



HALOFİLİK BAKTERİLERDE EKZOPOLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİMİ

Hilal BAŞER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2020

Hilal BAŞER tarafından hazırlanan “HALOFİLİK BAKTERİLERDE EKZOPOLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİMİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Doç. Dr. Seniha Selcen BABAOĞLU AYDAŞ

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Filiz KARA

Endüstri Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Başkent Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 07/02/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hilal BAŞER
07/02/2020

HALOFİLİK BAKTERİLERDE EKZOPOLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİMİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hilal BAŞER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2020

ÖZET

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi, Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan halofilik bakterilerden *Halomonas aquamarina* NB2 ve *Halobacillus trueperi* NB7, NB8, NB9, NB10, NB11 suşları kullanılarak, kültür ortamlarındaki ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri belirlenmiştir. Suşların EPS üretim miktarlarının 15-55 mg/L arasında değiştiği tespit edilmiştir. Kültür ortamında en iyi gelişim gösteren ve yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan halofilik bakteri suşu seçilerek (NB7-47 mg/L), farklı tuz konsantrasyonları (%5, %10, %15, %17,5, %20, %25 ve %30) ve farklı karbon kaynaklarının (sükroz, glikoz, galaktoz, mannoz) EPS üretimine etkisi tespit edilmiştir. NB7 suşunda, tuz konsantrasyonlarının farklılığına bağlı olarak EPS üretiminin azaldığı (14-40 mg/L) ve farklı karbon kaynaklarından sükrozlu ortamda en yüksek (488 mg/L), galaktozlu ortamda ise en düşük (144 mg/L) EPS üretimi gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada, bakterilerin kültür ortamındaki biyofilm aktivitesi araştırılmıştır. NB2, NB7, NB8, NB9 ve NB10 suşlarının güçlü biyofilm üreticisi, NB11 suşunun orta düzey biyofilm üreticisi olduğu bulunmuştur. Son olarak, bakterilerden izole edilen EPS'ler liyofilize edilerek, l-EPS'lerin emülsifikasyon aktivitesi, toplam karbohidrat ve protein miktarları belirlenmiştir. l-EPS'lerin kullanılan hidrokarbonları %3-26 arasında değişen oranlarda emülsifiye ettiği gözlenmiştir. l-EPS'lerin toplam karbohidrat miktarının, kültür ortamındaki EPS üretim miktarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (448-841 mg/L). l-EPS'lerin en düşük protein miktarı l-EPS_{NB8} ve l-EPS_{NB9} (0,022 mg/mL), en yüksek protein miktarı l-EPS_{NB7}, l-EPS_{NB10} ve l-EPS_{NB11} (0,028 mg/mL)'lerde bulunmuştur. Sonuç olarak, kullanılan halofilik bakterilerin kontaminasyon önleyici olarak çevre uygulama alanlarında, elde edilen l-EPS'lerin ise yüksek verime sahip olması ve protein miktarının düşük olması nedeniyle biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilme potansiyeline sahip oldukları sonucuna varılmıştır.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Halofilik bakteri, Ekzopolisakkarit, Emülsifikasyon, Biyofilm
Sayfa Adedi : 77
Danışman : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

EXOPOLYSACCHARIDE (EPS) PRODUCTION OF HALOPHILIC BACTERIA

(M. Sc. Thesis)

Hilal BAŞER

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2020

ABSTRACT

In this study, *Halomonas aquamarina* NB2 and *Halobacillus trueperi* NB7, NB8, NB9, NB10, NB11 strains from halophilic bacteria in the Biotechnology Laboratory Culture Collection of Gazi University, were used to determine EPS productions in culture media. EPS production of the strains ranged between 15-55 mg/L. One strain that had the highest EPS production capacity and the best development in the culture medium (NB7-47 mg/L) was selected. The influence of different concentrations of salt (5, 10, 15, 17.5, 20, 25, 30%) and different carbon sources (sucrose, glucose, galactose, mannose) on EPS production was determined. When NB7 strain was grown in medium containing different concentrations of salt, the EPS production was changed (14-40 mg/L). In NB7, the highest level of EPS production was observed in the medium with sucrose (488 mg/L) while the lowest level of EPS production was observed in the medium with galactose (144 mg/L). Also, in this study, biofilm activities of these strains were examined. It was found that NB11 strain was an intermediate biofilm producer, where NB2, NB7, NB8, NB9, and NB10 strains were strong biofilm producers. Finally, the EPSs were lyophilized, and the emulsification activity, total carbohydrate, and protein quantities of l-EPSs were demonstrated. Emulsification activity of l-EPSs on hydrocarbons was found in the range of 3-26%. The total carbohydrate amount of l-EPSs was determined to be higher than the amount of EPS production in the culture medium (448-841 mg/L). The lowest and highest protein contents of l-EPSs were found in the l-EPS_{NB8} and l-EPS_{NB9} (0.022 mg/mL) and l-EPS_{NB7}, l-EPS_{NB10} and l-EPS_{NB11} (0.028 mg/mL), respectively. It was concluded that the halophilic bacteria can be utilized as a contamination prevention in the environmental application areas and l-EPSs can be used in the biotechnological applications due to its high yield and low protein contents.

Science Code : 20309
Key Words : Halophilic bacteria, Exopolysaccharide, Emulsification, Biofilm
Page Number : 77
Supervisor : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her türlü bilgi ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a çok teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında bana yardım eden tüm Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Araştırmalarım sırasında bilgisini, tecrübesini ve fikirlerini eksik etmeyen değerli abim Doç. Dr. Alper GÜRBÜZ'e, her zaman beni destekleyen, hayatım boyunca yanımda olan değerli aileme, bana destek veren, sabır gösteren, hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili eşime çok teşekkür ederim. Bu tez çalışması, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2018-14 kodlu projeyle desteklenmiştir. Maddi katkılarından ötürü Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Hipersalin Habitatlar	3
2.2. Halofilik Mikroorganizmalar	6
2.2.1. Halofilik bakteriler	8
2.2.2. Halofilik arkeler	9
2.2.3. Halofilik mikroorganizmaların osmotik adaptasyonları	11
2.2.4. Halofilik mikroorganizmaların uygulama alanları.....	12
2.3. Ekzopolisakkarit (EPS)	15
2.3.1. EPS'nin genel özellikleri	15
2.3.2. EPS biyosentezi.....	16
2.3.3. EPS'nin kullanım alanları	19
2.3.4. EPS üreten halofilik mikroorganizmalar.....	20
2.4. Biyofilm	21
2.4.1. Biyofilm yapısı.....	23
2.5. Emülsifikasyon.....	25

Sayfa

3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler	27
3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler.....	27
3.2. Metot	28
3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve muhafazası.....	28
3.2.2. Halofilik bakterilerin EPS üretimlerinin belirlenmesi	29
3.2.3. Halofilik bakterilerden EPS izolasyonu	31
3.2.4. Farklı tuz konsantrasyonlarında EPS üretimlerinin belirlenmesi.....	31
3.2.5. Farklı karbon kaynaklarında EPS üretimlerinin belirlenmesi.....	32
3.2.6. Halofilik bakterilerde biyofilm aktivitesi.....	32
3.2.7. l-EPS'lerin emülsifikasyon aktivitesi.....	33
3.2.8. l-EPS'lerde protein miktar tayini	33
3.2.9. l-EPS'nin moleküler ağırlığının belirlenmesi	35
3.2.10. İstatistiksel analizler.....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	37
4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	37
4.2. Halofilik Bakterilerin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi	37
4.3. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında EPS Üretiminin Belirlenmesi	38
4.4. Farklı Karbon Kaynaklarında EPS Üretiminin Belirlenmesi	39
4.5. Halofilik Bakterilerin Biyofilm Üretim Karakteristikleri	40
4.6. l-EPS'lerin Emülsifikasyon Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	42
4.7. l-EPS'lerde Protein Miktarının Belirlenmesi	44
4.8. l-EPS Moleküler Ağırlığı	44
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57

Sayfa

KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	77

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Halofilik mikroorganizmaların gruplandırılması.....	7
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan halofilik bakterilerin türlerine göre dağılımı	27
Çizelge 3.2. Medyum C besiyeri içeriği	28
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan halofilik bakterilerin gelişme koşulları	28
Çizelge 3.4. Biyofilm üretiminin belirlenmesinde kullanılan sınır değerleri (cut off) ...	33
Çizelge 4.1. Bakterilerin EPS üretimi ve l-EPS'lerin toplam karbohidrat miktarları.....	38
Çizelge 4.2. Halofilik bakterilerin biyofilm üretim karakteristikleri	41
Çizelge 4.3. l-EPS'lerin ve kontrol gruplarının emülsifikasyon aktiviteleri (%)	43

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. %10'dan fazla NaCl konsantrasyonlarında gelişebilen mikroorganizmaların filogenetik dağılımı	7
Şekil 2.2. <i>Archaea</i> kingdomu.....	9
Şekil 2.3. Ekstremofillerde EPS biyosentezi için monosakkarit öncüllerini arttırmada potansiyel mühendislik hedefleri.....	18
Şekil 2.4. Biyofilm oluşumunun aşamaları.....	23
Şekil 3.1. Glikoz standart eğrisi.....	30
Şekil 3.2. BSA ile hazırlanan protein standart eğrisi.....	34
Şekil 4.1. NB7 suşunun farklı tuz konsantrasyonlarında EPS üretim miktarları.....	39
Şekil 4.2. NB7 suşunun farklı karbon kaynaklarında EPS üretim miktarları	40
Şekil 4.3. l-EPS'lerin protein miktarları	44

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Ölü Deniz (The Dead Sea).....	4
Resim 2.2. Büyük Tuz Gölü (The Great Salt Lake).....	5
Resim 2.3. Güneş Gölü (The Solar Lake).....	5
Resim 3.1. Glikoz standart çözeltileri.....	30
Resim 3.2. 0,0025-0,05 mg/mL BSA içeren standartlar.....	34
Resim 3.3. Protein miktar tayini için spektrofotometrede okunmaya hazır suşlar	35
Resim 4.1. Çalışmadaki bazı halofilik bakterilerin ışık mikroskop görüntüleri	37
Resim 4.2. NB7 suşunun farklı karbon kaynaklarına göre renk değişimi	40
Resim 4.3. Biyofilm okumaya hazır mikroplate	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
<	Küçük
±	Artı eksi
≤	Küçük veya eşit
°C	Derece Celsius
g	Gram
g/L	Gram/Litre
L	Litre
M	Molar
mg/L	Miligram/Litre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
pH	Asitlik bazlık birimi
w/v	Ağırlık/hacim
w/w	Ağırlık/ağırlık
μL	Mikrolitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

ABC	ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı
BSA	Bovin Serum Albumin
DDT	Dikloro Difenil Trikloroethan
dk	Dakika
EPS	Ekzopolisakkarit
GSL	Great Salt Lake (Büyük Tuz Gölü)

Kısaltmalar**Açıklamalar****GSYİH**

Güanozin Difosfat

I-EPS

Liyofilize Ekzopolisakkarit

OD

Optik Dansite (Optik Yoğunluk)

PTS

Fosfotransferaz Sistemi

rpm

Devir sayısı

SECSize-Exclusion Chromatography
(Büyükölçekçe Ayırma Kromatografisi)**sp**

Tür

TCA

Trikloroasetik asit

TDP

Timidin Difosfat

UDP

Üridin Difosfat

UNAM

Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi

wa

Water activity (Su Aktivitesi)

1. GİRİŞ

Halofilik mikroorganizmalar, hipersalin koşullarda yaşayabilen ve gelişmeleri için yüksek konsantrasyonlarda tuza (2-5 M NaCl) ihtiyaç duyan mikroorganizmalardır. Halofiller, Dünya’da aşırı tuzlu ortamlarda, çok yoğun tuzlu suların bulunduğu kurak bölgelerde, denizlerin derin bölgelerinde, denizden tuz elde etmek için oluşturulmuş yapay tuzlalarda ve salamura besinlerde bulunmaktadır (Baltacı, Yüksekdağ ve Aslım, 2017).

Ekzopolisakkaritler (EPS), dallanmış veya tekrar eden birimlerde şekerler/şeker türevleri ve diğer karbonhidrat olmayan bileşenlerden oluşmaktadır (Sethi, Mohanty ve Pattanayak, 2019). Ekzopolisakkaritlerin (EPS), bakteri hücreleri, pH, ışık yoğunluğu, sıcaklık veya osmotik stres gibi biyotik veya abiyotik elverişsiz koşullara karşı koruduğu düşünülmektedir (Caggianiello, Kleerebezem ve Spano, 2016). EPS moleküler zincirleri, geniş bir moleküler ağırlığa sahiptir. Farklı mikroorganizmalar hücreler arası sinyal iletimi, moleküler tanıma, predasyona karşı koruma, yapışma, biyofilm oluşumu, rahat bir hücre dışı ortam yapımı ve patojenik işlemler gibi çeşitli fonksiyonlara sahip çok çeşitli EPS’leri sentezleyebilir (Moriello ve diğerleri, 2003; Nicolaus ve diğerleri, 1999; Wang, Salem ve Sani, 2019). EPS’ler, yüzeylere yapışma ve biyofilm oluşturma, hücrelerin birbirine yapışması ve tanınması gibi mekanizmalarda yer almaktadır (Caggianiello ve diğerleri, 2016).

EPS’lerin bakteriyi olumsuz çevre şartlarından koruması ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlaması özelliklerinden yola çıkarak bilim insanları halofilik mikroorganizmaların, benzersiz EPS’lerinin yeni biyoteknolojik işlemlerde değerli bir kaynak sağlayacağını yaygın olarak kabul etmektedirler (Gu, Jiao, Wu, Liu ve Chen, 2017; Yang, Shao, Du, He ve Chai, 2018; Wang ve diğerleri, 2019). Yararlı biyoaktif fonksiyonlar, biyouyumluluk ve biyobozunurluk sunan benzersiz ve kompleks kimyasal yapıları nedeniyle, mikrobiyal EPS’ler kimya, gıda, ilaç, kozmetik, çevre, tarım ve tıp gibi çok çeşitli uygulama alanlarında; emici maddeler, yağlayıcı maddeler, toprak düzenleyiciler, kozmetik, ilaç dağıtım araçları, tekstil ürünleri, yüksek dayanıklı malzemeler, emülgatörler ve viskoziteler olarak kullanılırlar (Mata ve diğerleri, 2006; Kumar, Mody ve Jha, 2007; Nicolaus, Kambourova ve Oner, 2010; Freitas, Alves ve Reis, 2011; Llamas, Amjres, Mata, Quesada ve Bejar, 2012; Delbarre-Ladrat, Sinquin, Lebellenger, Zykwinska ve Collic Jouault, 2014; Ates, 2015).

Çevre sorunlarının artmasıyla birlikte aranan biyoteknolojik çözümler hayatımızın bir parçası olmaktadır. Dünyada birçok alanda tuz birikmesi nedeniyle aşırı tuzluluk görülmekte ve bu da alanları verimsiz hale getirebilmektedir. Aşırı tuzcul ortamlar birçok canlı için yaşamın mümkün olmadığı alanlardır. Bu nedenle, bu salin alanlarda yaşayan halofilik mikroorganizmaların özellikleri ve bu ortamlara adapte olabilmesinin yeteneklerinin araştırılması önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında, Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan ve moleküler tanımlamaları yapılmış halofilik bakterilerden elde edilen l-EPS'lerin kontaminasyon önleyici gibi çevre uygulama alanlarında ve emülsifiye ajanı olarak biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda,

1. Kültür ortamlarındaki bakterilerin EPS üretim miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi,
2. Bakteriler arasından iyi gelişim gösteren ve yüksek EPS üretim kapasitesine sahip suşun seçilmesi,
3. Optimum EPS üretiminin gerçekleştiği tuz konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, seçilen suşun farklı tuz konsantrasyonlarının (%5, %10, %15, %17,5, %20, %25 ve %30) EPS üretimine etkisinin belirlenmesi,
4. EPS üretim miktarını arttıracak olan karbon kaynaklarını belirlemek amacıyla, seçilen suşun farklı karbon kaynaklarının (sükroz, glikoz, galaktoz, mannoz) EPS üretimine etkisinin belirlenmesi,
5. Kültür ortamındaki bakterilerin biyofilm aktivitesinin araştırılması,
6. Kültür ortamındaki bakterilerden EPS'lerin izole edilmesi ve izole edilen EPS'lerin liyofilize edilmesi (l-EPS),
7. l-EPS'lerin toplam karbohidrat miktarlarının belirlenmesi,
8. l-EPS'lerin emülsifikasyon aktivitesinin araştırılması,
9. l-EPS'lerin protein miktarının belirlenmesi
10. Seçilen suşdan elde edilen l-EPS'nin moleküler ağırlığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Hipersalin Habitatlar

Dünyada milyonlarca hektar alan tuzludur ve sulanan tarım arazilerinin yaklaşık %25'ini tuzlu alanlar oluşturmaktadır (Ali ve diğerleri, 2016a). Thalassohalin ortamları olarak da bilinen hipersalin ortamlar, çoğunlukla tuzlalara benzemekte ve sodyum klorür (NaCl) varlığına hâkim olan 300'den fazla Pratik Tuzluluk Birimleri (PSU) (Oren, 2002; Gunde-Cimerman, Zalar, de Hoog and Plemenitas, 2000) seviyesinde minerallerin birikintilerinden kalan deniz suyunun buharlaşmasından kaynaklanmaktadır (Oren, 2002). Hipersalin habitatlar, bölgenin ekstremit, adaptasyon, jeolojik ve coğrafi konumlarına göre sınıflandırılabilir (Ali ve diğerleri, 2016a).

Toprak habitatları heterojendir ve toprakta bulunan çeşitli derinliklerdeki mineraller ve tuzluluktan oluşurlar (Ali ve diğerleri, 2016b). Toprak tuzluluğu, su tuzluluğundan çok daha fazla değişkendir. Tuzlu topraklarda bir dizi bakteri türünün bulunduğu bildirilmiştir, ancak bu tür habitatlarda bulunan baskın türler *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* ve *Alcaligenes* cinslerine aittir (Oren, 2002). İspanya'daki Alicante'de, rizosfer ve hipersalin toprağının %5-10 NaCl içerdiği bildirilmiştir. Bölgede bulunan kserofit bitkileri ve tuz konsantrasyonu aralığı, toprağın tuzluluğuna bağlı olmayan izole edilmiş organizmaların büyümesini sağlamıştır (Amasha, 2018). Bitkilerin yarısı, yüksek tuzluluk durumunda (%5–15 NaCl) en iyi şekilde büyürken, diğer yarısının düşük tuzluluk koşullarında (%1 NaCl) en iyi şekilde geliştiği tespit edilmiştir (Oren, 2002).

Hipersalin ekosistemleri aşırı stres koşullarına dayanabilen ve ticari öneme sahip yeni metabolitler üretebilen mikrobiyal popülasyonlara eşsiz habitatlar sunar (Farig, Yasmin ve Jamil, 2019). Tuzluluk oranı %3 veya daha fazla olan su, tuzlu su olarak tanımlanmıştır (Ali ve diğerleri, 2016a). Ölü Deniz (The Dead Sea) thalassohalin habitatının tipik bir örneğidir (Resim 2.1). Birçok çalışma Ölü Deniz'de bulunan halofilik mikroorganizmaları karakterize etmiştir ve bulunanlar arasında *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium* (Ventosa, Nieto ve Oren, 1998), *Halobacterium*, *Halococcus*, *Clostridium* (Oren, 1983), *Sporohalobacter* (Oren, Pohla ve Stackebrandt, 1987) ve *Halomonas* (Huval, Latta, Wallace, Kushner ve Vreeland, 1995) ve yeni bir tür *Halobaculum gomorrense* (Oren,

Gurevich, Gemmell ve Teske, 1995) aerob veya fakültatif aerob olan bakteriler yer almaktadır (Ali ve diğerleri, 2016a).



Resim 2.1. Ölü Deniz (The Dead Sea), İsrail (İnternet: Live Science, 2016)

Ölü Deniz'in aksine, Amerika'daki Büyük Tuz Gölü (Great Salt Lake-GSL)'nün yüksek bir pH değeri vardır ve yüksek oranda (%33) NaCl içermektedir (Resim 2.2) (Ali ve diğerleri, 2016a). GSL, üç gruba ayrılan bakteri topluluğuna sahiptir. Birincisi aşırı tuzluluğa bağlı olarak GSL'nin kuzey tarafında çoğunlukla bulunan *Halococcus* ve *Halobacterium* cinslerinin üyelerini içeren arkebakterilerdir. GSL'de *Halorhabdus utahensis* (Waino, Tindall ve Ingvorsen, 2000) ve *Methanohalophilus muhii* (DasSarma ve diğerleri, 2001) gibi türler de bulunur. İkincisi, aeroblar veya fakültatif aeroblar olabilen ve *Halomonas variabilis* (Fendrich, 1988), *Pseudomonas halophila* (Fendrich, 1988), *Chromohalobacter marismortui* (Ventosa, Gutierrez, Garcia ve Ruiz-Berraquero, 1989), *Halobacillus trueperi* ve *Halobacillus litoralis* (Spring, Ludwig, Marquez, Ventosa ve Schleifer, 1996) türlerini içeren bakterilerdir. Son olarak, üçüncü grup *Haloanaerobium praevalens* (Zeikus, Hegge, Thomson, Phelps ve Langworthy, 1983) ve *Desulfocella halophila* (Brandt, Patel ve Ingvorsen, 1999) yaygın olarak bulunan anaerobik bakterilerdir (Ali ve diğerleri, 2016a).



Resim 2.2. Büyük Tuz Gölü (The Great Salt Lake), Amerika (İnternet: Westminster College, 2019)

Mısır'da ki Güneş Gölü (The Solar Lake), güneş ışınlarının gölün dibine ulaşmasından dolayı Güneş Gölü ismini almıştır (Resim 2.3) (Ali ve diğerleri, 2016a). Yaz aylarında, göldeki su tamamen oksijenli olur, ancak sonbaharda bu katmanlaşır. Gölün tuzluluğu, yüksek oranda buharlaşmaya bağlı olarak yaz aylarında %20 oranında NaCl'e yükselmektedir. Bu gölden izole edilen halofilik mikroorganizma topluluğunu, *Halobacteriaceae*, *Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Spirochaeta halophila* ve *Desulfovibrio halophiles*'i oluşturmaktadır (DasSarma ve diğerleri, 2001; Ali ve diğerleri, 2016a).



