geoderma*, 193, 246-255.
- Ravyts, F., Steen, L., Goemaere, O., Paelinck, H., De Vuyst, L., Leroy, L., 2010. The application of staphylococci with flavour-generating potential is affected by acidification in fermented dry sausages. *Food Microbiology*, 27, 945-954.
- Reed, M. L. E., and Glick, B. R., 2005. Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 1061-1069.
- Reichenauer, T. G., Panamulla, S., Subasinhge, S., Wimmer, B., 2013. Soil amendments and cultivar selection can improve rice yield in salt-influenced (tsunami-affected) paddy fields in Sri Lanka. *Environmental Geochemistry and Health*, 31,573-579.
- Rengasamy, P., 2006. Soil salinity and sodicity, In: Stevens, D., Kelly, J., McLaughlin, M., Unkovich, M. (Eds.), *Growing crops with reclaimed wastewater*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 125-138.
- Rengasamy, P., 2010. Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology* 37, 613-620.
- Rietz, D. N., Haynes, R. J., 2003. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 845-854.
- Rodriguez, H. and Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17, 319-339.
- Roesler, M., and Müller, V., 2002. Chloride, a new environmental signal molecule involved in gene regulation in a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus halophilus*. *Journal of Bacteriology*, 184, 6207-6215.
- Roesler, M., Wanner, G., and Müller, V., 2000. Motility and flagellum synthesis in *Halobacillus halophilus* are chloride dependent. *Journal of Bacteriology*, 182, 532-535.

- Rosswall, T., 1976. The internal cycle between vegetation, microorganisms and soils. *Ecological Bulletin* 22, 157-167.
- Ruiz-Garcia, C., Quesada, E., Martinez-Checa, F., Llamas, I., Urdaci, M. C. & Bejar, V., 2005. *Bacillus axarquiensis* sp. nov. and *Bacillus malacitensis* sp. nov., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1279-1285.
- Russell, N. J., 1993. Lipids of halophilic and halotolerant microorganisms, pp. 163-210 In: Vreeland R.H., and Hochstein, L.I. (Eds.), *The biology of halophilic bacteria*. CRC Press, Boca Raton.
- Russell, N. J., Adams, R., Bygraves, J., and Kogut, M. 1986. Cell envelope phospholipid changes in a moderate halophile during phenotypic adaptation to altered salinity and osmotic stress. *FEMS Microbiology Review*, 39, 103-107.
- Rusznayk, A., Vladár, P., Molnár, P., Reskóné, M. N., Kiss, G., Márialigeti, K., Andrea, K., Borsodi, A. K., 2008. Cultivable bacterial composition and BIOLOG catabolic diversity of biofilm communities developed on *Phragmites australis*. *Aquatic Botany*, 88, 211-218.
- Salamone, G. I. E., Hynes, R. K., Nelson, L. M., 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 404-411.
- Sanchez-Porro, C., Amoozegar, M. A., Rohban, R., Hajighasemi, M., Ventosa, A., 2009. *Thalassobacillus cyri* sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2565-2570.
- Sánchez-Porro, C., Kaur, B., Mann, H., Ventosa, A., 2010. *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60, 2768 -2774.
- Sanchez-Porro, C., Yilmaz, P., de la Haba, R. R., Birbir, M., Ventosa, A., 2011. *Thalassobacillus pellis* sp. nov., a moderately halophilic, Gram-positive bacterium isolated from salted hides. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 1206-1210.
- Sandoval, M., Celis, J., Pedreros, L., 2013. Chemical Remediation of an Agricultural Soil: a Case Study of the Tsunami-Affected Area of Chile. *Water, Air and Soil Pollutions*, 224,1590.
- Saravanakumar, D., Samiyappan, R., 2007. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1283-1292.
- Sardinha, M., Muller, T., Schmeisky, H., Joergensen, R. G., 2003. Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. *Applied Soil Ecology* 23, 237-244.
- Sasser, M., 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis in methods in phytobacteriology (Z. Klement, K. Rudolph, and D. Sands, eds.). *Akademia Kiado, Budapest*, 199-204.
- Schimel, J. P., Scott, W. J., Killham, K., 1989. Changes in cytoplasmic carbon and nitrogen pools in a soil bacterium and a fungus in response to salt stress. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1635-1637.

- Schlöter, M., Abmus, B., and Hartmann, A., 1995. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. *Biotechnology Advances*, 13, 75-90.
- Seurinck, S., Verstraete, W., Siciliano, S., 2003. The Use of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region-PCR and Repetitive Extragenic Palindromic-PCR Analyses of *Escherichia coli* Isolates to Identify non-point Fecal Sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4942-4950.
- Shakir, A. S., Rehman, H., Khan, N. M., and Qazi, A. U., 2011. Impact of Canal Water Shortages on Groundwater in the Lower Bari Doab Canal System in Pakistan. *Pakistan Journal of Engineering and Applied Sciences*, 9, 87-97.