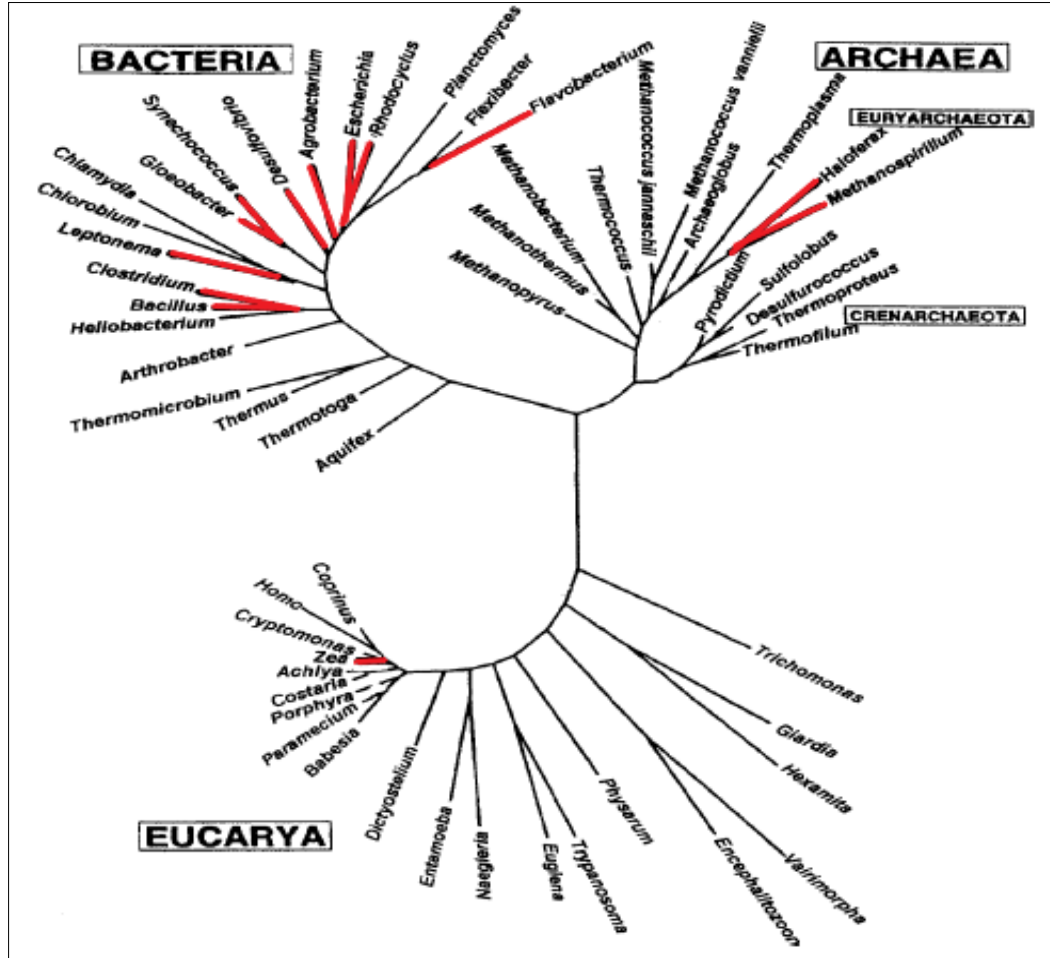
Resim 2.3. Güneş Gölü (The Solar Lake), Mısır (İnternet: Travel, 2011)

Pediococcus halophilus (Del Moral, Quesada ve Ramos-Cormenzana, 1987), *Halobacterium* sp., *Halococcus* sp. (Thongthai ve Suntainalert, 1991), *Halomonas salina* (Vilhelmsson, Hafsteinsson ve Kristjansson, 1996), *Pseudomonas beijerinckii*, *Halomonas halodenitrificans* ve *Vibrio costicola* (DasSarma ve diğ erleri, 2001) d ahil bazı halofilik bakteriler tuzlanmış gıdaların yaygın bulaşıcılarıdır (Ali, Kanhayuwa, Rachdawong ve Rakshit, 2013).

2.2. Halofilik Mikroorganizmalar

Halofilik organizmalar hipersalin habitatlarda yaşayan, yüksek tuz konsantrasyonunun oluşturduğu osmotik basıncı dengeleyen ve tuzun olumsuz etkilerini engelleyebilen prokaryot ve ökaryot organizmalardır. Halofilik çevre şartlarında yaşayabilen ve gelişmeleri için yüksek konsantrasyonlarda tuza (2-5 M NaCl) ihtiyaç duyan mikroorganizmalara halofilik mikroorganizma denilmektedir. Halofiller Dünya’da aşırı tuzlu ortamlarda, çok yoğun tuzlu suların bulunduğu kurak bölgelerde, denizlerin derin bölgelerinde, denizden tuz elde etmek için oluşturulmuş yapay tuzlalarda ve salamura besinlerde bulunmaktadır (DasSarma ve Arora, 2001; Yavuztürk, 2005; Baltacı, 2013). Halofilik mikroorganizmalar, hipersalin koşulları altında metabolizmalarını çoğaltabilir ve yürütebilir. Çevrelerine adaptasyonun bir sonucu olarak, çeşitli karakterlerini ve tuzluluğa alışma stratejilerini geliştirmişlerdir (Gu ve diğ erleri, 2017).

Halofilik mikroorganizmaların habitatları genel olarak sodyum klorür n doyma noktasına ulaştığı hipersalin bölgeleri ve sodyum klorür n doyma noktasından düşük ılımlı konsantrasyonların olduğı bölgeleri kapsar (Mutlu ve diğ erleri, 2008; Abanoz, 2016). Pek çok organizmada osmotik stres ölümc l olmasına rağmen, üç ana domainin de yüksek tuzluluğa adapte olmuş üyeleri mevcuttur (Madern, Ebel ve Zaccai, 2000; Baltacı, 2013). Aşırı tuzlu şartlarda yaşayan mikroorganizmaların üç ana domaine ait soy ağacı Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. %10'dan fazla NaCl konsantrasyonlarında gelişebilen mikroorganizmaların filogenetik dağılımı (Oren, 2002) Halofilik ve halotolerant mikroorganizmalara ait dallar kırmızı renk ile gösterilmiştir

Her organizma az oranda da olsa tuza ihtiyaç duymaktadır. Buna göre canlılar tuz ihtiyaçlarına göre farklı gruplara ayrılmaktadır (Çizelge 2.1) (Kushner, 1985; Demirci, 2009; Abanoz, 2016).

Çizelge 2.1. Halofilik mikroorganizmaların gruplandırılması

Kategori	Tuz konsantrasyonu (M)	
	Aralık	Optimum
Halofilik olmayan	0–1,0	<0,2
Hafif halofiller	0,2–2,0	0,2–0,5
Ilımlı (Orta) halofiller	0,4–3,5	0,5–2,0
Sınırdaki ekstrem halofiller	1,4–4,0	2,0–3,0
Ekstrem halofiller	2,0–5,2	>3,0
Halotolerantlar	>1,0	<0,2

Tuzluluk arttıkça mikrobiyal çeşitlilik azalmaktadır (Benlloch, Acubasm, Lopez-Lopez, Luz ve Rodriguez-Valera, 2001). Halotolerant mikroorganizmalar, yüksek konsantrasyonlarda hem tuz varlığında hem de yokluğunda büyüeyebilenlerdir (Amoozegar, Safarpour, Noghabi, Bakhtiary ve Ventosa, 2019). Yüksek tuz konsantrasyonlarında arke türleri yaygınlık gösterirken, halotolerant bakteriler ise orta derecede NaCl konsantrasyonlarında daha baskınlardır. Halofilik organizmalar *Eucarya* domaininde *Archaea* ve *Bacteria* domainlerindeki kadar yaygın değildir (Nicholson, 2005; Baltacı, 2013).

2.2.1. Halofilik bakteriler

Halofiller arasında halofilik bakteriler en çok izole edilen, bildirilen, çalışılan ve karakterize edilen mikroorganizmalardan biridir (Oren, 2010). Ortamdaki tuz konsantrasyonuna göre, pigmentli ve pigmentli olmayan çeşitli formlarda bulunurlar. Halofil olmayan ya da normal bakterilere göre yavaş gelişirler. Ekstrem halofilik bakteriler aşırı derecede yavaş büyürler (Ventosa, 2006). Orta dereceli halofilik bakteriler, %5-20 (w/v) tuz içeren ortamlarda en iyi şekilde büyüyenler olarak tanımlanır ve hipersalin habitatlarında yaşayan en önemli Eubacteria grubunu oluştururlar (Ollivier, Caumette, Garcia ve Mah, 1994; Qian ve diğerleri, 2018; Wang ve diğerleri, 2019).

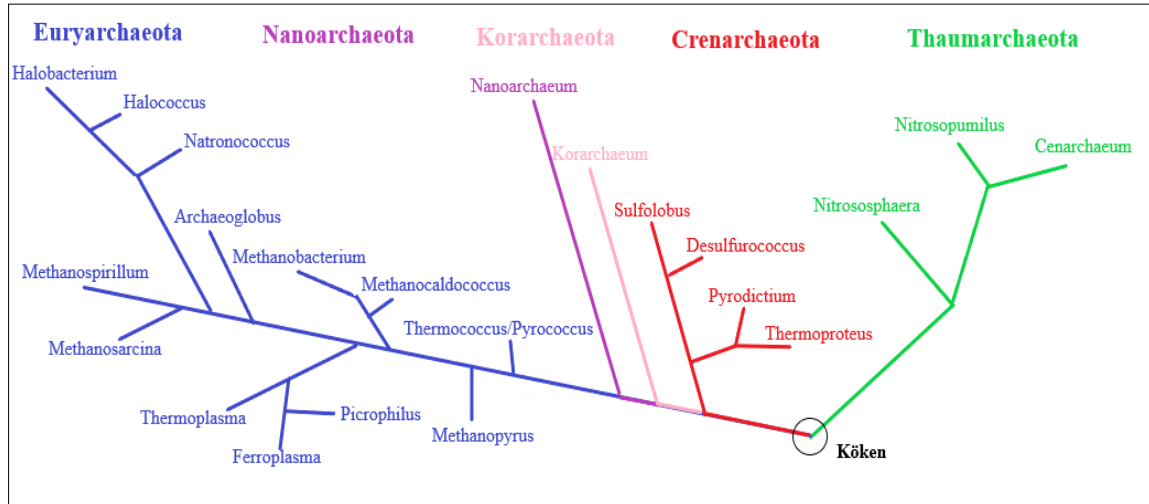
Halofilik bakterilerin hücre zarındaki değişiklikler tuza bağlı olarak, fosfolipit tiplerinde ve lipidlerdeki yağ asitleri düzeyinde olduğu bildirilmiştir. Halofilik bakterilerin pek çok türünde majör polar lipidler fosfotidiletanolamin (PE) ve fosfotidilkolin (PC)'dir. Tuzluluk arttıkça negatif yüklü fosfolipitler (PC, Cl) nötral fosfolipitlerin konsantrasyon seviyelerine kadar artmaktadır (Oren, 2002). Yüksek NaCl konsantrasyonlarınca yüklü fosfolipitlerin sayıca artışı, güçlendirilmiş hidrofilik eğilimden kaynaklanmaktadır. Hidrofilik hücre yüzeyi yüksek tuzluluktaki suyun az olduğu ortamlarda hücreyi su molekülü açısından daha çekici hale getirir ve bu sayede hücrenin su kaybetmesini önler (Mutlu, 2006).

Bacteria domainindeki pek çok halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar filogenetik alt gruplarda dağılmıştır. *Proteobacteria*'nın farklı kolları halofilik temsilciler içerir, çoğunlukla halofilik olmayan çok yakın akrabaları bulunmaktadır. Bazı iyi bilinen bakteri filumları şunlardır; *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* ve *Bacteroidetes*'dir. Gram pozitif bakterilerden olan (*Firmicutes*) halofillerde, hem aerobikler (*Bacillus* ve benzer organizmalar) hem de anaerobikler bulunur. İki aile

(familya) içeren *Halanaerobiales* ordosu tek anaerobik halofilik mikroorganizma içeren takımdır (Rainey ve diğerleri, 1995; Oren, 2011; Baltacı, 2013; Yılmaz, 2019).

2.2.2. Halofilik arkeler

Halofilik arkealar, yüksek tuz koşulları altında hayatta kalmak için adapte olmuş eşsiz mikroorganizmalardır ve bunlar tarafından üretilen biyomoleküller olağandışı özelliklere sahip olabilir (Singh ve Singh, 2017). *Archaea* kingdomu *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* ve *Korarchaeota* olmak üzere üç temel phylumdan oluşmaktadır (Şekil 2.2). Arkeler genellikle bir mikrondan küçük canlılardır. Hücre zarındaki temel lipidler gliserol dieterleri ve gliserol tetraeterleridir. Arkeler lipidlerinde gliserol ile hidrofobik yan zincirler arasında eter bağları mevcuttur. Arkelerdeki sitoplazmik zarın her iki yüzeyi de hidrofilik, iç kısımları ise hidrofobik karakterdedir. Lipitler yağ asitleri içermez, hidrofobik yan zincirler yağ asitleri ile aynı fonksiyona sahiptirler. Arke lipidleri beşkarbonlu bir hidrokarbon olan izopren çoklu birimlerinden oluşur. Bu bakımdan bakteri ve ökaryot zarları ile aynı özellik göstermektedirler. Bakterilerin hücre duvarında peptidoglikan tabaka varken, arkelerde pseudopeptidoglikan, polisakkarit, protein ve S- tabakası vardır. Pseudopeptidoglikan tabakası N-asetilglukozamin ve N-asetiltalosaminuronikasit birimlerinden oluşmaktadır. Bakterilerdeki peptidoglikan bağlar arasında β -1,4 glikozidik bağlar varken pseudopeptidoglikan tabakada β -1,3 glikozidik bağlar bulunur (Baltacı, 2013; Madigan ve diğerleri, 2017).



Şekil 2.2. *Archaea* kingdomu (Madigan ve diğerleri, 2017)

Karotenoidlerin gün ışığının zararlı etkilerine karşı halofilik mikroorganizmalarda koruma görevi olduğu belirlenmiştir (Dundas ve Larsen, 1962). Birçok halobakteri C₅₀ karotenoidlerin (bakteriyoruberin) varlığından dolayı kırmızı veya turuncu renkli ve indüklenebilir diğer ışığa duyarlı pigmentlerdir, bazı türler ise renksiz gaz veziküllerine sahip beyaz, opak veya pembe pigmentlidir. Oksijen miktarının yetersiz olduğu koşullarda bakteriyorodopsin denilen bir sitoplazmik membran proteini sentezler (Oren, 2002; Madigan ve diğerleri, 2017). Bakteriyorodopsin, *Halobacterium salinarum*'da mor membran yamaları olarak keşfedilmiştir (Ovchinnikov, Abdulaev, Feigina, Kiselev ve Lobanov, 1979; Singh ve Singh, 2017). *H. salinarum* hücrelerinin sitoplazmik membranında, bakteriyorodopsinle birlikte en az 3 rodopsin daha bulunmaktadır. Halorodopsin K⁺ (katyonu) için Cl⁻ (anyonunu) hücre içine pompalayan ve ışık aracılığıyla çalışan bir klorür (Cl⁻) pompasıdır (Madigan ve diğerleri, 2017).

Arkeler yüksek pH, aşırı tuzluluk, yüksek ya da düşük soğukluk, yüksek basınç gibi ekstrem şartlarda hayatta kalabilen organizmalardır. Bu nedenle hipersalin bölgelerde *Archaea* domainine ait türler ile daha çok karşılaşmaktadır. *Archaea* domaininde yer alan, *Euryarchaeota*'ya ait olan *Halobacteriaceae* familyası *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Halobaculum*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natrialba* ve *Natromonas* cinslerine ait olan halofilik karakterdeki *Archaea* türlerini içermektedir (Benlloch ve diğerleri, 2001).

Türkiye'deki çalışmalarda Tuz Gölü'nden izole edilen halofilik mikroorganizmalar *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum* ve *Halomicrobium* cinslerine aittir (Mutlu, 2006). Türkiye'deki tuzcul alanlarda en yaygın olan türün *Haloarcula* cinsine ait türleri içerdiği bildirilmiştir (Birbir ve diğerleri, 2007; Birbir ve Sesal, 2003). Balıkesir Ayvalık Tuzlası'ndan *Halobacillus karajensis*, *Halobacillus alkaliphilus*, *Salegentibacter salarius*, *Halomonas alimentaria*, *Halomonas denitrificans*, *Actinopolyspora erythraea*, *Chromohalobacter beijerinckii* ve *Marinobacter algicola* türleri izole edilmiştir (Yılmaz, 2019). Çamaltı Tuzlası'ndan *Bacillus safensis*, *Marinobacter aquaticus*, *Halomonas fontilapidosi*, *Halobacillus locisalis*, *Salicola salis* ve *Halobacillus halophilus* türleri belirlenmiştir (Hassanzadehdiznabi, 2019).

2.2.3. Halofilik mikroorganizmaların osmotik adaptasyonları

Kurak topraklar, mikroorganizmaların büyümesi için elverişli koşulların olmadığı yerler olmasına rağmen, bu bölgeler ekstremofilik mikroorganizmalarda, özellikle de halofilik olanlar için uygun bir habitatır. Halofilik mikroorganizmalar, metabolizmaları için farklı katyonlar veya anyonlar kullanarak yüksek tuz konsantrasyonlarında (0,6–5 M NaCl) büyür, yüksek tuzlu ortamlarda yaşamak için farklı, benzersiz stratejiler ve mekanizmalar geliştirirler (Edbeib, Wahab ve Huyop, 2016; Garcia ve diğerleri, 2018).

Her organizma yaşayabilmek için tuza ihtiyaç duysa da halofilik organizmalar daha yüksek tuz konsantrasyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonları ise yüksek turgor basıncına sebep olmaktadır. Mikroorganizma hangi ortamda olursa olsun hücre sitoplazmasını dış çevre ile izotonik tutmak zorundadır. Ortamdaki yüksek osmotik basınca karşı halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar farklı adaptasyonlar geliştirmişlerdir. Birincisi, hücre içinde uyumlu çözünenlerin (compatible solutes) biriktirilmesi osmotik strese karşı gelişen adaptasyonlardır. Bunlar hücre içinde kullanılabilir özellikte olan organik maddelerdir. Halofillerde biriktirilen uyumlu çözücüler veya ozmolitlerden bazıları glisin, betain, ektoin, sükroz, trehaloz ve gliseroldür (DasSarma ve Arora, 2001). Bu adaptasyonda kullanılmak üzere birçok mikroorganizma tek bir osmotik çözücü bulundurmaktansa farklı organik çözücülerini bir arada bulundurmaya tercih etmektedir (Galinski, 1995; Baltacı, 2013). Bu yöntemin dezavantajı, ozmolitler iyon biriktirdiğinden önemli miktarda enerji kullanımı gerektirmektedir (Yılmaz, 2019).

Genellikle halofilik mikroorganizmalar azot-içeren glisin betain ve ektoin gibi bileşiklerini sentezlerken (Galinski ve Truper, 1994), tuz toleranslılığı sınırlı olan organizmalar ise trehaloz veya sükroz gibi şekerleri biriktirmektedirler (Gülbenzer ve Ökmen, 2012). Arkelerde glisin betain sadece halofilik metanoarke türü olan *Methanohalophilus portucalensis* tarafından sentezlenmektedir (Lai, Kosorukoff, Burke ve Kwast, 2006). Bu adaptasyon, yüksek tuz konsantrasyonuna karşı kendilerini korumak için değil, hücrenin değişen şartlara karşı geliştirdiği bir mekanizmadır. Bu adaptasyon mekanizmasının her üç domainde de bulunduğu düşünülmektedir (Mutlu, 2006). Hücrenin ihtiyacı olan organik molekülleri karşılamak için devam eden glisin betain katabolizması, osmotik basıncın artmasıyla bloke edilir, sonuçta organik çözünenlerin yıkımı engellenerek osmotik basınç dengelenir (Oren, 1999).

Geliştirilen ikinci adaptasyon hücre içi tuz konsantrasyonunun en az çevresiyle eşdeğer seviyede olmasıdır. Hücre içerisinde K^+ , Na^+ veya Cl^- gibi inorganik iyonlar biriktirilerek osmotik denge sağlanır (“salt-in” stratejisi) (Oren, 2002; Madigan ve diğerleri, 2017). Enerji bakımından bu yöntem daha verimli olsa da halotolerant bakterilerde K^+ birikiminin üst limiti 400 mM’dır. Halofilik bakterilerde NaCl birikiminin üst sınırı, 5 M’dır. Bundan daha fazla tuz konsantrasyonu ise bakterilerde ikincil cevabın gelişmesine neden olmaktadır (Nicholson, 2005; Baltacı, 2013). Bu yaklaşımın avantajı, birinci adaptasyona göre çok daha az enerji için kullanmasıdır. Sonuç olarak, halofilik mikroorganizmalar hipersalin habitatlarda hayatta kalmak için osmotik dengelerini korumalıdır. İzotonik çevrelerde sodyum klorür (NaCl) veya potasyum klorür (KCl) gibi tuzlar biriktirerek konsantrasyonlarını uygun hale getirmişlerdir (Yılmaz, 2019).

Ekstrem halofilik arkelerde, baskın olarak biriken koruyucu potasyum iyonlarıdır (Vreeland, 1987; Gülbenzer ve Ökmen, 2012). Bu mekanizmaya sahip organizmalar, yüksek tuz konsantrasyonuna hücrenin iç protein kimyasını da adapte etmektedirler. Bu adaptasyon ilk kez, *Halobacteriaceae*’de keşfedilmiştir ve tipiktir (Galinski ve Truper, 1994; Martin, Ciulla ve Roberts, 1999; Gülbenzer ve Ökmen, 2012). NaCl’nin bol olduğu ortamlarda halofilik arkeler sitoplazmalarını korumaktadır. *Haloferax volcanii*’de enerjiye bağlı potasyum alımı sistemi ile hücre içinde potasyum ve karşı iyonu Cl^- biriktirilmektedir (Saum ve Müller, 2008).

2.2.4. Halofilik mikroorganizmaların uygulama alanları

Tek başlarına halofilik mikroorganizmalar, en az iki nedenden ötürü çok yararlı mikroorganizmalardır. Birincisi, halofilik mikroorganizmaların karbon, azot, kükürt ve fosforun biyojeokimyasal döngülerine, besin maddelerinin üretimine ve iyonların dengesine katılmasıdır (Rodriguez-Valera, 1993; Ali ve diğerleri, 2016a). İkincisi, basit beslenme biçimleri nedeniyle, sadece karbon üzerinde tek bir enerji kaynağı olarak hayatta kalabilmeleridir (Ali ve diğerleri, 2016a).

Halofilik mikroorganizmalar, osmolit olarak, birtakım potansiyel uygulamalara sahip olan uyumlu çözünen maddelerin üretimi için doğal işlemlere sahiptir. Uyumlu çözünenlerin bazıları, özellikle de betainler, ektoin ve glisin, termal denatürasyon, donma, desikasyon,

yüksek tuzluluk ve düşük a_w 'ya (su aktivitesi) karşı stres koruması olarak kullanılabilir (Lentzen ve Schwarz, 2006). Bu uyumlu çözeltilerin enzim endüstrisinde kullanılması çok ümit vericidir (Ventosa ve Nieto, 1995; Ali ve diğerleri, 2016a).

Halofilik bakteriler sadece tuzlu ortamda yetişen özel mikroorganizmalardır. Halofilikler, enerji elde etmek için atık sudaki organik madde ve besin maddelerini metabolize edebilir. Yüksek tuzluluktaki atık suların halofilik bakteri kullanılarak arıtılması umut vericidir (Lefebvre, Vasudevan, Torrijos, Thanasekaran ve Moletta, 2005; Yang ve diğerleri, 2018). Halofilik mikroorganizmaların ürettikleri biyodopsinlerin uyumlu çözünenler olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Margesin ve Schinner, 2001a; DasSarma ve Arora, 2002; Ali ve diğerleri, 2016a).

Bakteriler ve arkeler dâhil olmak üzere birçok prokaryot, depolama malzemesi olarak poli- β -hidroksialkanat (PHA) biriktirir (Singh ve Singh, 2017). Halofilik mikroorganizmalar, plastiklerin ısıtılmasına uygulanabilen hidroksialkanatlar üretirler (Vreeland ve Huval, 1991). Bakterilerin yanı sıra, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Natrialba*, *Haloterrigena*, *Halococcus*, *Haloquadratum*, *Halorubrum*, *Natronobacterium*, *Natronococcus* ve *Halobacterium* cinslerine ait haloarkeler gibi belirli alan arke üyeleri de PHA üretir (Poli, Di Donato, Abbamondi ve Nicolaus, 2011; Singh ve Singh, 2017). *Haloferax mediterranei*'nin potansiyel bir PHA üreticisi olduğu ve yüksek miktarda ekzopolisakkarit ürettiği bildirilmiştir (Oren, 2010).

Halofilik mikroorganizmalar biyoremediasyon süreçlerinde de kullanılmaktadır (Ali ve diğerleri, 2014; Margesin ve Schinner, 2001b; Chung, Shin ve Oh, 2009). Besinlerin alımını kolaylaştırdığı ve aynı zamanda halofiller arasında tuz toleransını indükledikleri bulunmuştur (Lentzen ve Schwarz, 2006; Galinski, 1993; Margesin ve Schinner, 2001b). Bu mikroorganizmalar toprak ve su tuzluluğu için bir gösterge olarak da kullanılabilir (Ramos-Cormenzana, 1993). Onlardan elde edilen ekstraselüler enzimler yüksek molekül ağırlıklı biyopolimerleri daha basit bileşiklere dönüştürebilmektedir (Ali ve diğerleri, 2016a).

Halofilik arkelerin potansiyel biyoteknolojik uygulamalara sahip olması, tuzla-kristalizasyon göllerinde ısınmayı ve evaporasyonun artırılmasıyla tuz üretiminin de artırılmasında kullanılabilecek olmasındandır (Grant, Gemmell ve McGenity, 1998; Litchfield, 2002; Özcan, 2004). Bakteriiodopsinin, güneş ışığından elektrik üretimi, deniz

suyundan tuz giderimi, kimyasal ve biyosensör gibi alanlarda da kullanılabileceği rapor edilmiştir (Kushner, 1985; Hough ve Danson, 1989; Margesin ve Schinner, 2001a; Özcan, 2004).

Halofilik arkeler, yüksek tuz koşulları altında hayatta kalma açısından mükemmel mikroorganizmalardır. Bu adaptasyon çoğu zaman doğrudan endüstriyel uygulamaları sınırlandırmaktadır. Ancak, Halofilik arkeler, hazırlanan tuzlu fermente gıdalarda yüksek konsantrasyonlardaki tuz eklenmesini gerektiren endüstriyel işlemlerde doğrudan uygulanmaktadır. Tuzlu fermente gıdalar örneğin balık sosu, Doğu Asya ülkelerinde çok popülerdir. Balık sosu, Güneydoğu Asya'daki insanların %80'inden fazlası için önemli bir besin çeşididir. Geleneksel olarak hazırlanan bu yiyecekler, çok miktarda tuzun (3-5 M) ilavesiyle yapılır ve 6-12 ay boyunca doğal olarak mayalanmaya bırakılır (Singh ve Singh, 2017).

Haloferax ve *Haloarcula* cinslerine ait bazı türlerin, ürettikleri ekzopolisakkarit yoluyla viskozite stabilizasyonu, jelleştirme ajanı, emülsifiyer olarak ve petrolün mikrobiyolojik geri kazanımında kullanılabilecekleri bildirilmiştir (Ventosa ve Nieto, 1995; Parolis ve diğerleri, 1996; Margesin ve Schinner, 2001a; Özcan, 2004).

Halofilik mikroorganizmaların enzimleri sayesinde düşük su aktivitesine adapte olabilmesi, organik sentezlerdeki yüksek özgüllükleri, stereo özgüllükleri ve etkinliklerinden dolayı önemleri artmaktadır (Hough ve Danson, 1989; Danson ve Hough, 1997; Sellek ve Chaudhuri, 1999; Özcan, 2004). Haloarkelerin yetiştirilmesi basit büyüme ihtiyaçları nedeniyle kolaydır. Ayrıca, yüksek tuz, kontaminasyon riskini azaltır (Singh ve Singh, 2017). Halofilik arkelerin hidrokarbonları parçalama yeteneğine sahip olması nedeniyle petrol kazalarında dökülen petrolün biyoremediasyonunda kullanılabilirliği bildirilmiştir (Bertrand, Almallah, Acquaviva ve Mille, 1990; Emerson, Chauhan, Oriel ve Breznak, 1994). Halofilik arkelerin insektisit, lindan, DDT (Dikloro Difenil Trikloroethan) veya triklorofenoller gibi halojenli organik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda üreyebilmesinden dolayı patentli proseslerde kullanıldığı rapor edilmiştir (Margesin ve Schinner, 2001a; Özcan, 2004).

2.3. Ekzopolisakkarit (EPS)

2.3.1. EPS'nin genel özellikleri

Mikrobiyal polisakkaritler, mikrobiyal hücre içindeki pozisyonlarına bağlı olarak sınıflandırılır: (i) teikoik asitler, lipopolisakkaritler (LPS) ve peptidoglikanlar gibi hücre duvarını (yapısal polisakkaritler) oluşturan polisakkaritler; (ii) sitozolik polisakkaritler veya hücre içi polisakkaritler (IPS) olarak adlandırılan, enerji sağlayan ve hücre için karbon kaynağı görevi gören polisakkaritler; ve (iii) ekzopolisakkaritler (EPS), hücre dışı ortama biyofilm veya kapsüller şeklinde salgılanan polisakkaritler (Boels, van Kranenburg, Hugenholtz, Kleerebezem ve De Vos, 2001; Kumar ve diğerleri, 2007; Ruas-Madiedo ve de los Reyes-Gavilan, 2005; Barcelos, Vespermann, Pelissari ve Molina, 2019).

Bakteriyel EPS'ler genellikle immunojeniktirler. *In vitro* çalışmalarda EPS'lerin varlığı katı besi ortamlarında mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilmiştir (Gugliandola, Maugeri, Cacamo ve Stackebrandt, 2003; Yılmaz ve Çelik, 2007). Bakterinin dış yüzeyini kaplayan EPS, kapsül veya slim formda olabilir. Kapsüller EPS bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır (Costerton ve diğerleri, 1994; Yılmaz ve Çelik, 2007). Ekzopolisakkaritler (EPS) bir arada tutulur ve strese karşı dirençli bir komplekste geliştirilir. EPS'ler, dallanmış veya tekrar eden birimlerde şekerler/şeker türevleri ve diğer karbonhidrat olmayan bileşenlerden oluşmaktadır (Bazaka, Crawford, Nazarenko ve Ivanova, 1988; Bomfeti ve diğerleri, 2011; Sethi ve diğerleri, 2019).

Kapsüler polisakkaritler olarak da bilinen ekzopolisakkaritler, yüksek molekül ağırlığına sahip, geri dönüşebilen, çevre dostu, doğal ve oldukça yapışkan bir tabaka oluşturabilen polimerlerdir. Ekzopolisakkaritler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Bakteriyel EPS'ler üretici suşlar tarafından enerji kaynağı olarak kullanılamamaktadır (Ruas-Madiedo, Hugenholtz ve Zoon, 2002; Soyuçok, Ekiz ve Kılıç, 2016; Taşdelen, 2018). Hücre dışı polisakkaritler (ekzopolisakkaritler, EPS'ler), mikroorganizmalar tarafından hipertonic ortamda hayatta kalmak için üretilen en önemli maddeler grubundan biridir (Jindal, Singh ve Khattar, 2011; Gu ve diğerleri, 2017).

EPS, mikrobik hücre için, biyotik ve abiyotik strese karşı koruma gibi önemli işlevler gerçekleştirir (De Baets, Su Laing, François ve Vandamme, 2002; Limoli, Jones, Wozniak ve Cruz, 2015; Nwodo, Green ve Okoh, 2012). Ayrıca üretimi daha fazla direnç sağlar, mikroorganizmanın çevre ile etkileşimini etkiler ve mikroorganizmanın büyümesi için substrat olarak kullanılmasına izin verir (Czaczyk ve Myszk, 2007; Öztürk, Aslım ve Suludere, 2010; Barcelos ve diğerleri, 2019). Hücreleri antimikrobiyal maddelere, kurumaya, bakteriyofajlara, osmotik strese ve antikora karşı korumalarının yanı sıra katı yüzeylere tutunmada ve biyofilm oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir (De Vuyst, Vanderveken, Van de Ven ve Degeest, 1998; Tallon, Bressollier ve Urdaci, 2003; Gu ve diğerleri, 2017).

Endüstriyel gelişmeyle birlikte tatlı su ve hipersalin ortamları, çoğunlukla organik kirleticilerle kirlenir (Oren, Gurevich, Azachi ve Henis, 1992). Halofiller, bu organik bileşiklerin hipersalin koşullarında biyolojik olarak iyileştirilmesinde büyük potansiyele sahiptirler (Zhuang, Han, Bai, Zhuang ve Shim, 2010; Gu ve diğerleri, 2017). Yüksek konsantrasyonlarda yüklü bileşenlere sahip (örneğin, üronik asitler) EPS'ler genellikle metal iyonlarının varlığında jeller oluştururlar ve diğer fiziksel ve kimyasal yöntemlere alternatif olarak kirli ortamlardan ve atık sulardan toksik metalin çıkarılması için büyük bir potansiyele sahiptirler (Wang ve diğerleri, 2019).

2.3.2. EPS biyosentezi

Bakteriler, suş ve çoğalma evresinin farklı aşamalarda değişiklik gösteren koşullara göre polisakkaritler sentezlemektedirler. Hücre dışında olduğu gibi membranda da sentezlenme oluşabilmektedir. Sutherland tarafından önerilen genel modele göre EPS sentezinin gerçekleştiği düşünülmektedir. EPS'lerin oluşumunda; UDP-glikoz-dehidrogenaz, glikozil-transferaz, galaktozil-transferaz 1 ve 2, polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev almaktadır. Heteropolisakkaritler hücre içinde sentezlenir, hücre dışına çıkarılarak hücrenin etrafını sararlar. Bu süreçlerde birçok enzimin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır (Ale ve diğerleri, 2016).

Mikroorganizmalar tarafından üretilen mikrobiyal polisakkaritler, suda çözünebilen iyonik veya noniyonik biyopolimerlerdir. EPS'ler glikozid bağları ile birbirine bağlı olan şeker ünitelerinden oluşmaktadır. Ekzopolisakkaritler iki gruba ayrılır: homopolisakkaritler

(örneğin, dekstran) ve heteropolisakkaritler (örneğin, ksantan ve jellan). Homopolisakkaritler, sadece bir tip monosakkarit tarafından oluşturulurken, heteropolisakkaritler, sentezin hücre üreten kompleks yapılar içerisinde yer aldığı çeşitli monosakkaritlerden oluşur. Bakteriyel EPS'nin çoğunluğu heteropolisakkaritler olarak sınıflandırılabilir (Czaczyk ve Myszka, 2007; De Baets ve diğerleri, 2002; Barcelos ve diğerleri, 2019).

Tek tip monosakkaritler tekrarlayan birimlerden oluşan homopolisakkaritlerin çoğu glukoz ve fruktanlardan oluşmaktadır. Birkaç farklı monosakkarit bulunduran heteropolisakkaritler ise oligosakkaritlerin tekrarı şeklinde oluşmaktadır. Tekrarlanan her birimde iki veya daha fazla monosakkarit bulunduran farklı bir bağ yapısı göstermektedirler. Heteropolisakkaritlerin önemli iki üyesi jellan ve ksantan oluşturmaktadır (Zivkovic ve diğerleri, 2015).

Günümüzde, birçok EPS biyoteknolojik yöntemler ile üretilmektedir. Her EPS kendi biyosentetik yolağına ve dolayısıyla bu yolları etkileyebilecek faktörlere sahiptir. Genel olarak, EPS'nin biyosentezi ve birikmesi, mikroorganizmanın büyüme aşamasından sonra oluşur ve bunların sentezi 4 farklı aşamaya ayrılabilir:

1. Karbon kaynağının asimilasyonu
2. Oligosakkarit tekrarlayan birimlerin sentezi ve glikosiltransferazların ilerleyici aktivitesi
3. Tekrarlayan birimlerden polisakkaritin toplanması
4. EPS'nin hücre dışı ortama ihracı (Becker, 2015; Barcelos ve diğerleri, 2019).

Ekstremofillerin EPS biyosentezinde, EPS üreten mutantın daha yüksek olması, fosfoglukomutaz, UDP-glukoz pirofosforilaz, UDP-glukoz dehidrogenaz ve UDP-galaktoz-4-epimerazın spesifik aktivitelerinin, yabancı tip suşundan daha yüksek olduğu gösterilmiş (Şekil 2.3) ve bunun EPS üretiminin artırılması için potansiyel hedef olabileceği ifade edilmiştir (Li ve diğerleri, 2010; Welman, Maddox ve Archer, 2006; Zhu ve diğerleri, 2014; Wang ve diğerleri, 2019).

cinsinin ürettiği EPS'ye benzerlik göstermiştir (Bouchotroch, Quesada, del Moral, Llamas ve Bejar, 2001; Llamas ve diğerleri, 2012; Biswas, Ganguly ve Paul, 2015). Bununla birlikte, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas*, *Idiomarina* ve *Alteromonas* gibi halofilik bakterilerin çoğu, ana monomerik bileşenler olarak glikoz ve mannozu içeren EPS'yi üretmektedir (Quesada, Bejar ve Calvo, 1993; Bejar, Llamas, Calvo ve Quesada, 1998; Arias ve diğerleri, 2003; Llamas ve diğerleri, 2012; Biswas ve diğerleri, 2015).

2.3.3. EPS'nin kullanım alanları

Günümüzde, ekstremofilik mikroorganizmaların, benzersiz EPS'lerin sentezi dâhil olmak üzere yeni biyoteknolojik işlemlerde değerli bir kaynak sağlayacağı yaygın olarak kabul edilmektedir (Bhalla, Bansal, Kumar, Bischoff ve Sani, 2013; Nicolaus ve diğerleri, 2010; Wang ve diğerleri, 2019). Haloarkelerin ekzopolisakkaritleri üzerindeki çalışmalar, ticari olarak kullanılabilecek bol miktarda hücre dışı polisakkarit üretmek için *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronococcus* ve *Halobacterium* gibi potansiyel halofilik arkeleri ortaya çıkarmıştır (Singh ve Singh, 2017).

Birçok mikroorganizma, ekzopolisakkarit sentezi tarafından işlevsel bir konsorsiyum oluşturmakta ve biyofilm olarak isimlendirilen EPS'ler sentezlemektedirler. Bunlar bakterilerin koloniler halinde oluşmasına, besleyiciler ile konuşlanmış sert yüzeylere tutunmalarına yardımcı yapılardır (Costerton ve diğerleri, 1987; Kumar ve Anand, 1998). Bu EPS'ler ya bakteri yüzeyine tutulu kalır ya da serbest olarak yapışkan bir şekilde ekstraselüler ortamlarda bulunmaktadır. Bu polimerler jel formasyonu, emülsiyon, absorpsiyon, film formasyonu ve koruma gibi rollere sahip olan biyofilm, matriksinin yapı materyalidir (Yılmaz ve Çelik, 2007).

Endüstride, EPS'ler organik/inorganik madde yerine geçen homo- veya heteropolisakkaritlerin farklı ve karmaşık yapıları nedeniyle çok önemlidir; gıda, ilaç, kâğıt, tekstil, boya ve petrol endüstrisinde yaygın olarak kullanılırlar (Sutherland, 1998; 1999). Bununla birlikte, EPS'ler farmakoloji alanında, ilaçlar ve kozmetik ürünlerindeki geniş kullanımları nedeniyle biyoteknoloji endüstrisine daha fazla ilgi çekmiştir. Verimliliği, çok yönlülüğü ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle, EPS'ler biyoteknoloji alanındaki doğal veya sentetik polimerlere göre daha çok tercih edilmektedir (Mata ve diğerleri, 2006; Quesada ve diğerleri, 1993; Sutherland, 1999; Chikkanna, Ghosh ve Kishore, 2018).

Çeşitli ekstrem koşullarda (örneğin, termofilik, halofilik, psikrofilik) gelişebilen bakteri cinsleri ekzopolisakkarit üretimine sahiptirler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, aşırı derecede çeşitli halofilik bakteri popülasyonları bulunabilir. Taksonomik olarak halofiller, kükürt oksidasyonu, denitrifikasyon, fosfat çözünürlüğü, selüloz bozulması ve antimikrobiyal, antiviral ve antioksidan özelliklere sahip EPS üretimi gibi çeşitli fonksiyonel rollere sahip olabilirler (Li ve diğerleri, 2014). Yüksek viskoziteli ve psödoplastik yapıya sahip olan bu gibi halofilik EPS, tuza toleranslı bir yüzey aktif madde görevi görebilir ve yüksek tuzlu yağ birikintilerinde geniş kullanım alanına sahiptir (Arias ve diğerleri, 2003). Viskozite jelleştirici ajanlar ve/veya emülsifiye edici ajanlar ve ayrıca metal bağlayıcılar olarak yaygın şekilde kullanılırlar (Quesada ve diğerleri, 2004; Arias ve diğerleri, 2003; Mata ve diğerleri, 2006; Chikkanna ve diğerleri, 2018).

Ekzopolisakkaritler gıda endüstrisinde, stabilize edici, jelleştirici veya emülsifiye edici özelliklerinden dolayı gıda kalitesini ve dokusunu iyileştirmek için biothickeners (biyokıvamlaştırıcı) olarak kullanılmaktadır (Gandhi, Ray ve Patel, 1997; Gu ve diğerleri, 2017).

Mikroorganizmalar genellikle yüksek bir hücresel yoğunluklu biyofilm ile bağlantılıdır ve stabilitesi polisakkarit zincirleri arasındaki etkileşimler yoluyla EPS'ler tarafından kontrol edilir. Ayrıca, mikrobiyal çeşitlilik, mikrobiyal gelişim için bir substrat oluşturmak üzere EPS tarafından biyolojik olarak desteklenmektedir. Biyofilm oluşumu, hem yapışmada, hem de bakterilerin ortamın fizikokimyasal koşullarına adaptasyonunda önemli bir rol oynar (Donot, Fontana, Baccou ve Schorr-Galindo, 2012; Ates, 2015). Aynı zamanda EPS'nin yüksek su içeriğinden dolayı bazı doğal biyofilmlerdeki kurumayı önlemektedir. Ayrıca biyofilmlerde antimikrobiyal direncin gelişmesinde katkı sağlayan antibiyotiklerin, biyofilm kanallarına girmesini engellemektedir (Donlan, 2002; Yavuz, 2017).

2.3.4. EPS üreten halofilik mikroorganizmalar

Birçok bakteri ve maya cinsleri tarafından üretilen ve karbon kaynakları için yarışan metabolitlerin mikrobiyal EPS oldukları ve bu mikroorganizmaların değişen kompozisyonlarda ekzopolisakkarit ürettikleri rapor edilmiştir (Lee ve diğerleri, 1997; Tavernier ve diğerleri, 1997; Fett, 1993; Yılmaz ve Çelik, 2007). EPS'ler toprak, deniz, tatlı

su gibi farklı çevresel örneklerden izole edebilen birçok bakteri tarafından da sentezlenmektedir (Lee ve diğerleri, 1997; Yılmaz ve Çelik, 2007).