- Sharples, G. J., Lloyd, R. G., 1990. A Novel Repeated DNA Sequence Located in the Intergenic Regions of Bacterial Chromosome. *Nucleic Acids Research*, 18, 6503-6508.
- Shaw, R. J., 1999. Soil salinity, electrical conductivity and chloride, In: Peverill, K.I., Sparrow, L.A., Reuter, D.J. (Eds.), *Soil analysis: An interpretation manual*. CSIRO Publishing, Melbourne, Victoria, Australia, 129-145.
- Shelef, O., Gross, A., Rachmilevitch, S., 2013. Role of plants in a constructed wetland: current and new perspectives. *Water*, 5, 405-419.
- Shibli, R. A., Kushad, M., Yousef, G. G., Lila, M. A., 2007. Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. *Plant Growth Regulation*, 51, 159-169.
- Silveira, K. R., Ribeiro, M. R., Oliveira, L. B., Heck, R. J., Silveira, R. R., 2008. Gypsum-saturated water to reclaim alluvial saline sodic and sodic soils. *Scientia Agricola, Soils and Plant Nutrition*, 65, 1-11.
- Singh, N. K., Raichand, R., Kaur, I., Kaur, C., Pareek, S., Mayilraj, S., 2013. *Exiguobacterium himgiriensis* sp. nov., a novel member of the genus *Exiguobacterium*, isolated from the Indian Himalayas. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103, 789-796.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., and Denef, K., 2004. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research*, 79, 7-31.
- Skerratt, J. H., Nichols, P. D., Mancuso, C. A., James, S. R., Dobson, S. J., McMeekin, T. A., and Burton, H., 1991. The phospholipid ester-linked fatty acid composition of members of the family *Halomonadaceae* and genus *Flavobacterium*: a chemotaxonomic guide. *Systematic and Applied Microbiology*, 14, 8-13.
- Smyth, E., 2011. Selection and analysis of bacteria on the basis of their ability to promote plant development and growth. PhD Thesis, University College Dublin.
- So, H. B., Aylmore, L.A.G., 1993. How do sodic soils behave? The effects of sodicity on soil physical behavior. *Australian Journal of Soil Research* 31, 761-777.
- Spaepen, S., and Vanderleyden, J., 2010. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, doi: 10.1101/cshperspect.a001438.
- Sparks, D. L., 1995. *Environmental chemistry of soils*. New York, Academic Press, 0195070119.
- Sudo, H., Burgess, J. G., Takemasa, H., Nakamura, N., and Matsunaga, T., 1995. Sulfated exopolysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytica*. *Current Microbiology*, 30, 219-222.

- Sun G. R., Yan X. F., Li, J., 2002. Effects of the growth of cultivated *Puccinellia tenuiflora* on physical characteristics of alkali soil, *Acta Prataculturae Sinica*, 10179-183.
- Suresh, K., Mayilraj, S., Bhattacharya, A., and Chakrabarti, T., 2007. *Planococcus columbae* sp. nov., isolated from pigeon faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1266-1271.
- Sutton, G. C., Russell, N. J., and Quinn, P. J., 1991. The effect of salinity on the phase behaviour of total lipid extracts and binary mixtures of the major phospholipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1061, 235-246.
- Şahin, F., 1999. Mikroorganizmaların yağ asitleri profillerine göre tanısı (Microbial Identification System). Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu. Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 66, Erzurum-Türkiye.
- Şahin, F., Abbasi, P. A., Lewis, I. M. L., Zhang, J. and Miller, S. A., 2003. Diversity Among Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis* from lettuce. *Phytopathology*, 93, 64-70.
- Tanji, K. K., 1990. Agricultural Salinity Assessment and Management. ASCE Manuals and Reports on Engineering Practice, No 71, New York, NY, 10017, USA.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulse-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2233-2239.
- Thiemann, B., and Imhoff, J. F., 1991. The effect of salt on the lipid composition of *Ectothiorhodospira*. *Archives of Microbiology*, 156, 376-384.
- Tiago, I., Chung, A. P., and Verissimo, A., 2004. Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7378-7387.
- Todorova, S., Kozhuharova, L., 2010. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1207-1216.
- Truper, H. G., and Galinski, E. A., 1990. Biosynthesis and fate of compatible solutes in extremely halophilic phototrophic eubacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 75, 247-254.
- Turan, M. A., Hassan, A., Taban, N., and Taban, S., 2009. Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations on maize plant. *African Journal of Agricultural Research* 4, 893-897.
- Turan, M., Gulluce, M., Wirén N., Şahin, F., 2012.. Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 6 818-826.
- Ukani, H., Purohit, M. K., George, J. J., Paul, S., Singh, S. P., 2011. HaloBase: development of database system for halophilic bacteria and archaea with respect to proteomics, genomics and other molecular traits. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 70, 976-981.