Yapılan bir çalışmada, haloalkalofilik bir *Bacillus* sp. I-450 suşu tarafından pseudoplastik özelliğe sahip EPS üretimi olduğu tespit edilmiştir (Kumar, Joo, Choi, Koo ve Chang, 2004). Başka bir çalışmada da, bir *Bacillus* sp. suşu tarafından üretilen, viskoz ve üstün pseudoplastik özelliğine sahip EPS'nin olduğu rapor edilmiştir (Mitsuda, Miyata, Hirota ve Kikuchi, 1981). Bununla birlikte, en yaygın halofilik üreticiler, *Halomonas* cinsine ait bakterilerden en önemlisi *H. maura*, *H. eurihalina*, *H. ventosae* ve *H. anticariensis*'dir. *Halomonas* suşları tarafından sentezlenen ekzopolisakkaritlerin alışılmadık derecede yüksek bir sülfat içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir (Nicolaus ve diğerleri, 2010).

Yeni ve değerli özelliklere sahip EPS'leri bulmak için, *Haloferax*, *Halococcus*, *Haloarcula*, *Natronococcus*, *Haloterrigena* ve *Halobacterium* gibi haloarkealardan gelen çeşitli EPS'ler izole edilmiş ve araştırılmıştır (Nicolaus ve diğerleri, 1999; Poli ve diğerleri, 2011; Lü ve diğerleri, 2017). *Halobacterium salinarium*, *Haloferax volcanii*, *Halobacterium distributum* ve *Haloarcula* sp. gibi halofilik arkeler tarafından üretilen ekzopolisakkaritler, emülsiyon oluşturucu olarak petrol endüstrisinde kullanılırken, hiperhalofilik arkelerin polimerleri, biyolojik olarak yıkılabilir polimer olarak da kullanılabilmektedir (Kulichevskaya, Milekhina, Borzenkov, Zvyagintseva ve Belyaev, 1998; Gürleyendağ, 2006).

2.4. Biyofilm

Ekzopolisakkaritlerin önemli özelliği biyofilm yapısını oluşturmalarıdır. Biyofilmler, bir yüzeye yapışık, kendi ürettikleri jelsi (polimerik maddenin) bir tabakada yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk şeklinde tanımlanmıştır (Donlan ve Costerton, 2002; Turhan ve Erginkaya, 2019). Bu jelsi tabakada, bakteri hücreleri tarafından üretilen, hücre dışı polimerik yapı, ekzopolisakkarit veya ekzopolimer (EPS) adı verilen polisakkarit tabanlı bir ağ yapısı şeklindedir (Simoës, Simoës ve Vieira, 2010; Sarıkaya, 2014).

Mikrobiyal biyofilmler, doğal habitatlarında baskın olan mikroorganizmaların yaşam tarzıdır. Biyofilm oluşumuna, hücrelerin bir yüzeye yapışması, ardından çoğalması, mikrokolonilerin oluşumu ve hücre dışı polimerik maddelerin (EPS) üretimi ile başlanır.

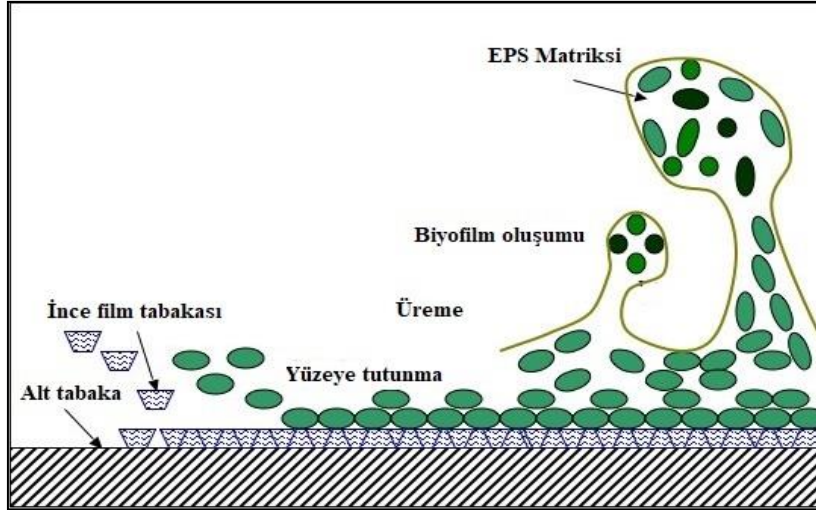
Hücreleri saran EPS matriksi esas olarak proteinlerden, polisakkaritlerden, lipitlerden ve nükleik asitlerden oluşmaktadır (Davey ve O'Toole, 2000; Völkel, Fröls ve Pfeifer, 2018).

Ekstraselüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarit, nükleik asit ve protein içeren, çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde bakteriler gömülü olarak bulunmaktadır. Fosil kayıtlarından alınan bilgiler ışığında prokaryotların 3 milyar yıldan fazla zamandan beri biyofilmler içerisinde yaşamlarını sürdürdükleri bulunmuştur (Donlan, 2002; Ünal, 2011). Proteinler gibi organik moleküllerin, bakterilerin yüzeye tutunmasında önemli bir rol vardır. Biyofilm matriksinde, yüzey proteinleri düzenli bir şekilde oluşur. Bu proteinlerden bazıları, EPS varlığında biyofilm oluşumunu etkilemektedir. Biyofilm Birleşmiş Protein Yapısı (Biofilm associated protein, BAP), organizmanın yüzeye kolonize olmasını ve burada sürekli kalmasını sağlamaktadır (Jiang ve diğerleri, 2011; Sarıkaya, 2014).

Biyofilmler canlı veya cansız yüzeylerde oluşabilmektedir. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları veya doğal akuatik sistemler yer almaktadır. Bakteriler, yüzeye yapışıp biyofilm oluşturduktan sonra o yüzeyden, hafif durulama ile uzaklaştırılmazlar. Hücresel olmayan materyaller mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri biyofilm matrikslerinin içinde bulunabilir (Donlan, 2002; Qurashi ve Sabri, 2012; Filik ve Kubilay, 2019). Biyofilmlerdeki bakteriler birbirleri ile yakın temasta bulunmaktadır. Biyofilm matriksindeki hücrelerin etkileşimini kolaylaştıran besin ve bileşikler yoğunlaşarak, bakteriyi abiyotik ve biyotik koşullardan korur (Turhan ve Erginkaya, 2019).

Biyofilm oluşumu 4 temel aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 2.4) (O'Toole, Kaplan ve Kolter, 2000; Sarıkaya, 2014):

1. Film tabakasının oluşması
2. Planktonik mikroorganizmaların adezyonu
3. Mikroorganizmaların polimerik matriks içinde kolonize olması
4. Mikroorganizmaların biyofilmin üst tabakasından koparak ayrılması



Şekil 2.4. Biyofilm oluşumunun aşamaları (Abdel-Aziz ve Aeron, 2014)

Biyofilmin tek hücreden üstünlükleri Donlan (2002) tarafından dört madde altında toplanmıştır:

1. Biyofilm içerisindeki bakterilerin EPS'leri ortamdaki besin maddelerinin daha konsantre hale gelmesini sağlayarak bu besinlerin kullanımını arttırmaktadır.
2. Biyofilm oluşturan bakteriler çeşitli koşullara ve maddelere karşı (antimikrobiyal maddelere, yüzey gerilimi değiştiren ajanlara, sıcaklığa gibi) dirençlilik geliştirirler.
3. Yüzeyde bulunan bakterilerin tabakalarında katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılanarak antimikrobiyallere karşı mekanik kalkan geliştirerek iç yüzeyde bulunan bakterileri korurlar.
4. Biyofilm parçaları zamanla olgun biyofilmden koparak yeni yüzeylere yayılarak planktonik bir hücrenin tutunmasından daha kolay ve daha hızlı tutunma gerçekleştirirler (Donlan, 2002; Ölmez, 2009).

2.4.1. Biyofilm yapısı

Biyofilme 3 boyutlu olarak bakıldığında, bakterinin yüzeyinde düzensiz dağılmış şekilde polisakkarit yapısında bir matrikstir. Matriksin yoğunluğu ve genişliği sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında olduğu gibi mikroorganizmaların türleri arasında da değişmektedir. Biyofilm mikroskopik olarak bakıldığında, mercan kayalıklar üzerinde arasından kanalların geçtiği, piramit veya mantar şekilli uzantılardan oluşan bir görünümde (Sakarya, 2005; Ünal, 2011).

Biyofilm bileşiminde, su %98'ini oluşturmakta ve diğer maddeler ekstrasellüler matriks yapı ile birbirlerine tutunmaktadırlar. EPS'ler polisakkarit, protein, nükleik asit, teikoik asit, fosfolipit ve diğer polimerik maddelerden oluşmakta ve biyofilmlerin %75-90'ını oluşturmaktadır. Biyofilm içeriğindeki su, bakterinin oluşturduğu EPS'ye bağlanmaktadır. Bakteriyel suşlara bağlı olarak üretilen ekzopolisakkaritlerin içeriği türlere göre değişiklik göstermektedir (Ölmez, 2009; Shi ve Zhu, 2009; Cappitelli, Polo ve Villa, 2014; Gün ve Ekinci, 2009; Bridier, Briandet, Thomas ve Brissonnet, 2011; Turhan ve Erginkaya, 2019).

Biyofilmin; üç boyutlu, EPS ile çevrelenmiş, su kanalları ve katlı bakteri tabakaları içeren bir yapı olduğu bildirilmiştir. Biyofilmde fiziksel yapının EPS ile bağlantılı olduğu, EPS'nin jel ya da viskoelastik davranış sergilemesiyle yapının daha da sağlamlaştığı bildirilmiştir (Hussain, Wilcox ve White, 1993; Leriche, Sibille ve Carpentier, 2000; Gürleyendağ, 2006).

Biyofilmin oluşumuyla bakteriler korunur ve bakterilerin biyofilmin yapısına katılmasıyla genetik değişimlere uğrayabilirler. Bu nedenle, çevre ve gıda teknolojisi gibi alanlarda kullanılan doğal ya da plastik yapıları birçok malzemenin içerdiği filtre materyali, biyofilmin tutunmasına uygun yüzey alanına sahip olmamalıdır (Sekoulov ve Görg, 1995; Gürleyendağ, 2006).

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturan formları ile serbest yaşayan formları arasında farklılıklar görülmesi ve mikroorganizmanın biyofilm oluşturmaya gerektiren durumlarda farklı görüşler olmasına karşılık, biyofilm oluşumunun nedenleri 4 başlık altında toplanabilir (Öztürk, Sakarya, Öncü ve Ertuğrul, 2008; Ünal, 2011): i) savunma, ii) adezyon ve kolonizasyon, iii) yaşanabilir çevre geliştirmek, iv) topluluk oluşturmak.

Halobacterium salinarum R1, yüzeye bağlanabilen ve fizyolojik koşullar altında karakteristik biyofilm yapıları oluşturabilen ekstrem halofilik bir arkedir (Völkel ve diğerleri, 2018). Metallerin etkilerine ilişkin haloarkeler üzerindeki çalışmalar, sıvı kültürlerde gelişen minimum inhibe edici *Halobacterium*, *Haloferax*, *Halorubrum* ve *Haloarcula* konsantrasyonlarının belirlenmesi ile sınırlıdır (Nieto, Ventosa ve Ruiz-Berraquero, 1987), oysa biyofilm oluşumu ve biyofilm kaynaklı direnç ihmal edilmiştir (Völkel ve diğerleri, 2018).

Bakteriyel EPS denizsel ortamlarda, biyofilm oluşturmada ve dış koşullara dayanmada komünitelere yardımcıdır. Halofilik bakterilerin yerleşmek için EPS ürettiği ve osmotik basınca dayandığı bilinmektedir. *Halomonas*, yaygın olarak çalışılan halofilik bakteriler arasında en yaygın EPS üreten cinstir (Mata ve diğerleri, 2006; Squillaci ve diğerleri, 2015; Arun ve diğerleri, 2017).

2.5. Emülsifikasyon

Emülsiyonlar, birbiriyle karışmayan biri polar diğeri nonpolar olmak üzere en az iki sıvıdan birinin diğeri içinde bir emülgatör yardımıyla damlacıklar halinde dağılmasıyla oluşan, homojen görünümlü heterojen dispers (dağınık) sistemlerdir. Emülgatörler hem hidrofilik, hem de hidrofobik kısımları içeren yüzey etkin maddelerdir. Genellikle yağ ve su fazı arasındaki gerilimi düşürerek etki ederler. Emülsiyonların damlacık büyüklüğü, genellikle iç fazdaki globüllerin çapı ile ifade edilir. Damlacık büyüklüğü hazırlanma sırasında kullanılan cihaz ve yöntem ile eklenen emülgatör ve diğer yardımcı maddelere bağlı olarak değişir. Damlacık büyüklüğü ve dağılımı emülsiyonların viskoziteleri ve stabiliteleri için önem taşır. Damlacık büyüklüğü, damlacık yüzey alanı veya damlacık hacmi zamanla doğrusal olarak değişebilmektedir (Hin, 2011).

Kimyasal olarak sentezlenmiş ve bitki kaynaklı emülgatörler, gıda, ilaç, kozmetik ve petrol endüstrisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, mikrobiyal kaynaklardan gelen emülsiyonlaştırıcı maddeler, düşük toksisite, daha yüksek biyolojik bozunabilirlik, daha iyi çevresel uyumluluk, daha yüksek köpürme, yüksek seçicilik ve aşırısı sıcaklık, pH, tuzluluk yeteneğine sahip olma gibi sentetik ürünler üzerinde sunduğu çeşitli avantajlardan dolayı dikkatleri üzerine çekmiştir (Iyer, Mody ve Jha, 2006; Kazak, 2009).

Bakteriler, iki tür polimer olan, yüzey gerilimini ve ara yüzey gerilimini etkin şekilde düşüren düşük moleküler ağırlıklı moleküller ve yüzeylere sıkıca bağlanan yüksek moleköl ağırlıklı polimerler yapabilirler. Bu yüksek moleküler ağırlıklı biyosüşfaktanlar, düşük konsantrasyonlarda çalışan ve önemli ölçüde substrat özgülüğü sergileyen, çok sayıda bakteri tarafından üretilen ve polisakkaritler, proteinler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler gibi yüksek etkili emülsiyon yapıcılardır (Martinez-Checa, Toledo, El Mabrouki, Quesada ve Calvo, 2007; Kazak, 2009).

Su ve hidrofobik bileşikler arasındaki emülsiyonları stabilize edebilen mikrobiyal polisakkaritler, gıda endüstrisinde doğal emülgatörler olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptirler (Freitas ve diğerleri, 2009). Biyoemülsifiyerler yapay ürünlere göre biyobozunurluk, düşük toksisite, seçicilik ve çevresel uyumluluk avantajlarına sahiptirler (Mata ve diğerleri, 2008). Emülsifiye edici aktivitenin, termofiller, psikrofiller, halofiller ve alkalifiller tarafından üretilenler dâhil olmak üzere ekstremofilik EPS'lerde yaygın olduğu bulunmuştur ve hepsi heteropolisakkarit yapıdadırlar (Wang ve diğerleri, 2019).

Petrol hidrokarbonlarıyla kontaminasyonu gidermek için yenilikçi teknolojinin geliştirilmesi ve uygulanması için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Biyolojik emülgatörler, bu kirleticileri kimyasal yüzey aktif cisimlerden çok daha etkili emülsiyon yapabilirler. Iyer ve diğerleri (2006), bir deniz bakterisi *Enterobacter cloaceae* tarafından üretilen EPS 71a ekzopolisakkaritin emülsiyon yapma kabiliyetini araştırmışlardır. EPS 71a'nın emülsiyon haline getirilmiş hekzan, benzen, ksilen, gazyağı, parafin yağı, pamuk tohum yağı, hindistan cevizi yağı, jojoba yağı, hint yağı, yerfıstığı yağı ve ayçiçeği yağın emülsiyon haline getirdiğini ve EPS 71a tarafından stabilize edilen emülsiyonların standart koşullar altında iyi bir raf ömrüne sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Petrol-su karışım sistemlerinde emülsifiyer maddeler dengeli bir aktiviteye sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde emülsan maddeler birçok endüstriyel alanda örneğin petrol boru hatlarının çevresinin temizliğinde, mikrobiyal yollarla petrol ve petrol alınınının arttırılmasında, diğer yandan kremlerde, losyonlarda, sabunlarda, şampuanlarda ve ayrıca besin ve zirai alanda kullanılmaktadır (Rocha, Oliveira, Souza ve Gonçalves, 2006; Kaya, 2008).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan Türkiye'nin çeşitli halofilik bölgelerinden izole edilen ve 16S rRNA bölgesine göre moleküler tanımlamaları yapılan halofilik bakterilerden *Halomonas aquamarina* NB2 ve *Halobacillus trueperi* NB7, NB8, NB9, NB10, NB11 suşları kullanılmıştır (Çizelge 3.1) (Baltacı, 2013).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan halofilik bakterilerin türlerine göre dağılımı

Tür ismi	Suş kodu	İzole edildiği yer
<i>Halomonas aquamarina</i>	NB2	Kaleiçi Yat Limanı (Antalya)
<i>Halobacillus trueperi</i>	NB7	Silivri Limanı (İstanbul)
<i>Halobacillus trueperi</i>	NB8	Silivri Limanı (İstanbul)
<i>Halobacillus trueperi</i>	NB9	Silivri Limanı (İstanbul)
<i>Halobacillus trueperi</i>	NB10	Eminönü-Galata Köprüsü Civarı (İstanbul)
<i>Halobacillus trueperi</i>	NB11	Trabzon Limanı (Trabzon)

3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler

Halofilik bakteri kültürlerinin geliştirilmesinde Medyum C besiyeri kullanılmıştır (bkz. Çizelge 3.2, Oren, 1999). Besiyerinin katı formunun hazırlanılmasında besiyerine %1,5 Agar (Merck) eklenilmiştir.

Çizelge 3.2. Medyum C besiyeri içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)
NaCl	175 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	20 g
K ₂ SO ₄	5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g
Yeast ekstrakt	5 g

Medyum C besiyeri için maddeler tartılıp, distile su ile 1000 mL'ye tamamlanıp, maddelerin çözülmesi sağlandıktan sonra, her bir suş için uygun pH, 3 M HCL ve/veya 3 M NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve muhafazası

Halofilik bakterilerin geliştirilmesinde Medyum C besiyeri kullanılmıştır. Çizelge 3.3'te belirtilen sıcaklık ve sürede iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmalara alınmıştır (Baltacı, 2013). Halofilik bakteriler 50 mL Medyum C besiyerine %2 oranında aşılandıktan sonra uygun sıcaklık ve inkübasyon süresinde geliştirilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda iki kez aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan halofilik bakterilerin gelişme koşulları

Suş kodu	Gelişme sıcaklığı (°C)	Gelişme pH'sı	İnkübasyon süresi (gün)
<i>Halomonas aquamarina</i> NB2	30	7,36	5
<i>Halobacillus trueperi</i> NB7	37	8,41	7
<i>Halobacillus trueperi</i> NB8	37	8,41	7
<i>Halobacillus trueperi</i> NB9	30	8,41	7
<i>Halobacillus trueperi</i> NB10	37	8,41	7
<i>Halobacillus trueperi</i> NB11	37	8,28	7

Halofilik bakteriler aktifleştirildikten sonra Gram boyama yapılarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Gram boyama

Halofilik bakteriler Gram boyama için, lam üzerine alınmış ve %2'lik asetik asit ile 5 dakika muamele edilerek lama tespit edilmiştir. %0,25'lik kristal viyole ile 3 dakika, lügol ile 1 dakika, alkol ile 10 saniye ve safranin ile 1 dakika boyanmıştır. Ara yıkama aşamaları %20'lik NaCl çözeltisi kullanılarak yapılmıştır (Mutlu, 2006). Boyama sonrası ışık mikroskopunda koyu mor (menekşe) renkli görünenler Gram (+) bakteriler olarak belirlenmiştir.

Halofilik bakteriler iki kez aktifleştirilip katı besiyerinde tek koloniler alınarak ardışık çizgi ekimlerle saf kültür haline getirilmiştir. Saf kültürler %15'lik gliserol stokları (cryo tüp) içerisinde -80°C'de muhafaza edilmiştir.

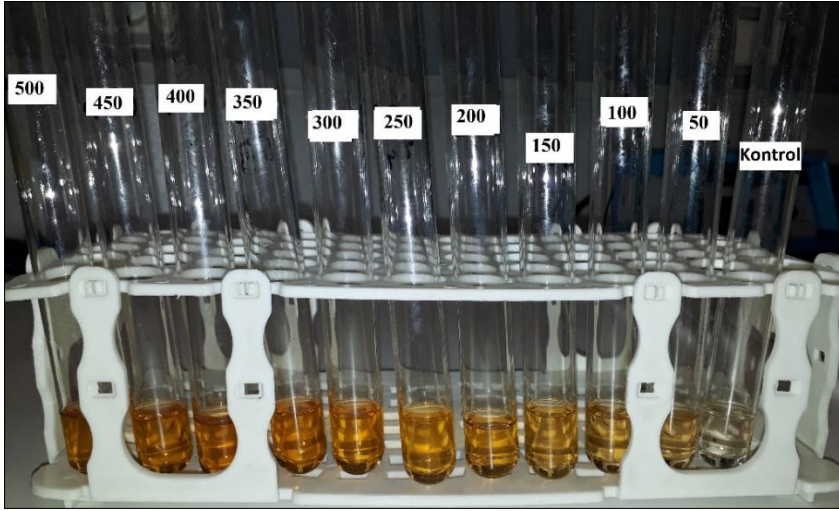
3.2.2. Halofilik bakterilerin EPS üretimlerinin belirlenmesi

Kültür ortamında EPS miktarı

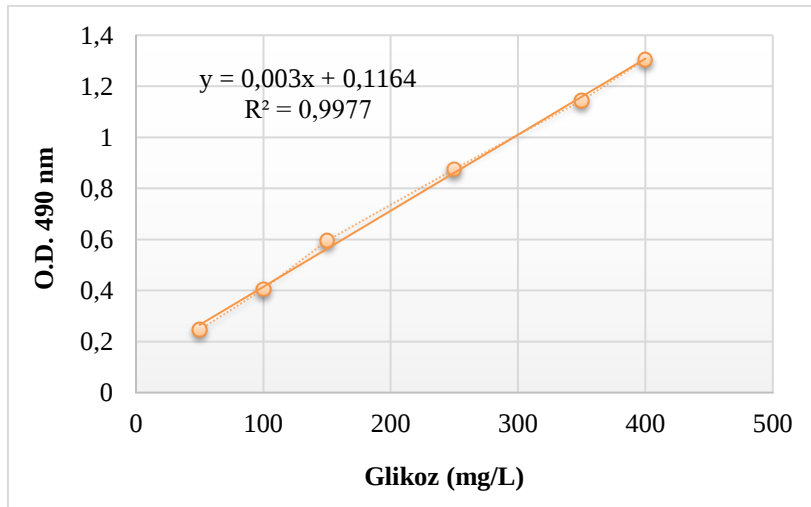
Aktif kültürlerin optik yoğunlukları spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 600 nm dalga boyunda $0,600 \pm 0,002$ 'ye ayarlanarak, Medyum C besiyerlerine %2 oranında aşılanmıştır. Her bakterinin uygun inkübasyon süresi (5 ve 7 gün) sonunda, kültürlerden 1'er mL mikrofüj tüplerine alınarak 95 °C'lik sıcak su banyosunda 10 dakika ısıtılmıştır. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra, üzerine 1,7 µL oranında TCA (trikloroasetik asit, Sigma) çözeltisi eklenerek 13000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Filtratlar yeni mikrofüj tüplerine alınarak, üzerlerine 1(örnek):3(%96'lık alkol) oranında etil alkol eklenmiştir. Bu aşamada iki paralelli olacak şekilde mikrofüj tüplerine örnekten 500 µL alınmış, üzerine 1,5 mL etanol eklenmiştir. Örnekler 25 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında dipte kalan pelletin üzerine 500 µL etanol eklenerek 15 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası mikrofüj tüpleri 24 saat etüv içerisinde bekletilmiştir. Alkolün uçurulup kuruması sağlandıktan sonra 500 µL olarak ayrılan örnekler 500 µL deiyonize suda çözülerek 1 mL olacak şekilde tek bir mikrofüj tüpünde toplanmıştır (Tsuda, Hara ve Miyamoto, 2008). Toplanan örneklerle, üretilen EPS miktarının tayini için fenol sülfürik asit metodu uygulanmıştır.

Fenol sülfürik asit metodu

Örneklerin üzerine 0,5 mL fenol (Sigma) ve 5 mL sülfürik asit (Merck) eklenerek, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra, iyice karıştırılmış ve 37°C’de 15-20 dakika bekletilmiştir. Örneklerin optik yoğunlukları, 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kültürlerin ürettiği EPS miktarlarını hesaplamak için 50-500 mg/L arasında değişen oranlarda glikoz çözeltisi kullanılarak (Resim 3.1) bir standart çıkarılmış ve bu standarda göre üretilen EPS miktarı mg/L cinsinden belirlenmiştir (Şekil 3.1) (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers ve Smith, 1956). Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür.



Resim 3.1. Glikoz standart çözeltileri



Şekil 3.1. Glikoz standart eğrisi

3.2.3. Halofilik bakterilerden EPS izolasyonu

Aktif kültürlerin optik yoğunlukları spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 600 nm dalga boyunda $0,600 \pm 0,002$ 'ye ayarlanarak, 800 mL Medyum C besiyerlerine %2 oranında aşılmiştir. Her bakterinin uygun inkübasyon süresi (5 ve 7 gün) sonunda, endojen enzimleri inaktive etmek için sıcak su banyosunda 80 °C'de 10 dk boyunca ısıtılmıştır. Soğuyan örnekler %4 oranında %80'lik TCA (trikloroasetik asit, Sigma) eklenerek, 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, proteinler çöktürülmüştür. Karışım 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen filtratlar toplanmış ve sıvının yarısı kontrollü sıcaklık (70-80 °C) ve düşük basınçla dönen evaporatörde (BUCHI) uzaklaştırılmıştır (yaklaşık 6-8 saat). Sıvının uzaklaştırılmasından sonra, örnekler oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuş ve hacmin iki katı kadar %96'lık etil alkol eklenerek, 24 saat +4 °C'de bekletilmiştir. Bu karışım 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve EPS'ler toplanmıştır (Tsuda ve diğerleri, 2008).

Toplanan EPS'ler 1 mL steril distile suda çözündükten sonra, liyofilizasyon tüplerine (vial) alınıp, liyofilize edilene kadar en az 1 gece -80 °C'de bekletilmiştir. Saflaştırılmış EPS'ler liyofilizatör cihazında (CHRIST alpha 2-4 LD plus), dondurulup kurutularak toz haline getirilmiştir. Liyofilizasyondan sonra viallerin içinde bulunan l-EPS'ler çalışmaya alınmıştır.

Liyofilize edilmiş EPS'lerde toplam karbohidrat miktarı

Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi izole edilip, liyofilizasyon işlemi ile toz haline getirilen EPS'lerin miktarlarını ölçmek için, her bir vialde bulunan l-EPS'ler 1 mL distile suda çözülmüştür. Miktar ölçümü Bölüm 3.2.2'de verilen metoda göre fenol-sülfürik asit metodu ile yapılmıştır.

3.2.4. Farklı tuz konsantrasyonlarında EPS üretimlerinin belirlenmesi

Kültür ortamına göre besiyerinde en iyi gelişim gösteren ve EPS üretim kapasitesi yüksek olan *Halobacillus trueperi* NB7 suşu, ilk aktifleştirilmeden sonra Medyum C besiyerine %5, %10, %15, %17,5 (kontrol), %20, %25 ve %30 (w/v) oranlarında NaCl ilave edilerek besiyerlerine ekilmiştir. Bölüm 3.2.2'de verilen metoda göre farklı tuz konsantrasyonlarında

bakterinin EPS üretim miktarları belirlenmiştir. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür.

3.2.5. Farklı karbon kaynaklarında EPS üretimlerinin belirlenmesi

Kültür ortamında göre besiyerinde en iyi gelişim gösteren ve EPS üretim kapasitesi yüksek olan *Halobacillus trueperi* NB7 suşu, ilk aktifleştirilmeden sonra Medyum C besiyerine %1 sükroz, %1 glikoz, %1 mannoz ve %1 galaktoz (w/v) eklenerek hazırlanan besiyerlerine ekilmiştir. Bölüm 3.2.2’te anlatıldığı gibi kültür ortamındaki EPS üretim miktarı fenol-sülfürik asit metodu ile tespit edilmiştir. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür.

3.2.6. Halofilik bakterilerde biyofilm aktivitesi

Halofilik bakteriler Medyum C besiyerinde aktifleştirilmiştir. 190 µL temiz Medyum C besiyerleri içeren 96 kuyuluk mikrolatelerine her bir kültürün inokülümünden 10 µL aktarılmıştır. Mikrolateleri halofilik bakterilerin optimum gelişme sıcaklıklarında (30-37°C), her bakterinin uygun inkübasyon süresine (5 ve 7 gün) bırakılmıştır. Inkübasyon süresi bitiminde, kuyular 2 defa steril serum fizyolojik ile yıkanmış ve planktonik fazdaki bakteriler uzaklaştırılmıştır. Kuyular 200 µL %95’lik metanol ile 15 dakika fikse edilmiştir. Platelere oda sıcaklığında kurutulmuş, %1’lik kristal viyole çözeltisinden kuyulara 200 µL eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Tutunmayan boyanın uzaklaştırılması için platerler distile suyla yıkanmıştır. Son olarak kuyulara 200 µL etanol:aseton (70:30 w/w) ilave edilmiştir (Liaqat, Bachmann ve Edyvean, 2014). Platerler 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra biyofilm tabakasına bağlanan boyanın çözünmesi sağlanmıştır. Inkübasyon bitiminde çözünen kristal viyole boyasının oluşturduğu optik yoğunluk 570 nm’de mikrolate okuyucuda (Epoch, Biotek) ölçülmüştür.

Biyofilm ölçümünün sonucu her altı paralelde belirlenen absorbans değerlerinin ortalamasından, kontrol (yalnızca besiyeri içeren) kuyularının ortalamalarının çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. Mikrolatelerdeki biyofilm üretim miktarları, sınır değerleri (cut off) olarak belirlenen kontrol grubunun optik yoğunluğu esas alınarak; üretici değil, zayıf, orta ve güçlü şeklinde kategorize edilmiştir (Çizelge 3.4). Çalışma iki tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür (Stepanovic, Vukovic, Dakic, Savic ve Svabic-Vlahovic, 2000; Vestby, Moretro, Langsrud, Heir ve Nesse, 2009).

Çizelge 3.4. Biyofilm üretiminin belirlenmesinde kullanılan sınır değerleri (cut off)

Sınır değeri (cut off)	Biyofilm üretim karakteristikleri
$OD \leq OD_{\text{cut off}}$	Üretici değil
$OD_{\text{cut off}} < OD \leq 2 \times OD_{\text{cut off}}$	Zayıf üretici
$2 \times OD_{\text{cut off}} < OD \leq 4 \times OD_{\text{cut off}}$	Orta düzey üretici
$4 \times OD_{\text{cut off}} < OD$	Güçlü üretici

3.2.7. I-EPS'lerin emülsifikasyon aktivitesi

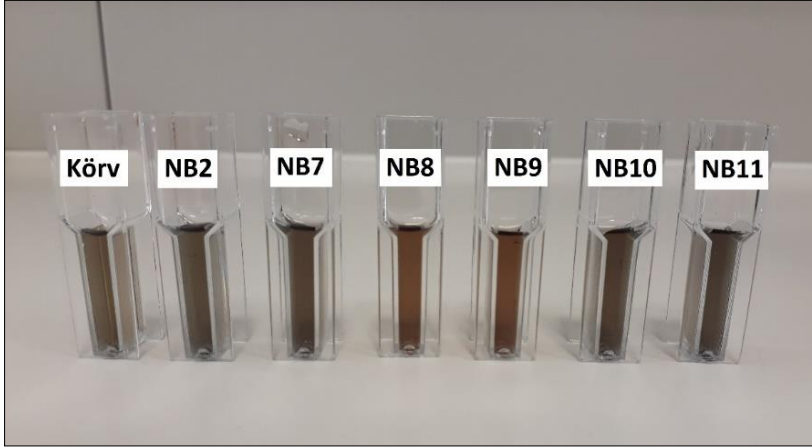
Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi halofilik bakterilerden üretilen EPS'ler liyofilize edilmiştir. I-EPS'lerin emülsifikasyon aktiviteleri Cooper ve Goldenberg (1987) ile Patel ve Desai (1997) tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. I-EPS'lerin 0,4 g/L'lik su çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden deney tüplerine 2'şer mL alınarak her bir deney tüpü üzerine 3 mL zeytin yağı (sanayi tipi), mineral yağı (Sigma), oktan (Sigma), izopropil miristat (Sigma), n-hekzan (Merck), benzen (Merck), ksilol (Merck) ve toluen (Sigma) eklenerek 2 dakika vortekslenmiştir. Karışımlar hareket ettirilmeden 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda toplam yükseklik (TY) ve emülsifikasyon katmanının yüksekliği (EY) ölçülerek verilen eşitlikte yerine konularak hesaplanmıştır (Cooper ve Goldenberg, 1987; Patel ve Desai, 1997). Kontrol olarak en iyi yüzey aktif kimyasal maddeleri olan Tween 20 (Merck), Tween 80 (Merck) ve Triton X-100 (Sigma) kullanılmıştır (Mata ve diğerleri, 2006).

$$\% \text{ Emülsifikasyon aktivitesi } (\%E_{24}) = (EY/TY) \times 100$$

3.2.8. I-EPS'lerde protein miktar tayini

Bu çalışmada, 5-100 μL (0,0025-0,05 mg/mL) arasında oldukça hassas sonuçlar veren Bradford yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm'de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanmaktadır. Coomassie Brilliant Blue G-250'nin kırmızı ve mavi olmak üzere iki farklı renk formunda mevcut olduğu gözlemine dayanmaktadır. Kırmızı form, boyanın proteine bağlanması üzerine mavi forma dönüştürülür. Protein boya kompleksi, yüksek bir yok olma katsayısına sahiptir ve böylece proteinin ölçülmesinde büyük hassasiyete yol açar (Bradford, 1976).

sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir ve 595 nm’de absorbansları okunmuştur (Resim 3.3). Elde edilen absorbanslarla standart grafiği eğrisinden elde edilen formülden yararlanılarak örneklerdeki protein miktarı mg/mL cinsinden hesaplanmıştır.



Resim 3.3. Protein miktar tayini için spektrofotometrede okunmaya hazır suşlar

3.2.9. l-EPS’nin moleküler ağırlığının belirlenmesi

Kültür ortamına göre besiyerinde en iyi gelişim gösteren ve EPS üretim kapasitesi yüksek olan *Halobacillus trueperi* NB7 suşundan izole edilen l-EPS’lerin molekül ağırlığı SEC analizi (büyüklükçe ayırma kromatografisi) ile Bilkent UNAM’da hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. SEC analizi için, numuneler l-EPS’lerin 1 mg/mL olacak şekilde ultra distile saf su içinde çözünmesi ve mikrofiltrasyon (Whatman 0,45 µm) yolu ile sterilize edilmesi sonucunda hazırlanmıştır. SEC analizinde PL aqua-OH miksed (7,5 x 300 mm) kolonu ve mobil faz olarak da su kullanılmıştır (Agilent Teknoloji).

3.2.10. İstatistiksel analizler

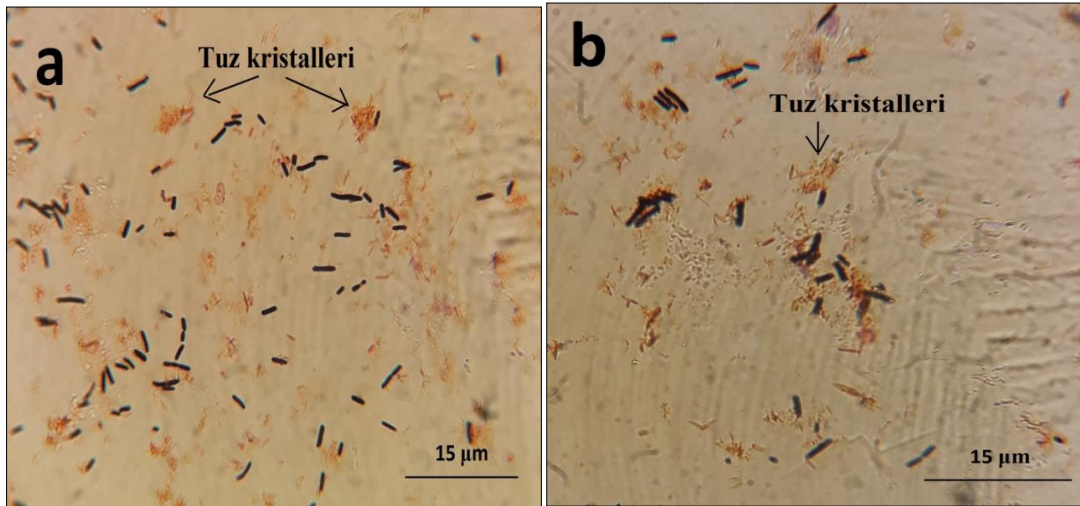
Her çalışma için paralel sayısı değişmekle birlikte genel olarak iki paralelli ve üç tekrarlı olacak şekilde yapılmış ve bulunan değerlerin ortalama sonuçları verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (22.0 Evaluation versiyonu) kullanılmıştır. Bakterilerden elde edilen EPS miktarları ile l-EPS’lerin toplam karbohidrat miktarı arasındaki farklar t-Testi ($p < 0,05$) ile analiz edilmiştir. Pearson korelasyonuna göre, suşların EPS üretimi ile biyofilm aktivite, l-EPS toplam karbohidrat miktarı ile protein miktarı, l-EPS toplam karbohidrat miktarı ile emülsifikasyon aktivitesi arasında korelasyon olup olmadığı

incelenmiştir. Bu ilişkiler korelasyon katsayısı (r) değeri 0,00-0,29 arasında olduğunda zayıf, 0,30-0,49 arasında olduğunda düşük, 0,50-0,69 arasında olduğunda orta, 0,70-0,89 arasında olduğunda kuvvetli, 0,90-1 arasında olduğunda çok kuvvetli bir ilişki olarak yorumlanmıştır. Bakterilerin farklı karbon kaynakları ve farklı tuz konsantrasyonlarında EPS üretimi arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı LSD ve Tukey ($p<0,05$) testleri ile analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan halofilik bakteriler kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Çalışma kapsamında kullanılan bakteri suşları, mikroskopik inceleme ile kontrolleri yapıldıktan sonra çalışmaya alınmıştır. Gram pozitif halofilik bakterilerden *Halobacillus trueperi* NB7 ve *Halobacillus trueperi* NB9 suşlarının Gram boyama sonucunda ışık mikroskopundaki görüntüleri Resim 4.1'de gösterilmiştir.



Resim 4.1. Çalışmadaki bazı halofilik bakterilerin ışık mikroskop görüntüleri (a) *Halobacillus trueperi* NB7 (b) *Halobacillus trueperi* NB9

4.2. Halofilik Bakterilerin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi

Çalışmada kullanılan suşların kültür ortamındaki EPS üretimleri Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 6 suşun ürettiği EPS miktarları, n: 3 ortalamasının hesaplanmasıyla $\pm$ SD olarak Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. EPS üretim kapasitesi yüksek olan suşlar *Halobacillus trueperi* NB11 (55 ± 2 mg/L) ve *Halobacillus trueperi* NB7 (47 ± 1 mg/L) iken, en düşük EPS üreten suş *Halobacillus trueperi* NB9 (15 ± 2 mg/L) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Bakterilerin EPS üretimi ve l-EPS'lerin toplam karbohidrat miktarları

Suşlar	EPS ¹ (mg/L)	l-EPS ² (mg/L)
<i>Halomonas aquamarina</i> NB2	33±1	449±1
<i>Halobacillus trueperi</i> NB7	47±1	798±1
<i>Halobacillus trueperi</i> NB8	22±3	448±2
<i>Halobacillus trueperi</i> NB9	15±2	684±7
<i>Halobacillus trueperi</i> NB10	42±4	841±6
<i>Halobacillus trueperi</i> NB11	55±2	647±3

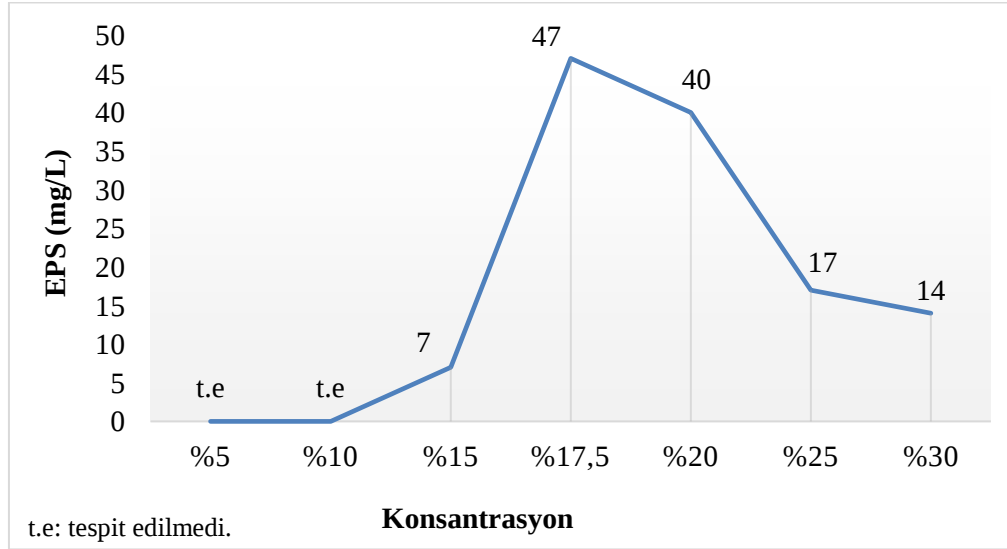
¹: Kültür ortamındaki EPS miktarı²: Kültür ortamından saflaştırılan l-EPS'lerdeki toplam karbohidrat miktarı

Çalışmada, halofilik bakterilerden izole edilen EPS'lerin liyofilizasyon sonrasında toplam karbohidrat miktarları belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Liyofilizasyon sonrasında l-EPS'lerde toplam karbohidrat miktarı yüksek olanlar l-EPS_{NB10} (841±6 mg/L) ve l-EPS_{NB7} (798±1 mg/L) olarak tespit edilirken en düşük toplam karbohidrat miktarı l-EPS_{NB8} (448±2 mg/L)'de belirlenmiştir. Sonuçlara göre, suşların kültür ortamında belirlenen EPS miktarı ile liyofilizasyon sonrası toplam karbohidrat miktarı paralellik göstermiş olup, liyofilizasyon sonrası toplam karbohidrat miktarının çok daha fazla olduğu görülmüştür. İstatiksel olarak bakterilerin kültür ortamındaki EPS miktarı ile kültür ortamından saflaştırılan l-EPS'lerin toplam karbohidrat miktarları arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

4.3. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında EPS Üretiminin Belirlenmesi

Halofilik bakterilerin kültür ortamındaki EPS üretimlerinden elde edilen sonuçlara göre halofilik bakterilerden kültür ortamı besiyerinde en iyi gelişim gösteren ve EPS üretim kapasitesi yüksek olan *Halobacillus trueperi* NB7 suşunun farklı tuz konsantrasyonlarında ürettiği EPS miktarları Şekil 4.1'de gösterilmiştir. NB7 suşu %5 ve %10'luk NaCl konsantrasyonlarında gelişme göstermediği için, bu tuz konsantrasyonlarında suşta EPS üretimi tespit edilememiştir. NB7 suşunda, %17,5'luk NaCl (kontrol) konsantrasyonlarında en yüksek EPS üretimi (47 mg/L) belirlenirken, tuz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak EPS üretim miktarları düşmüştür.