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., Saxena, A. K. and Singh, D. P., 2012. Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidants status of wheat plant under saline condition. *Plant Biology*, 14, 605-611.

- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., and Swings, J., 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics, *Microbiological Reviews*, 60, 407-438.
- Vargas, C., Tegos, G., Drainas, C., Ventosa, A., and Nieto, J. J., 1999. Analysis of the replication region of the cryptic plasmid pHE1 from the moderate halophile *Halomonas elongata*. *Molecular and general genetics*, 261, 851-861.
- Vassilev, N., Eichler-Lobermann, B., and Vassileva, M., 2012. Stress-tolerant P-solubilizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 851-859.
- Vauterin, L., Rademaker, J. and Swings, J., 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* 90, 677-682.
- Ventosa, A., 2006. Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. In: Logan NA, Lappin-Scott HM, Oyston PCF (eds) *Prokaryotic diversity: mechanisms and significance*.
- Ventosa, A., Nieto, J. J., and Oren, A., 1998. Biology of aerobic moderately halophilic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 504-544.
- Ventosa, A., Quesada, E., Valera, F. R., Berraquero, F. R., and Cormenzana, A. R., 1982. Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Rods. *Journal of Geeneral Microbiology*, 128, 1959-1968.
- Verbruggen, N. and Hermans, C., 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35, 753-759.
- Vukadonovic, V., and Rengel, Z., 2007. Dynamics of sodium in saline and sodic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38, 2077-2090.
- Waisel, Y., 1972. *Biology of halophytes*. Academic Press, New York, New York, USA.
- Wang, Y., Qian, P. Y., 2009. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *Plos One*, 4, e7401.
- Waturangi, D. E., Joanito, I., Yogi, Y., and Thomas, S., 2012. Use of REP-and ERIC-PCR to reveal genetic heterogeneity of *Vibrio cholerae* from edible ice in Jakarta, Indonesia. *Gut Pathogens*, 2,4.
- Wayne, L. G., H. W. B., Engel, C., Grassi, W., Gross, J., Hawkins, P. A., Jenkins, W., Kappler, H. H., Kleeberg, I., Krasnow, E. E., Nel, S. R., Pattyn, P. A., Richards, S., Showalter, M., Slosarek, I., Szabo, I., Tarnok, M., Tsukamura, B., Vergmann, and E. Wolin-sky. 1976. Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for pigment, urease, resistance to sodium chloride, hydrolysis of Tween 80, and b-galactosidase. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24, 412-419.
- Werner, A. D. and Lockington, D. A., 2004. The potential for soil salinization above aquifers influenced by seawater intrusion. *Proceedings of the 13th International Soil Conservation Organization Conference*, Brisbane, Australia, 1-6.
- Wichern, J., Wichern, F., Joergensen, R. G., 2006. Impact of salinity on soil microbial communities and the decomposition of maize in acidic soils. *Geoderma* 137, 100-108.
- Wilson, K., 1997. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2.4.1-2.4.5.

- Winn, W., S. Allen, W., Janda, E., Koneman, G., Procop, P., Schreckenberger, and Woods, G., 2006. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Wohlfarth, A., Severin, J., and Galinski, E. A. 1990. The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. Journal of General Microbiology, 136, 705-712.
- Wright, S. F. and Upadhyaya, A., 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil, 198, 97-107.
- Yang, J. Y., Huo, Y. Y., Xu, X. W., Meng, F. X., Wu, M., and Wang, C. S., 2010. *Oceanobacillus neutriphilus* sp. nov., isolated from activated sludge in a bioreactor. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 2409-2414.
- Yang, J., Kloepper, J., Ryu, C. M., 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends in Plant Science, 14, 1-4.
- Yao, L., Wu, Z., Zheng, Y., Kaleem, I., Li, C., 2010. Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. European Journal of Soil Biology, 46, 49-54.
- Yıldırım, A., 2006. Harran Ovasında Farklı Tuz içerikli Topraklarda Yetiştirilen Pamuk Bitkisinde Tuzluluğun Mikroelement Alımı Üzerine Etkisi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa.
- Yıldırım, E., Turan, M., Donmez, M. F., 2008. Mitigation of salt stress in radish (*Raphanus sativus* L.) by plant growth promoting rhizobacteria. Roumanian Biotechnological Letter, 13, 3933-3943.
- Yılmaz, A.M., 2001. Konya Ovası Tuzlu-Sodyumlu Toprakların Islahı Üzerine Bir Araştırma, Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Yapılar Ve Sulama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Konya.
- Yoon, J. H., Kang, S. J., Schumann, P., and Oh, T-K., 2010. *Jeotgalibacillus salarius* sp. nov., Isolated from a Marine Saltern, and Reclassification of *Marinibacillus marinus* and *Marinibacillus campisalis* into the Genus *Jeotgalibacillus* as *Jeotgalibacillus marinus* comb. nov. and *Jeotgalibacillus campisalis* comb. nov., Respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 15-20.
- Yoon, J-H., Kang, S-J., Lee, S-Y., Oh, K-H., Oh, T-K., 2010. *Planococcus salinarum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern, and emended description of the genus *Planococcus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 754-758.
- Yu, L., Yan-Hong, F., Heng-Wen, Z., Pei, S., Jian-Zhong, W., and Zhong-Jun, Y., 2011. The Analysis of ERIC-PCR Genomic Polymorphism of Salmonella Isolated Strains in Pig Carcass. Journal of Animal and Veterinary advances, 10, 1694-1698.
- Yuan, B. C., Li, Z. Z., Liu, H., Gao, M., Zhang, Y. Y., 2007. Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. Applied Soil Ecology, 35, 319-328.
- Yue, H. T., Mo, W.P., Li, C., Zheng, Y. Y., Li, H., 2007. The salt stress relief and growth promotion effect of Rs-5 on cotton. Plant Soil, 297, 139-145.

- Zahir, A. Z., Ghani, U., Naveed, M., Nadeem, S. M., and Asghar, H. N., 2009. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Archives of Microbiology*, 191, 415-424.
- Zahir, Z. A., Arshad, M. and Frankenberger, W. T., 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advance in Agronomy*, 81, 97-168.
- Zhang, H., Kim, M. S., Sun, Y., Down, S. E., Shi, H., Pare, P. W., 2008. Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of sodium transporter HKT1. *Molecular plant-microbe interactions*, 21,737-744.
- Zhang, J. L., Flowers, T. J., Wang, S. M., 2010. Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. *Plant and Soil*,326,45-60.
- Zhang, J-S., Xi, C., Shen, Y-G., Shen, S-Y., 2001. A two component gene (NTHK1) encoding a putative ethylene-receptor homolog is both developmentally and stress regulated in tobacco. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 815-824.
- Zhang, Y. J, Zhou, Y., Ja, M., Shi, R., Chun-Yu, W. X., Yang, L. L., Tang, S. K., Li, W. J., 2012. *Virgibacillus albus* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from Lop Nur salt lake in Xinjiang province, China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102, 553-560.
- Zhang, Y., Yang, Y .X., Zhou, X. M., Jia, Y. H., Nie, L. L., Zhang, Y., Chen, S. Y., Wang, J. A., Liu, Z. Q., 2011. The continuous accumulation of Na⁺ in detached leaf sections is associated with over-expression of NTHK1 and salt tolerance in poplar plants. *Functional Plant Biology*. 38, 236-245.
- Zhao Kefu, Hai Fan, Xingyu Jiang and Jie Song. 2002. Improvement and utilization of saline soil by planting halophytes. *Chinese Journal of Application and Environmental Biology*. 8, 31-35.
- Zhao, Y. C., Qin, J. H., 2005. The effects on forage to ameliorate and fertilize saline-alkali soil in the Hexi area. *Acta Prataculturae Sinica*, 14, 63-66.
- Zhilina, T. N., Garnova, E. S., Tourova, T. P., Kostrikina, N. A., and Zavarzin, G. A., 2001. *Halonatronum saccharophilum* gen. nov., sp. nov.: a new haloalkaliphilic bacterium of the order *Haloanaerobiales* from Lake Magadi. *Mikrobiologiya*, 70, 77-85.
- Zhilina, T. N., Tourova, T. P., Kuznetsov, B. B., Kostrikina, N. A., and Lysenko, A. M., 1999. *Orenia sivashensis* sp. nov., a new moderately halophilic anaerobic bacterium from Lake Sivash lagoons. *Mikrobiologiya*, 68: 519-527.
- Zhilina, T. N., Zavarzin, G. A., Detkova, E. N., and Rainey, F. A., 1996. *Natroniella acetigena* gen. nov. sp. nov., an extremely haloalkaliphilic, homoacetic bacterium, a new member of *Haloanaerobiales*. *Current Microbiology*, 32, 320-326.
- Zhu, D., Wang, C., Tanabe, S. H., Zhang, W., and Nagata, S., 2011. The synthesis and role of hydroxyectoine in halophilic bacterium *Halomonas ventosae* DL. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 2254-2260.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Malatya Akçadağ ilçesinde doğdu. İlk ve Orta öğrenimini Malatya’da tamamladı. 1998 yılında girdiği İnönü Üniversitesi Malatya Meslek Yüksek Okulunda Endüstriyel Elektronik Programından mezun oldu. 2002 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü tamamladı. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. 2010 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Doktora eğitime başladı. Halen Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında mikrobiyoloji uzman olarak çalışmaktadır.