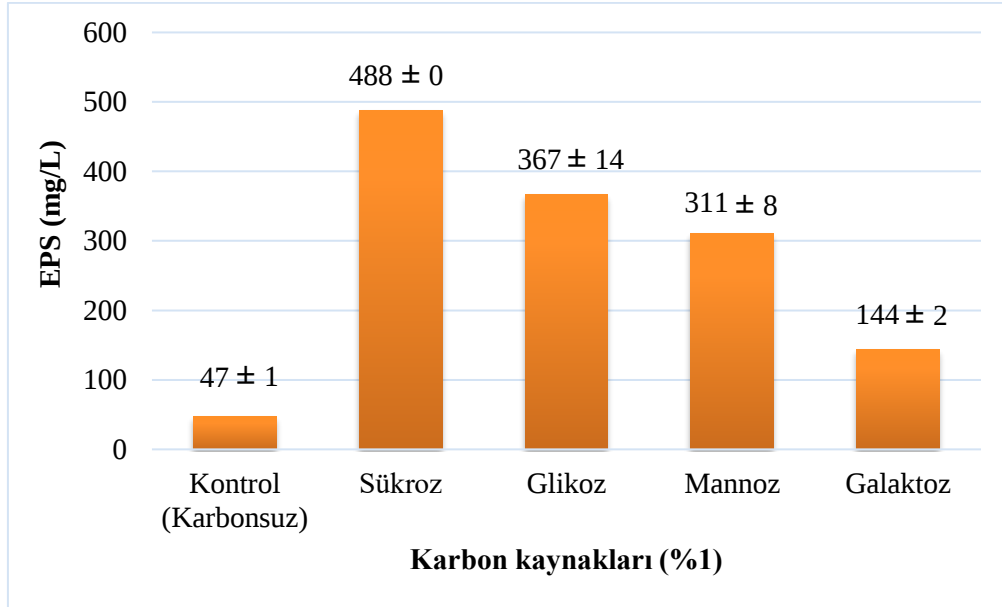
İstatistiksel olarak, %5 ve %10 tuz konsantrasyonları hariç diğer gruplar arasında EPS üretimleri arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir ($p=0,00<0,05$).



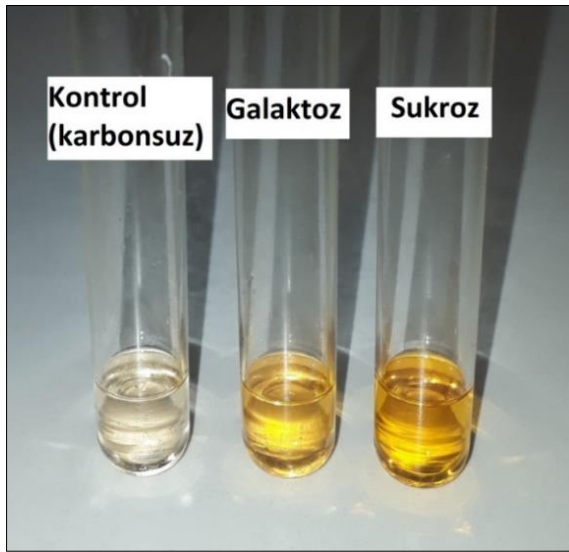
Şekil 4.1. NB7 suşunun farklı tuz konsantrasyonlarında EPS üretim miktarları

4.4. Farklı Karbon Kaynaklarında EPS Üretiminin Belirlenmesi

En yüksek verimde üretimin sağlanacağı besiyerini belirlemek amacıyla, Medyum C besiyerine Bölüm 3.2.2’te anlatıldığı gibi %1 oranında sükröz, glikoz, mannoz ve galaktoz eklenerek hazırlanan besiyerlerinde seçilen suşun (*H. trueperi* NB7) EPS üretim miktarları belirlenmiştir. Çalışmaya ait sonuçlar, n: 3 ortalamasının hesaplanmasıyla $\pm$ SD olarak, Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Farklı şekerlerin eklenmesiyle oluşturulan besiyerinde geliştirilen *H. trueperi* NB7 suşu kontrol besi ortamına (Medium C) göre en verimli EPS üretimini, %1 sükröz (488 mg/L) ve %1 glikoz (367 mg/L) içeren besiyerlerinde gösterdiği tespit edilmiştir. Bu değeri takip eden diğer besi ortamındaki karbon içeriğinin ise %1 mannoz olduğu (311 mg/L) belirlenmiştir (Resim 4.2). İstatiksel olarak farklı karbon kaynakları ilave edilmiş besiyerinde *H. trueperi* NB7 suşunun ürettiği EPS miktarlarında kontrol besiyerindeki (Medium C) EPS üretim miktarlarına göre anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($p=0,00<0,05$).



Şekil 4.2. NB7 suşunun farklı karbon kaynaklarında EPS üretim miktarları

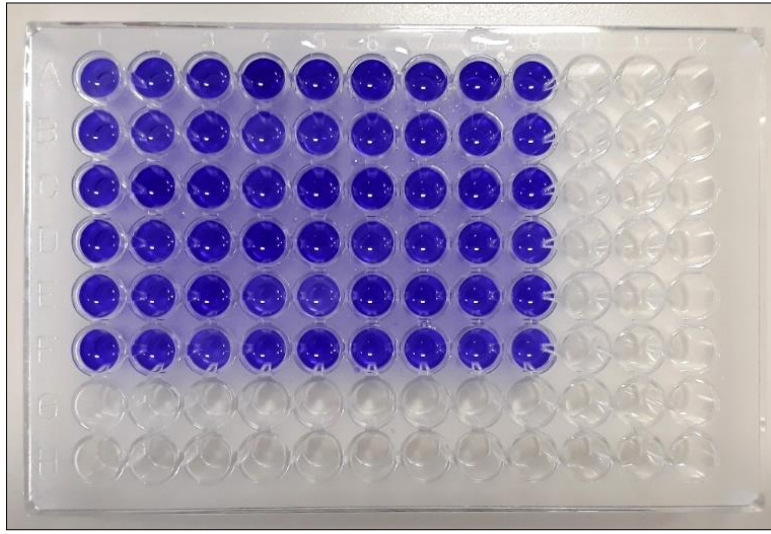


Resim 4.2. NB7 suşunun farklı karbon kaynaklarına göre renk değişimi

4.5. Halofilik Bakterilerin Biyofilm Üretim Karakteristikleri

Halofilik bakterilerin biyofilm yapma karakteristiklerinin belirlenmesinde Bölüm 3.2.6’da anlatılan mikropate yöntemi esas alınmıştır. Mikropate yönteminin temeli, spektrofotometrik olarak yoğunluğun ölçülmesine dayanmaktadır. 96 kuyucuklu platelerde geliştirilen bakteriler, kuyucuk içersinde biyofilm oluşturarak tutunurlar. Planktonik kısım kuyucuklardan çıkarılıp yıkama işlemi yapıldığında kuyucuklarda sadece biyofilm yapan bakteri hücreleri kalır böylece kristal viyole ile boyama işlemi sırasında biyofilimde yaşayan

bakteri hücreleri boyayı alır. Etanol-aseton solüsyonu hücrelerin içindeki boyanın dışarı salınmasını sağlar. Böylece biyofilmdeki hücre yoğunluğuna göre mavi tonlarında renkler oluşur. %1 kristal viyole ile boyanan kuyuların (Resim 4.3) mikropate okuyucuda 570 nm’de okutulup, biyofilm üretim miktarları, sınır değerleri (cut off) esas alınarak (Çizelge 3.4); üretici değil, zayıf, orta ve güçlü olarak kategorize edilmiştir. Buna göre elde edilen biyofilm üretim karakteristikleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.



Resim 4.3. Biyofilm okumaya hazır mikropate

Çizelge 4.2. Halofilik bakterilerin biyofilm üretim karakteristikleri

Suşlar	Sınır değeri (cut off)	Biyofilm üretim karakteristikleri
NB2	2,212 < 2,548 2,096 < 2,539	Güçlü üretici
NB7	0,980 < 2,055 1,052 < 2,073	Güçlü üretici
NB8	1,764 < 2,251 1,776 < 2,254	Güçlü üretici
NB9	1,140 < 2,095 1,084 < 2,081	Güçlü üretici
NB10	1,788 < 2,257 1,708 < 2,234	Güçlü üretici
NB11	1,242 < 2,431 ≤ 2,484 1,294 < 2,457 ≤ 2,588	Orta düzey üretici

Elde edilen sonuçlara göre, mikropate yöntemiyle *Halomonas aquamarina* NB2, *Halobacillus trueperi* NB7, NB8, NB9, NB10 suşlarının biyofilm üretim karakteristiği güçlü üretici, *Halobacillus trueperi* NB11 suşunun biyofilm üretim karakteristiği ise orta düzey

üretici olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak suşların EPS üretimi ile biyofilm aktiviteleri arasında pozitif yönde orta düzeyde ($r=0,515$) korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

4.6. l-EPS'lerin Emülsifikasyon Aktivitelerinin Belirlenmesi

Halofilik bakterilerin l-EPS izolasyonu Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Liyofilize edilmiş EPS'lerin emülsifikasyon aktivite analizi Bölüm 3.2.7'de anlatıldığı şekilde zeytin yağı, mineral yağı ve izopropil miristat yağları, oktan, hekzan, benzen, ksilol ve tolüen hidrokarbonları ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ve kontrol için kullanılan yüzey aktif maddelerine göre sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. l-EPS_{NB2}'nin zeytin yağı (%3), oktan (%5) ve izopropil miristatı (%3) emülsifiye ettiği, l-EPS_{NB7}'nin zeytin yağı hariç, l-EPS_{NB8}'in ise mineral yağı hariç ve l-EPS_{NB9}'in ise n-hekzan hidrokarbonu hariç çalışmada kullanılan diğer yağ ve hidrokarbonları emülsifiye ettiği belirlenmiştir. l-EPS_{NB10}'in çalışmada kullanılan tüm yağ ve hidrokarbonları (zeytin yağı, mineral yağı, izopropil miristat, n-hekzan, oktan, benzen, ksilol ve tolüen) emülsifiye ettiği (sırasıyla %13, %9, %10, %8, %6, %19, %26 ve %15) belirlenmiştir. l-EPS_{NB11}'in emülsifikasyon aktivitesinin zeytin yağı için %9, mineral oil için %3, izopropil miristat için %8, benzen için %5, ksilol %6 ve tolüen için %13 olarak tespit edilmiştir. Tween 20 ve Tween 80 kontrollerinin çalışmada kullanılan hiçbir yağ ve hidrokarbonu emülsifiye etmediği tespit edilmiştir. Triton X-100 kontrolünün zeytin yağı, mineral yağı, oktan, izopropil miristat, n-hekzan, benzen, ksilol ve tolüen için emülsifikasyon aktivitesinin sırasıyla %71, %74, %74, %77, %74, %45, %91 ve %86 olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, istatistiksel olarak, l-EPS ile mineral yağ ($r=0,855$), benzen ($r=0,761$) ve tolüen ($r=0,729$) arasında kuvvetli düzey pozitif yönde; l-EPS ile oktan ($r=0,650$) arasında orta düzey pozitif yönde; l-EPS ile ksilol ($r=0,441$) ve izopropil miristat ($r=0,433$) arasında düşük düzey pozitif yönde; l-EPS ile zeytin yağı ($r=0,235$) arasında zayıf düzey pozitif yönde; l-EPS ile n-hekzan ($r=-0,140$) arasında zayıf düzey negatif yönde bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

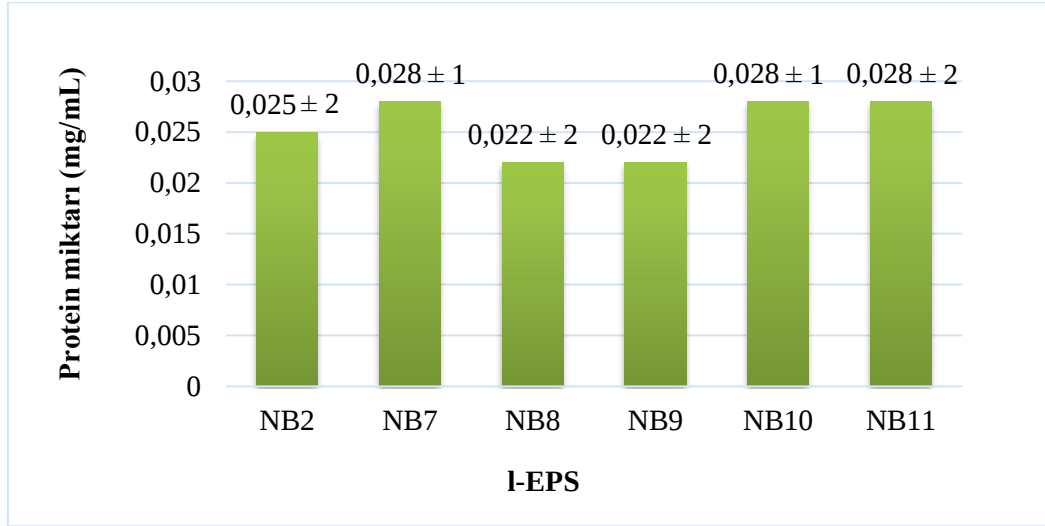
Çizelge 4.3. l-EPS'lerin ve kontrol gruplarının emülsifikasyon aktiviteleri (%)

l-EPS	Emülsifikasyon aktiviteleri (%E ₂₄)								
	Yağlar			Hidrokarbonlar					
	Zeytin yağı	Mineral yağ	İzopropil miristat	n-hekzan	Oktan	Benzen	Ksilol	Toluen	
l-EPS _{NB2}	3±0	-	3±0	-	5±2	-	-	-	
l-EPS _{NB7}	-	3±0	8±2	3±0	14±0	10±0	17±0	23±0	
l-EPS _{NB8}	6±0	-	9±0	11±1	3±0	8±0	22±0	11±0	
l-EPS _{NB9}	3±0	3±0	9±0	-	5±2	14±0	8±2	8±1	
l-EPS _{NB10}	13±2	9±0	8±2	6±0	10±0	19±1	26±2	15±2	
l-EPS _{NB11}	9±0	3±0	8±2	-	-	5±2	6±0	13±0	
Kontrol									
Tween 20	-	Homojen	-	-	-	-	-	-	
Tween 80	-	-	Homojen	-	-	-	-	-	
Triton X-100	71	74	77	74	74	45	91	86	

-:sonuç vermedi.

4.7. l-EPS'lerde Protein Miktarının Belirlenmesi

Liyofilize edilmiş EPS'lerin protein miktar tayini Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, n: 3 ortalamasının hesaplanmasıyla $\pm$ SD olarak, Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. l-EPS'lerin protein miktarları

Elde edilen sonuçlara göre, en düşük protein miktarı l-EPS_{NB8} (0,022 mg/mL) ve l-EPS_{NB9} (0,022 mg/mL) liyofilize ekzopolisakkaritlerde, en yüksek protein miktarı l-EPS_{NB7} (0,028 mg/mL), l-EPS_{NB10} (0,028 mg/mL) ve l-EPS_{NB11} (0,028 mg/mL) liyofilize ekzopolisakkaritlerde bulunmuştur. İstatistiksel olarak, l-EPS'lerin toplam karbohidrat miktarı ile protein miktarı ($r=0,618$) arasında orta düzey pozitif yönde anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

4.8. l-EPS Moleküler Ağırlığı

Büyükölçek ayırma kromatografisi (SEC) analizi ile *Halobacillus trueperi* NB7 suşundan elde edilen l-EPS_{NB7}'nin ortalama mol kütlesi (M_w) belirlenmiştir. l-EPS_{NB7}'nin tek fraksiyon oluşturduğu ve moleküler ağırlığının $9,646 \times 10^2$ Da olduğu belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Dünyamızda küresel ısınma ile bağlantılı olarak su kıtlığı ve tuzluluk artmaktadır. Bu koşullarda gelişebilen halofilik mikroorganizmaların biyoteknolojik olarak kullanılabilmesi için, bu mikroorganizmaların mikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi önemlidir.

Ekstremofiller, olumsuz çevrelere benzersiz mekanizmalar yoluyla adapte olmaktadır ve EPS'lerin biyosentezi, hayatta kalma mekanizmalarından biridir. Farklı ekstrem ortamlarda yaşayan ekstremofilik mikroorganizmalar, ümit veren EPS üreticileri olarak kabul edilmiştir ve ekstremofiller (termofiller, halofiller, alkalifiller, psikrofiller ve asidofiller) tarafından EPS üretiminin incelenmesi, endüstriyel uygulamalarda güçlü potansiyeli olan yeni özellikler ortaya çıkarmıştır. Günümüzde, elde edilen kanıtlar, ekstremofilik EPS'lerin, biyomedikal uygulamalar için ümit verebilecek anti-kanser, antioksidan ve immünoregülasyon özellikleri gibi geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip olduğunu göstermiştir. Halofilik EPS'ler üzerine emülsifikasyon, antioksidan, biyodoplastik, ağır metal bağlanması, antitümör aktivitesi gibi yapılan araştırmalar sayesinde biyomateryal, biyomedikal ve gıda endüstrisinde kullanım alanlarına sahip oldukları rapor edilmektedir (Wang ve diğerleri, 2019).

Ekstremofilik organizmalardan elde edilen endüstriyel olarak önemli olan biyopolimerler yalnızca sağlam özelliklere sahip değil, aynı zamanda düşük maliyetlidirler (Chikkanna ve diğerleri, 2018). EPS üretme kapasitesine sahip halofilik mikroorganizmalar hakkında sınırlı sayıda bilgi birikimi bulunmaktadır. Literatürde, halofilik *Halomonas* sp. (Bouchotroch, Quesada, Izquierdo, Rodriguez ve Bejar, 2000), *Halomonas maura* (Arias ve diğerleri, 2003), *Aphanocapsa halophytica* (Matsunaga, Sudo, Takemasa ve Wachi, 1996), haloalkalofilik *Bacillus* sp. I-450 (Kumar ve diğerleri, 2004) ve *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* (Romano, Gambacorta, Lama, Nicolaus ve Giordano, 2005) bakteri türlerinden EPS üretimi ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Sınırlı sayıdaki çalışmalara katkı sağlamak amacıyla bu tez çalışmasında, hipersalin ortamlardan izole edilen ve moleküler yöntemler ile tanımlanmış 6 halofilik bakterinin kültür ortamlarındaki EPS üretimlerinin belirlenmesi, en iyi gelişim gösteren ve yüksek EPS üretim kapasitesine sahip bir suşun seçilerek farklı tuz konsantrasyonlarının ve farklı karbon kaynaklarının EPS

üretimine etkisinin tespiti amaçlanmıştır. Ayrıca, bakterilerin kültür ortamında biyofilm üretim karakteristiği ve liyofilize EPS'lerin (l-EPS) emülsifikasyonu belirlenerek emülsifiye ajanı olarak kullanılabilirliğinin açığa çıkartılması hedeflenmiştir.

Genel olarak, EPS'nin hücre içi biyosentezinin düzenlenmesi, EPS üreten hücrelerin çeşitli fizyolojik ve metabolik parametreleri ile belirlenir. Bunlar polisakkaritlerinin varlığı, yinelenen birimler oluşturmak için enerji, polimerizasyon için enzimlerin ifadesi ve yapı birimlerinin membran boyunca taşınmasıdır (Delbarre-Ladrat ve diğerleri, 2014). Ek olarak, ortamın içeriği, kültür yaşı, karbon ve azot kaynaklarının türü, karbon/azot oranı, pH, sıcaklık ve havalandırma gibi birçok faktörün EPS üretimi üzerinde etkileri vardır. Stres koşulları, ortamın ozmolaritesi gibi sınırlayıcı faktörler bir şekilde EPS biyosentezini etkilemektedir (Biswas ve Paul, 2017). Aynı zamanda, mikrobiyal EPS biyosentezinin genetiği ile ilgili bilgiler, özellikle de tekrar üniteleri, polimerizasyon, taşıma ve düzenleme işlemlerinde yer alan genlerin tanımlanması sadece ksantan, levan ve dekstran biyosentezi için bilinmektedir, ancak halofilik mikroorganizmaların EPS biyosentezindeki bilgiler yetersizdir (Donot ve diğerleri, 2012). *Halomonas maura* S-30 tarafından üretilen EPS mauranı, gıda ve ilaç endüstrisi ve biyoteknolojide kullanım için uygun hale getiren ilginç fonksiyonel özelliklere sahiptir. Mauran üretimine katılan genlerin analizi Arco ve diğerleri (2005) tarafından yapılmıştır ve korunmuş üç gen, *epsA*, *epsB* ve *epsC*'yi belirlemiştir. Mauranda, Wzy homologuna bağlı bir polimerizasyon sistemi tarafından oluşturulduğunu gösteren *epsJ* geni bulunmuştur (Arco ve diğerleri, 2005; Biswas ve Paul, 2017). Poli ve diğerleri (2009), *Halomonas smyrnensis* AAD6T'nin EPS üretiminin büyüme ile ilişkili olduğunu ve bakterilerin sü krozu karbon kaynağı olarak kullandığında, β (2-6) bağlı fruktoz kalıntılarının uzun lineer bir homopolimerik EPS'si olan yüksek seviyelerde levan salgıladıklarını bildirmişlerdir. Söğütçü ve diğerleri (2012), halofilik bakterilerde taslak genom sekans analizinde, *levansükraz* (*sacB*) ve *ExoD* genleri dâhil olmak üzere EPS biyosentezi ile ilgili genler tanımlanmıştır (Biswas ve Paul, 2017).

Halomonas aquamarina NB2 ve *Halobacillus trueperi* NB7, NB8, NB9, NB10, NB11 olmak üzere 6 halofilik bakterinin EPS üretim kapasitelerinin belirlendiği bu tez çalışmasında, *H. trueperi* NB11 (55 mg/L) ve *H. trueperi* NB7 (47 mg/L) suşlarının yüksek EPS ürettikleri, *H. trueperi* NB9 (15 mg/L) suşunun ise düşük EPS ürettiği tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramalarına göre, Mata ve diğerleri (2006), *Halomonas ventosae* ve *H. anticariensis* türlerine ait suşların 28–49 g/L arasında EPS ürettiğini, Llamas ve diğerleri

(2012), *H. almeriensis* M8^T suşunda 1,7 g/L EPS üretim miktarı olduğunu, Radchenkova ve diğerleri (2018) tarafından yapılan bir başka çalışmada, *Chromohalobacter canadensis* 28 suşunun 58 µg/mL EPS üretim miktarına sahip olduğunu, Chikkanna ve diğerleri (2018) tarafından yapılan çalışmada ise, *Halomonas nitroreducens* WB1 suşunun 125 mg/mL EPS ürettiği bildirilmiştir. Yapılan literatür tarama sonuçlarına göre, çalışmamızda kullanılan halofilik bakteri türlerine ait EPS üretim miktarlarına ilişkin veriler olmadığından aynı cinsin farklı türlerine ait veriler ile karşılaştırma yapılmıştır. Buna göre, bu tez kapsamında kullanılan suşlara ait EPS üretim miktarlarının diğer halofilik bakterilere göre düşük olduğu görülmüştür. Bunun nedeni olarak çalışmalarda kullanılan besiyeri kompozisyonu, tuz konsantrasyonu, sıcaklık ve pH gibi faktörler arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmüştür.

Halobacillus trueperi NB11 (55 mg/L) ve *H. trueperi* NB7 (47 mg/L) suşlarında yüksek EPS üretimi görülürken, *Halobacillus trueperi* NB9 (15 mg/L) suşunda düşük miktarda EPS görülmesi, EPS üretiminin aynı tür içerisinde suşlara göre bile değişebildiğini ve EPS üretimi yüksek olan bakterilere karar verebilmek için türlerin yanında suşların da önemli bir seçim kriteri olduğunu göstermektedir. EPS üretimi, bakteri türleri, bakterilerin yetiştirme koşulları ve kültürlerin yaşı gibi çeşitli faktörlere ve fermantasyon koşullarının tasarımına bağlı olarak değişmektedir (Allard ve Tazi, 1993). Ayrıca, EPS üretimi türe özgü değildir ve aynı türün her suşu, farklı biyoteknolojik özelliklere sahip farklı EPS'ler üretebilmektedir (Manivasagam ve diğerleri, 2013; Arun, Sathishkumar ve Muneeswaran, 2014).

Tez çalışmasında kullanılan bu suşların EPS'leri saflaştırılıp liyofilizasyon cihazında kurutma işlemi ile toz haline getirilmiş ve liyofilize EPS'lerideki toplam karbohidrat miktarları fenol-sülfürik asit metoduna göre değerlendirilmiştir. En iyi l-EPS miktarı *H. trueperi* NB10 (l-EPS_{NB10}-841 mg/L) ve *H. trueperi* NB7 (l-EPS_{NB7}-798 mg/L) suşlarından elde edilen EPS'lerde belirlenirken, en düşük toplam karbohidrat miktarı l-EPS_{NB8} (448 mg/L) de elde edilmiştir. Literatür tarama sonuçlarına göre, halofilik bakterilerin ürettiği liyofilize EPS'lerin toplam karbohidrat miktarlarına ait verilerin olmadığı tespit edilmiştir. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, suşların kültür ortamında belirlenen EPS miktarı ile liyofilizasyon sonrası EPS (l-EPS) miktarları arasında paralellik gözlenmiş olup, liyofilizasyon sonrası EPS miktarının (toplam karbohidrat miktarı) çok daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin liyofilizasyonda yüksek hacimde kültürlerin kullanılması, yüksek hacimde EPS'nin kısmi olarak saflaştırılarak elde edilmesi ve liyofilizasyonda

kurutmaya bağılı olarak yoğunlaşmanın olması olarak düşünülmüştür. Kültür ortamında EPS üretiminin düşük bulunmasından dolayı endüstriyel alanlarda, EPS uygulamaları için liyofilize EPS'lerin kullanımının daha uygun olduğu düşünülmektedir.

Orta derecede halofilik bakteriler, %5-20 (w/v) tuz içeren ortamlarda en iyi şekilde büyüyenler olarak tanımlanırlar ve hipersalin habitatlarda yaşayan en önemli Eubacteria grubunu oluşturlar (Ollivier ve diğerleri, 1994; Qian ve diğerleri, 2018). Mikroorganizmalar için EPS, koruyucu bariyer görevi görmektedir. Mikroorganizmalardaki EPS üretim miktarı, ağır metal konsantrasyonu, tuz iyonları, pH derecesi, sıcaklık, oksijen konsantrasyonu veya besiyeri bileşimi gibi farklı koşullardan etkilenmektedir (Gupta ve Diwan, 2017; Kılıç ve Dönmez, 2019).

Tez çalışmasında, halofilik bakterilerden kültür ortamı besiyerinde en iyi gelişim gösteren ve EPS üretim kapasitesi yüksek olan *Halobacillus trueperi* NB7 suşu seçilerek farklı tuz konsantrasyonlarında EPS üretim miktarları belirlenmiştir. Buna göre, %5 ve %10 NaCl konsantrasyonlarında bakteri gelişme göstermediği için EPS üretimi tespit edilememiştir. NB7 suşu en iyi EPS üretimini %17,5 tuz konsantrasyonunda (kontrol-47 mg/L) gösterirken, konsantrasyon oranlarındaki artışa bağılı olarak EPS üretiminin azaldığı (14-40 mg/L) gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak *Halobacillus trueperi* NB7 suşunun optimum %17,5 tuz konsantrasyonunda gelişme göstermesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Tuz oranının azalması veya artması bakterinin gelişimini engellediği ve/veya azalttığı için, EPS üretimini de olumsuz yönde etkilemiştir. Yapılan çalışmalarda, halofilik bakterilerin ihtiyaç duyduğu optimum tuz konsantrasyonlarında, EPS üretiminin en iyi olduğu bildirilmiştir. Optimum %7,5 tuz konsantrasyonunda *H. ventosae* ve *H. anticariensis* türlerine ait suşlarda 28–49 g/L arasında EPS üretimi (Mata ve ark., 2006), *H. almeriensis* M8T suşunda 1,7 g/L EPS üretimi (Llamas ve ark., 2012), optimum %10 tuz konsantrasyonunda *Chromohalobacter canadensis* 28 suşunda 58 µg/mL EPS üretimi (Radchenkova ve ark., 2018) ve optimum %5 tuz konsantrasyonunda *H. nitroreducens* WB1 suşunda 125 mg/mL EPS üretimi (Chikkanna ve ark., 2018) olduğu rapor edilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan suşta, optimum gelişme tuz konsantrasyonu olan %17,5 tuz konsantrasyonunda en iyi EPS üretiminin belirlenmesi diğer araştırmacıların çalışmaları ile paralellik göstermiş ve en yüksek EPS üretiminin ihtiyaç duyduğu optimum tuz konsantrasyonunda gerçekleştiği ortaya konmuştur.

Mikrobiyolojik çalışmalarda mikroorganizmaların büyümesini ve EPS üretimlerini etkileyen en önemli faktörlerden birisinin de besiyerinde kullanılan karbon kaynağı olduğu bildirilmektedir. Kullanılan karbon kaynaklarının çeşidinin ve konsantrasyonunun EPS'nin sentezini ve verimini etkilediği rapor edilmiştir (Nour El-Dein, El-Fallal, Toson ve Hereher, 2004). Bakterilerin türleri, kültür koşulları ve karbon kaynağının türü, belirli bir tür tarafından üretilen mikrobiyal EPS'nin miktarını ve kompozisyonunu etkiler. Mikrobiyal polisakkaritlerin üretimi sıcaklık, pH, inkübasyon süreleri, karbon kaynakları ve azot kaynakları gibi birçok faktöre duyarlıdır. Mikroorganizmalar, genellikle karbon ve enerji kaynağı olarak glikoz veya sükroz içeren ortamları kullanarak gelişirler ve biyopolimer sentezinde genellikle yüksek C:N oranlarını tercih ederler (Sutherland, 2002; Poli ve diğerleri, 2009; Sethi ve diğerleri, 2019). EPS üretiminde kullanılacak olan besiyerinin içeriğindeki azot kaynağı olarak pepton, maya özütü, potasyum nitrat, asparjin, glutamik asit gibi kimyasallar kullanılabilir (Nour El-Dein ve diğerleri, 2004). Karbon kaynağı olarak ise glikoz, fruktoz, riboz, arabinoz gibi monosakkaritler ile sükroz, maltoz, laktoz, rafinoz gibi oligosakkaritler kullanılabilir (Cerning ve diğerleri, 1994; Gürleyendağ, 2006). Ekzopolisakkarit üretimini artırmak amacıyla birçok araştırmada besiyerine karbon kaynağı olarak sükroz ve glikoz eklenmiştir (Liu ve diğerleri, 2009; Rafigh ve diğerleri, 2014).

Çalışmamızda, 6 halofilik bakteri içerisinde kültür ortamı besiyerinde en iyi gelişim gösteren ve EPS üretim kapasitesi yüksek olan *Halobacillus trueperi* NB7 suşu seçilerek farklı karbon kaynaklarında EPS üretim miktarları tespit edilmiştir. Çalışmamızda, literatürlerde bakteriler için en çok kullanılan ve en iyi sonuçları veren karbon kaynakları seçilmiştir. Bu karbon kaynakları ile (sükroz, glikoz, mannoz ve galaktoz) oluşturulan besiyerlerinde ve herhangi bir karbon kaynağı içermeyen (kontrol grubu Medium C besiyeri) besiyerlerinde, *H. trueperi* NB7 suşunun EPS üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Denemeler sonucunda bakterinin EPS üretiminin, kontrol grubuna (47 mg/L) göre sükrozlu (448 mg/L), glikozlu (367 mg/L), mannozlu (311 mg/L) ve galaktozlu (144 mg/L) ortamlarda daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, EPS üretimi için besiyeri içeriğinde karbon kaynağının olması gerektiğini göstermiştir. Besi ortamı kompozisyonunun EPS üretiminde önemli rolü olduğundan, tüm karbon kaynaklarında EPS üretiminin oldukça artması bir avantaj olarak görülebilir. Özellikle sükrozlu ortamın EPS üretimini daha fazla arttırması, NB7 suşunun karbon kaynağı olarak sükrozu tercih ettiğini göstermiştir. Halofilik EPS üreticilerinin çoğunun, glikozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyerlerinde en yüksek

seviyelerde EPS sentezlediği bildirilmiştir (Mata ve diğerleri, 2006, 2008; Cojoc ve diğerleri, 2009; Llamas ve diğerleri, 2012; Biswas ve Paul, 2014; Radchenkova ve diğerleri, 2018). Llamas ve diğerleri (2012) tarafından yapılan çalışmada, *H. almeriensis* M8^T suşu %1 glikozlu ortamda geliştirildiğinde yüksek EPS üretimi (1,7 g/L) göstermiştir. Radchenkova ve diğerleri (2018), *Chromohalobacter canadensis* 28 suşunun %0,5 laktozlu ortamda 58 µg/mL, %1 laktozlu ortamda 130 µg/mL ile diğer karbon kaynaklarına göre daha iyi EPS üretimi gösterdiğini bildirmişlerdir. Halofilik, termotolerant bir *Bacillus* suşunun (B3-15) %0,6 glikoz varlığında 165 mg/L EPS ürettiği bildirilmiştir (Maugeri ve diğerleri, 2002). Sükrozlu besiyerinde en yüksek EPS üretim kapasitesinin testip edilmesi bakımından bizim çalışmamıza benzerlik gösteren, Poli ve diğerleri (2009) tarafından yapılan çalışmada, *Halomonas* sp. AAD6 hücreleri sükroz varlığında geliştirilmiş ve bakteri 1,073 g/L'lik EPS üretim seviyelerine ulaşmıştır. Halofilik bakterilerde EPS üretiminden sorumlu olan *levansükraz* (*sacB*) geni (Söğütçü ve diğerleri, 2012) besiyeri ortamında bulunan sükroz ile aktif hale gelerek EPS üretimini arttırabilir. Çalışmamızda kullanılan NB7 suşunda sükrozlu ortamda EPS üretiminin artması bakteride *levansükraz* (*sacB*) geninin aktivitesi ile ilişkili olabilir. Bunun daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

Mikroorganizmaların biyofilm üretim karakteristiklerini belirlerken ekzopolisakkarit miktarı esas alınmaktadır, oysa bazı bakteriler proteinler gibi başka moleküller ile de biyofilm oluşturabilmektedir (Coenye ve Nelis, 2010). Mikrobiyal biyofilmlerin insan sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Ulusal Sağlık Enstitüleri, enfeksiyonların %80'inden fazlasına biyofilmlerin neden olduğunu tahmin etmektedir (Sarıkaya, Aslim ve Yuksekdağ, 2017). Bu nedenle, bakteriler özellikle patojen bakteriler tarafından biyofilmin engellenmesi veya ortadan kaldırılması gerekmektedir. Ancak bazı koşullarda bakterilerin, özellikle çevre dostu bakterilerin, biyofilm oluşturmaları sayesinde, doğada bulunan ve insan sağlığına zararlı birçok madde ortadan kaldırılabilir. Bunlara; yer altı su kaynaklarının kontaminasyonunun engellenmesi, kullanılmayan ve çevreye zararlı olabilecek petrol yataklarının çevrelenmesi ve maden yataklarından çevreye yayılan sülfür ve benzeri yan ürünlerin detoksifikasyonu örnek olarak gösterilebilir. Kontamine olan bölgelerde yer altı su kaynaklarına ucuz karbon kaynaklarının pompalanması ile oluşturulan biyofilmler hem oluşturdukları bariyerle su kaynakları ve çevre kirleticileri arasındaki geçişleri engelleyecek hem de biyofilm içerisindeki azot veya sülfür tüketici bakteriler sayesinde ortamdaki istenmeyen miktardaki inorganik madde yükü azaltılabilecektir (Çiftçi, 2005; Ünal, 2011).

Halomonas ventosae ve *H. anticariensis* bakterilerinin biyofilm oluşturma eğilimleri araştırılmış ve bunların her ikisinin de hem polistiren kuyularında hem de borosilikat test tüplerinde biyofilm oluşturduğu ve biyofilm oluşum karakteristiğinin yüzeye bağlı olmadığı belirlenmiştir. *H. ventosae* A116 suşunun, muhtemelen polisakkaritin yüksek emülsifiye edici aktivitesine bağlı olarak, biyofilm oluşturma analizlerinde en iyi sonuçları verdiği bildirilmiştir (Branda, Gonzalez-Pastor, Ben-Yehuda, Losick ve Kolter, 2001).

Bu tez çalışmasında, mikropate yöntemiyle *Halomonas aquamarina* NB2, *Halobacillus trueperi* NB7, NB8, NB9, NB10 suşlarının biyofilm üretim karakteristiği güçlü üretici, *Halobacillus trueperi* NB11 suşunun biyofilm üretim karakteristiği ise orta düzey üretici olarak bulunmuştur. Biyofilm oluşumu her ne kadar sağlık için tehdit oluştursa da özellikle hipersalin ortamlar için biyofilm üreticisi olan suşlardan kontaminasyon önleyici ve endüstriyel atıkları uzaklaştırma gibi çevre uygulamalarında olumlu yönde sonuç alınabilir. Ancak biyofilmin etkisi hakkında daha detaylı çalışılması gerekmektedir. Qurashi ve Sabri (2012) tarafından yapılan çalışmada, *H. aquamarina* ST2 suşunda düşük tuzluluk seviyesinde (0,5 M NaCl) yüksek biyofilm oluşumu, *H. meridiana* PAa6 ve *K. indalinina* HT2 suşlarında yüksek tuzluluk seviyesinde de (1 M NaCl) yüksek biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Bu, tuz seviyesinin biyofilm üretiminde etkisi olduğu gibi bakteri türlerinin farklılığı da biyofilm üretim karakteristiğini etkilediğini göstermektedir. Literatürlerde, halofilik bakterilerin biyofilm üretimiyle ilgili detaylı çalışmalara rastlanılmamıştır.

Ekzopolisakkaritler, farklı yağ ve su karışımlarını verimli bir şekilde stabilize eder. Hidrofobik fazlar bitkisel yağ, mineral yağ veya bir hidrokarbondur. Emülsiyonlar, birbiriyle karışmayan sıvılardan oluşan, birinin diğeri içinde bir emülgatör yardımıyla dağılması sonucu homojen görünümlü heterojen dağınık sistemler olarak tanımlanmaktadır (Hinç, 2011). Endüstriyel işlemlerde, emülgatörler aşırı sıcaklık, çevre, pH ve tuzluluk değerlerine maruz kalabilir (Freitas ve diğeri, 2009). Ekstremofillerden biyoemülsifileştiricilerin önemli bir özelliği, geniş bir sıcaklık, pH ve tuzluluk aralığında yüksek emülsiyon stabilitesidir (Zheng ve diğeri, 2012). EPS'de üronik asit ve asetil grubunun varlığının ayrıca emülsifiye edici kapasiteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Caruso ve diğeri, 2018; Jain, Mody, Mishra ve Jha, 2012; Mata ve diğeri, 2006). Halofillerden elde edilen EPS'ler genellikle önemli miktarlarda üronik asit içerirler. EPS çözeltisinin asidik pH'ta yüksek viskozitesi ve jelleşme kapasitesinin, yüksek üronik asit içeriğinden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (Bejar ve diğeri, 1998; Wang ve diğeri, 2019). *H.*

ventosae suşundan elde edilen polisakkaritler tarafından üretilen emülsiyonların önemli özellikleri, çok kararlı olmaları ve küçük, tek biçimli damlacıklardan oluşmaları ve ince, pürüzsüz bir kıvamda olmalarıdır. Bilinen diğer polisakkaritler stabil emülsiyonlar yapabilirler ancak kalın ve daha yapışkan olma eğilimindedirler, bu gibi emülsiyon yapıcılar çok tercih edilmemektedirler (Desai ve Banat, 1997). Tez çalışmasında 6 halofilik bakteriye ait l-EPS'lerin farklı yağ ve hidrokarbonları emülsifiye etme kapasiteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, l-EPS'lerin genel olarak, l-EPS_{NB2} hariç, ksilol ve toluen hidrokarbonlarını diğer yağlar ve hidrokarbonlara oranla daha fazla emülsifiye ettiği; izopropil miristat yağını ise tüm l-EPS'lerin emülsifiye ettiği belirlenmiştir. l-EPS_{NB10}'un deneyde kullanılan tüm yağları ve hidrokarbonları emülsifiye ettiği görülmüştür. Suşlar arasında NB10 suşundan elde edilen l-EPS_{NB10}'nin ksilolu (%26), NB7 suşundan elde edilen l-EPS_{NB7}'nin tolueni (%23) en fazla emülsifiye ettiği belirlenmiştir. Triton X-100 kontrolüyle karşılaştırıldığında l-EPS'lerin düşük emülsifiye özellikte olduğu belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan Tween 20 ve Tween 80 kimyasal yüzey aktif maddelerinin hem hidrokarbonları hem de yağları emülsifiye etmediği tespit edilmiştir.

Mata ve diğerleri (2006) tarafından yapılan çalışmada, *H. ventosae* ve *H. anticariensis* suşlarına ait EPS'lerin ayçiçeği yağı, mineral yağ, zeytinyağı, tetradekan ve oktana olan etkileri araştırılmıştır. *H. ventosae* suşlarına ait emülsifikasyon aktivitesi %35,5 ila %62,5 arasında; *H. anticariensis* suşlarına ait emülsifikasyon aktivitesi %37,5 ila %55 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, *Halomonas nitroreducens* WB1 suşuna ait EPS emülsifikasyonunda, ayçiçek yağı (%85), hardal yağı (%68), zeytin yağı (%68), oktan (%62), vazelin yağı (%65), heksadekan (%56) ve toluen (%56) kullanılmıştır. EPS'nin emülsifiye edici aktivitesinin, kontrol olarak kullanılan sentetik yüzey aktif maddelerle (Triton X-100 ve Tween 80) karşılaştırıldığında daha iyi olduğu bulunmuştur (Chikkanna ve diğerleri, 2018). *Halomonas nitroreducens* WB1 suşu tarafından sentezlenen EPS'nin emülsiyonu ile stabil homojen mikro damlacıkların oluştuğu ve düzgün bir tutarlılık sağladığı bildirilmiştir. Böylece EPS'nin, yağ ve gıda endüstrilerinde çevre dostu bir emülsiyonlaştırıcı ajan olarak kullanılabilir olabileceği ifade edilmiştir (Desai ve Banat, 1997; Banat, Makkar ve Cameotra, 2000; Mata ve diğerleri, 2008; Chikkanna ve diğerleri, 2018). *Halomonas eurihalina* suşunun kullanıldığı bir çalışmada, bu suşlardan izole edilen EPS'lerin ksilen, toluen, oktan, tetradekan, ham petrol ve petrol gibi hidrokarbonlar üzerinde emülsifikasyon aktiviteleri araştırılmıştır. Kimyasal sürfektanlarla kıyaslandıklarında EPS'lerin daha yüksek emülsifiyer özellik gösterdikleri belirtilmiştir (Calvo, Martinez-

Checa, Toledo, Porcel ve Quesada, 2002). Halofilik EPS üreticileri, polimerlerin emülsifiyeleştiriciler ve hareketlilik denetleyicileri olarak işlev gören mikrobiyal güçlendirilmiş geri yağ kazanımı (MEOR) için ilginç bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Kulichevskaya ve diğerleri, 1998; Kazak, 2009). *Halomonas eurihalina* F2-7 suşu tarafından sentezlenen biyolojik emülgatör V2-7'nin özellikleri incelenmiş ve geniş bir yelpazede n-tetradekan, n-hekzadekan, n-oktan, benzin ve ham petrol hidrokarbonlarını emülsifiye edebildiği bulunmuştur (Martinez-Checa ve diğerleri, 2007). Llamas ve diğerleri (2010), halofilik *Salipiger mucosus* A3^T suşuna ait emülsifikasyon aktivitesinde ayçiçeği yağı (%70), mineral yağı (%71), zeytin yağı (%60), tetradekan (%75), oktan (%70), izopropil miristate (%67,5), toluen (%52,6), hekzan (%50), ksilen (%47,5), petrol (%20), dizel (%37,5), ham petrol (%95), vazelin yağı (%52,6) emülsifiye ettiğini tespit etmişlerdir. Llamas ve diğerleri (2012), *H. almeriensis* M8^T suşuna ait EPS'nin emülsifikasyon aktivitesinde ayçiçeği yağı (%65), mineral yağı (%67,5), zeytinyağı (%67,5), tetradekan (%62,5), oktan (%65), gaz yağı (%65) ve izopropil miristat (%70) kullanmışlardır. Bakteriler tarafından üretilen l-EPS'lerin yağlar ve hidrokarbonlara karşı emülsifikasyon aktivitesinin değişen ve farklı oranlarda olduğu görülmüştür. Literatürlere göre bizim çalışmamızda kullanılan l-EPS'lerin daha düşük emülsiyonlaştırıcı etkisi görülmüştür. Çalışmada kullanılan bakterilerin izole edildiği bölge, fermantasyon koşulları, pH, sıcaklık ve besiyeri kompozisyonu farklılıkları gibi etkenlerden dolayı EPS üretim miktarlarını etkilediği gibi emülsifikasyon aktivitelerini de etkilemiştir.

EPS'lerin esas organik fraksiyonları karbonhidratlar ve proteinlerdir (Nouha, Hoang, Yan, Tyagi ve Surampalli, 2015). Llamas ve diğerleri (2010), halofilik *Salipiger mucosus* A3^T suşundan elde edilen EPS'nin %1,6 (w/w) protein konsantrasyonu içerdiğini tespit etmişlerdir. Kazak (2009) yaptığı çalışmada, *Halomonas* sp. AAD6 tarafından, iyi kontrol edilmiş bir pH ve sıcaklığa sahip ortamda üretilen EPS'nin düşük protein içeriğine (%0,5125) sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Llamas ve diğerleri (2012), *Halomonas almeriensis* suşuna ait EPS'de %1,1 (w/w) protein içeriği olduğu bildirmişlerdir. Tez çalışmasında, kültür ortamından saflaştırılıp liyofilize edilen EPS'lerin (l-EPS) protein miktarı analizinde, en düşük protein miktarı l-EPS_{NB8} (0,022 mg/mL) ve l-EPS_{NB9} (0,022 mg/mL), en yüksek protein miktarı l-EPS_{NB7} (0,028 mg/mL), l-EPS_{NB10} (0,028 mg/mL) ve l-EPS_{NB11} (0,028 mg/mL) olarak bulunmuştur. Proteinler, bazı ekzopolisakkaritlerin emülsifiye edici kapasitesinde önemli bir rol oynamaktadır (Mata ve diğerleri, 2006; Navon-Venezia, Banin, Ron ve Rosenberg, 1998; Llamas ve diğerleri, 2010). Mata ve diğerleri

(2006) tarafından yapılan çalışmada, *H. ventosa* suşlarına ait EPS'lerin emülsifikasyon aktivitesine (%35,5-62,5) göre, Apo-EPS'lerin (% 0 protein içeren) spesifik emülsifiye edici aktivitesinin (%25-50) daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, protein içeriğinin emülsifiye edici aktivitede çok önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan l-EPS'lerin içerisindeki protein miktarının düşük (0,022-0,028 mg/mL) olmasından dolayı l-EPS'lerin emülsifikasyon aktivitelerini etkilediğinden düşük olduğunu düşünmekteyiz.

Ekzopolisakkarit (EPS)'ler, geri dönüşebilen ve çevre dostu olan doğal polimerlerdir (Soyuçok ve diğerleri, 2016). Sutherland (1977), üretilen ekzopolisakkaritlerin molekül ağırlığının, bakterilerin çoğalma miktarına bağlı olarak değiştiğini bildirmiştir. Mikroorganizmaların ortama salgıladıkları monosakkaritlerin yüksek molekül ağırlığına sahip olması bir avantaj olarak görülmektedir (Soyuçok ve diğerleri, 2016). Yapılan bazı çalışmalarda halofilik bakteri EPS'lerinin genel olarak 2×10^4 Da ila $1,9 \times 10^7$ Da arasında değişen molekül ağırlığına sahip olduğu ve tek fraksiyondan oluştuğu bildirilirken (Arias ve diğerleri, 2003; Mata ve diğerleri, 2006; Mata ve diğerleri, 2008), *Idiomarina fontislapidosi* ve *I. ramblicola* türleri tarafından sentezlenen EPS'lerin iki fraksiyon içerdiği bildirilmiştir (Mata ve diğerleri, 2006; Llamas ve diğerleri, 2012). Arias ve diğerleri (2003) tarafından yapılan çalışmada, *Halomonas maura* suşundaki EPS'nin $4,7 \times 10^6$ Da moleküler ağırlığının olduğu rapor edilmiştir. Mata ve diğerleri (2006), *H. ventosae* (Al12T-Al16) suşlarına ait EPS'lerin $5,3 \times 10^4$ Da ve $5,2 \times 10^4$ Da ve *H. anticariensis* (FP35T-FP36) suşlarına ait EPS'lerin ise 2×10^4 Da ve $4,6 \times 10^4$ Da moleküler ağırlıklarına sahip oldukları bildirilmiştir. Mata ve diğerleri (2008), *Idiomarina fontislapidosi* F23^T (EPS1-EPS2) suşunun $1,5 \times 10^6$ Da ve $1,5 \times 10^4$, *Idiomarina ramblicola* R22^T (EPS1-EPS2) suşunun $5,5 \times 10^5$ Da ve 2×10^4 Da, *Alteromonas hispanica* F32^T suşunun ise $1,9 \times 10^7$ Da moleküler ağırlıklarına sahip EPS'ye sahip olduğunu bildirilmişlerdir. Llamas ve diğerleri (2012), *Halomonas almeriensis* M8^T suşuna ait EPS'nin iki fraksiyon gösterdiğini ve moleküler ağırlığının $6,3 \times 10^6$ Da ve $1,5 \times 10^4$ Da arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Gu ve diğerleri (2017), halofilik bakteri olan *Kocuria rosea* ZJUQH suşuna ait EPS'nin ortalama moleküler ağırlığının $5,7 \times 10^4$ Da olduğunu bildirmiştir. Chikkanna ve diğerleri (2018) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Halomonas nitroreducens* WB1 suşuna ait EPS'nin üç fraksiyon oluşturduğu ve moleküler ağırlıklarının $5,2 \times 10^6$ Da, $3,0 \times 10^4$ Da ve $1,3 \times 10^3$ Da olduğu rapor edilmiştir.

Tez çalışmasında, *Halobacillus trueperi* NB7 suşundan elde edilen l-EPS_{NB7}'nin ortalama mol kütlesinin (M_w) belirlenmesi amacıyla, büyüklükçe ayırma kromatografisi (SEC) analizi kullanılmıştır. l-EPS_{NB7}'nin tek fraksiyon oluşturduğu ve $9,646 \times 10^2$ Da moleküler ağırlığında olduğu belirlenmiştir. Literatürlerle kıyaslandığında, l-EPS_{NB7}'nin düşük moleküler ağırlığına sahip olduğu tespit edilmiştir. Düşük moleküler ağırlıklı fraksiyonların temel olarak polisakkaritte bulunan oligomerler olabileceği bildirilmiştir (İsmail ve Nampoothiri 2014). Çalışmada kullanılan l-EPS_{NB7}'nin tek bir fraksiyona sahip olması ve molekül ağırlığının literatürde verilenlerden düşük olması, hücre zarının geçişinde bir avantaj sağlayabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde aşağıdaki çıkarımlar ve önerilerde bulunulmuştur.

1. Halofilik mikroorganizmaların, yalnızca aşırı ortamlardaki özellikleri için değil, aynı zamanda değerli fizikokimyasal özellikler ve umut verici ticari uygulamalar da kullanılan ekzopolisakkaritler için değerli bir kaynak sağladığı kabul edilmektedir. Halofilik EPS'lerin biyomedikal, gıda ve çevre kirliliğini azaltma ürünlerindeki uygulamaları biyobozunurluk, biyouyumluluk, toksik olmayan özellikleri ve kimyasal işlevselliklerine dayanarak tahmin edilebilir. Halofilik bakterilerin ve EPS'lerinin, gelişen çalışmalarla keşfedilmesi, karakterize edilmesi, optimize edilmesi ve güçlü, sürdürülebilir büyüme potansiyeli olan endüstrilerde kullanılması beklenebilir. Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler ile *Halomonas aquamarina* NB2 ve *Halobacillus trueperi* NB7, NB8, NB9, NB10, NB11 suşlarının kültür ortamında EPS miktarlarının düşük olmasına rağmen, sükrözlu besiyerinde yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olduğu ve l-EPS'lerdeki toplam karbohidrat miktarının yüksek olduğu belirlenmiştir. *Halobacillus trueperi* NB7 suşunun optimum tuz konsantrasyonunun belirlenmesi ve farklı karbon kaynaklarının eklenmesi ile ekzopolisakkarit üretimini oldukça yükseltmesi biyoteknolojik uygulamalarda avantaja dönüştürebilir.
2. Güçlü biyofilm üretim yeteneğine sahip olan halofilik suşlar (NB2, NB7, NB8, NB9, NB10), biyofilm üreterek çevresel kirliliğin önlenmesinde ve endüstriyel atıkların uzaklaştırılmasında öncülük edebilirler.
3. Yağ ile kirlenmiş hipersalin bölgelerde çeşitli halofilik mikroorganizmalar bulunmaktadır. Halofilik mikroorganizmaların kullanımıyla birlikte biyoremediasyon çalışmalarında başarılı olunmaktadır. Halofilik bakterilerden elde edilen l-EPS'lerdeki karbohidrat miktarının yüksek olması nedeniyle endüstriyel birçok alanda emülgatör olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olabilirler.
4. Çalışmada, halofilik bakterilerden elde edilen ekzopolisakkaritlerin emülsifikasyon aktivitesi ile l-EPS'lerdeki protein miktarları arasındaki ilişki ortaya konulmuş ve düşük protein miktarından dolayı l-EPS'lerin emülsifikasyon aktivitelerinin düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Bu da bize çalışmada, l-EPS'lerin iyi derecede saflaştırıldığını göstermektedir. Ancak, l-EPS'lerdeki protein miktarı ve emülsifikasyon aktivitesi

arasındaki ilişkinin net bir şekilde ortaya çıkarılması için daha fazla ve detaylı araştırmalar yapılması gerekmektedir.

5. Halofilik bakterilerle yapılan çalışmalar, ekstrem şartlarda gelişmelerinden dolayı zaman alıcı ve maliyetlidir. Bu nedenle yapılan araştırmalar oldukça az sayıdadır. Bu tez çalışmasında kullanılan halofilik bakterilerin ve bakterilerden elde edilen l-EPS'lerin, çevre için geri kazanımda ve biyoteknolojik potansiyel uygulamalarda kullanılabilir olabileceği düşünülmektedir. Daha net sonuçlar elde edilebilmesi için daha fazla çalışma yapılarak desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abanoz, B. (2016). *Halofilik bakterilerde tuz direncini sağlayan moleküler mekanizmaların ve endüstriyel enzim üretimlerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 1-15.
- Abdel-Aziz, S. M. and Aeron, A. (2014). Bacterial biofilm: Dispersal and strategies Inhibition. *Scholarena Journal of Biotechnology*, 1(1), 1-10.
- Ale, E. C., Perezlindo, M. J., Burns, P., Tabacman, E., Reinheimer, J. A., and Binetti, A. G. (2016). Exopolysaccharide from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and its functional characterization as a yogurt additive. *Journal of Dairy Research*, 83, 487–492.
- Ali, I., Prasongsuk, S., Akbar, A., Aslam, M., Lotrakul, P., Punnapayak, H., and Rakshit, S. K. (2016a). Hypersaline habitats and halophilic microorganisms. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 330-345.
- Ali, I., Akbar, A., Aslam, M., Ullah, S., Anwar, M., Punnapayak, H., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Yanwisetpakdee, B., Permpornsakul P., and Rakshit, S. K. (2016b). Comparative study of physical factors and microbial diversity of four man-made extreme ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences India*, 86, 767-778.
- Ali, I., Akbar, A., Yanwisetpakdee, B., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., and Punnapayak, H. (2014). Purification, characterization and potential of saline waste water remediation of a polyextremophilic α -amylase from an obligate halophilic *Aspergillus gracilis*. *BioMed Research International*, Art. ID 106937, 1-7.
- Ali, I., Kanhayuwa, L., Rachdawong, S., and Rakshit, S. K. (2013). Identification, phylogenetic analysis and characterization of obligate halophilic fungi isolated from a man-made solar saltern in Phetchaburi province, Thailand. *Annals of Microbiology*, 63, 887-895.
- Allard, B. and Tazi, A. (1993). Influence of growth status on composition of extracellular polysaccharides from two *Chlamydomonas* species. *Phytochemistry*. 32, 41-47.
- Amasha, R. H. (2018). Microbial diversity and phylogenetic studies of some microbes obtained from unexplored caves of Saudi Arabia. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 6(2), 342-351.
- Amoozegar, M. A., Safarpour, A., Noghabi, K. A., Bakhtiary, T., and Ventosa, A. (2019). Halophiles and their vast potential in biofuel production. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1895, 1-17.
- Arco, Y., Llamas, I., Martinez-Checa, F., Argandona, M., Quesada, E., and del Moral, A. (2005). EpsABCJ genes are involved in the biosynthesis of the exopolysaccharide mauran produced by *Halomonas maura*. *Microbiology*, 151, 2841-2851.

- Arias, S., del Moral, A., Ferrer, M.R., Tallon, R., Quesada, E., and Bejar, V. (2003). Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles*, 7, 319–326.
- Arun, J., Sathishkumar, R., and Muneeswaran, T. (2014). Optimization of extracellular polysaccharide production in *Halobacillus trueperi* AJSK using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 13(48), 4449–4457.
- Arun, J., Selvakumar, S., Sathishkumar, R., Moovendhan, M., Ananthan, G., Maruthiah, T., and Palavesam, A. (2017). *In vitro* antioxidant activities of an exopolysaccharide from a salt pan bacterium *Halolactibacillus miurensis*. *Carbohydrate Polymers*, 155, 400–406.
- Ates, O. (2015). Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 200.
- Baltacı, N. (2013). *Petrol hidrokarbonu kirleticilerinin halofilik bakteri ve Archaea türleri kullanılarak biyodegradasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 18-76.
- Baltaci, N., Yuksekdog, Z. N., and Aslim, B. (2017). Biodegradation of petroleum hydrocarbon pollutants by Halophilic bacteria and archaea strains. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(1), 686–694.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495–508.
- Barcelos, M. C. S., Vespermann, K. A. C., Pelissari, F. M., and Molina, G. (2019). Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1040–8398, 1549–7852.
- Bazaka, K., Crawford, R. J., Nazarenko, E. L., and Ivanova, E. P. (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 415.
- Becker, A. (2015). Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Frontiers in Microbiology*, 6, 687.
- Bejar, V., Llamas, I., Calvo, C., and Quesada, E. (1998). Characterisation of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *Journal of Biotechnology*, 61(2), 135–141.
- Benlloch, S., Acubasm S. G., López- López, A., Luz, S. P., and Rodríguez-Valera, F. (2001). Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: Culture versus PCR. *Microbial Ecology*, 41, 12–19.
- Bertrand, J. C., Almallah, M., Acquaviva, M., and Mille, G. (1990). Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic Archaeobacterium. *Letters in Applied Microbiology*, 11, 260–263.

- Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. M., and Sani, R. K. (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, 128, 751–759.
- Birbir, M. and Sesal, C. (2003). Extremely halophilic bacterial communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey. *Turkish Journal Of Biology*, 27, 7–22.
- Birbir, M., Calli, B., Mertoglu, B., Bardavid, R. E., Oren, A., Ogmen, M. N., and Ogan, A. (2007). Extremely halophilic *Archaea* from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3), 309-316.
- Biswas, J. and Paul, A. K. (2014). Production of extracellular polymeric substances by halophilic bacteria of solar salterns. *Chinese Journal of Biology*, Article ID 205731, 12.
- Biswas, J. and Paul, A. K. (2017). Diversity and production of extracellular polysaccharide by halophilic microorganisms. *Biodiversity International Journal*, 1(2), 32-39.
- Biswas, J., Ganguly, J., and Paul, A. K. (2015). Partial characterization of an extracellular polysaccharide produced by the moderately halophilic bacterium *Halomonas xianhensis* SUR308. *Biofouling*, 31, 735-744.
- Boels, I. C., van Kranenburg, R., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., and De Vos, W. M. (2001). Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 723–32.
- Bomfeti, C. A., Florentino, L. A., Guimaraes, A. P., Cardoso, P. G., Guerreiro, M. C., and Moreira, F. M. S. (2011). Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of Leguminosae. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 35, 657.
- Bouchotroch, S., Quesada, E., del Moral, A., Llamas, I., and Bejar, V. (2001). *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1625–1632.
- Bouchotroch, S., Quesada, E., Izquierdo, I., Rodriguez, M., and Bejar, V. (2000). Bacterial exopolysaccharides produced by newly discovered bacteria belonging to the genus *Halomonas*, isolated from hypersaline habitats in Morocco. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 374-378.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Branda, S. S., Gonzalez-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., and Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 98, 11621–11626.

- Brandt, K. K., Patel, B. K. C., and Ingvorsen, K. (1999). *Desulfocella halopila* gen. nov., sp. nov., a halophilic, fatty-acid-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of the Great Salt Lake. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 193-200.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., and Brissonnet, F.D. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: A review. *Biofouling*, 27(9), 1017-1032.
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M., and Spano, G. (2016). Exopolysaccharides Produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 3877-3886.
- Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F., Porcel, L. J., and Quesada, E. (2002). Characteristics of bioemulsifiers synthesised in rude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 347–351.
- Cappitelli, F., Polo, A., and Villa, F. (2014). Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. *Food Engineering Reviews*, 6, 29–42.
- Caruso, C., Rizzo, C., Mangano, S., Poli, A., Di Donato, P., Finore, I., and Giudice, A. L. (2018). Production and biotechnological potentialities of extracellular polymeric substances from sponge-associated Antarctic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(4), 1-18.
- Cerning, J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., and Topisirovic, L. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3914-3919.
- Chikkanna, A., Ghosh, D., and Kishore, A. (2018). Expression and characterization of a potential exopolysaccharide from a newly isolated halophilic thermotolerant bacteria *Halomonas nitroreducens* strain WB1. *PeerJ*, 1-18.
- Chung, J., Shin, S., and Oh, J. (2009). Characterization of a microbial community capable of reducing perchlorate and nitrate in high salinity. *Biotechnology Letters*, 31, 959-966.
- Çiftçi, İ., Çetinkaya, Z., Aktepe, O. C., Arslan, F., ve Altındış, M. (2005). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 35, 98–102.
- Coenye, T. and Nelis, H. J. (2010). *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 83(2), 89–105.
- Cojoc, R., Merciu, S., Oancea, P., Pincu, E., Dumitru, L., and Enache, M. (2009). Highly thermostable exopolysaccharide produced by the moderately halophilic bacterium isolated from a man-made young Salt Lake in Romania. *Polish Journal of Microbiology*, 58, 289–294.

- Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224-229.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., and Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41, 435-64.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., and James, G. (1994). Biofilms the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176, 2137-2142.
- Czaczyk, K. and Myszka, K. (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(6), 799–806.
- Danson, M. and Hough, D. W. (1997). The structural basis of protein halophilicity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117A(3), 307-312.
- DasSarma, S. and Arora, P. (2001). *Halophiles. Encyclopedia of life sciences*. London, Nature Publishing Group, 1–9.
- DasSarma, S. and Arora, P. (2002). *Halophiles: In encyclopedia of life sciences*. London, Nature Publishing Group, 8, 458-466.
- DasSarma, S., Kennedy, S. P., Berquist, B., Ng, W. V., Baliga, N. S., Spudich, J. L., Krebs, M. P., Eisen, J. A., Johnson, C. H., and Hood, L. (2001). Genomic perspective on the photobiology of *Halobacterium* species NRC-1, a phototrophic, phototactic, and UV-tolerant haloarchaeon. *Photosynthesis Research*, 70, 3-17.
- Davey, M. E. and O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847–867.
- De Baets, S., Du Laing, S., François, C., and Vandamme, E. J. (2002). Optimization of exopolysaccharide production by *Tremella mesenterica* NRRL Y-6158 through implementation of fed-batch fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 181–4.
- De Vuyst, L. and Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153-177.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S., and Degeest, B. (1988). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1059–1068.
- Del Moral, A., Quesada, E., and Ramos-Cormenzana, A. (1987). Distribution and types of bacteria isolated from an inland saltern. *Annales de l Institut Pasteur Microbiologie*, 138, 59-66.
- Delbarre-Ladrat, C., Sinquin, C., Lebellenger, L., Zykwinska, A., and Collic Jouault, S. (2014). Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules. *Frontiers in Chemistry*, 2, 85, 1-15.

- Demirci, A. (2009). *Afyonkarahisar Tekstil Boyar Maddelerin Gideriminde Halofilik Bakterilerin Kullanımı*. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 6-83.
- Desai, J. D. and Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47–64.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 9.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-93.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., and Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics, and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87, 951–962.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dundas, I. D. and Larsen H. (1962). The physiological role of carotenoid pigments of *Halobacterium salinarum*. *Archives of Microbiology*, 44, 233-239.
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., and Huyop, F. (2016). Halophiles: Biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 1-23.
- Emerson, D., Chauhan, S., Oriel, P., and Breznak, J. A. (1994). *Haloferax* sp. D1227, a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compounds. *Archives of Microbiology*, 161; 445-452.
- Ertan, H. ve Arda, N. (1999). *Protein Elektroföresi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 226.
- Farig, A., Yasmin, A., and Jamil, M. (2019). Production, characterization, and antimicrobial activities of bio-pigments by *Aquisalibacillus elongatus* MB592, *Salinicoccus sesuvii* MB597, and *Halomonas aquamarina* MB598 isolated from Khewra Salt Range, Pakistan. *Extremophiles*, 23(4), 435–449.
- Fendrich, C. (1988). *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid eubacterium from Great Salt Lake, Utah, USA. *Systematic and Applied Microbiology*, 11, 36-43.
- Fett, W. F. (1993). Bacterial exopolysaccharides their nature regulation and role in host-pathogen interactions. *Current Topics in Botanical Research*, 1, 367-390.
- Filik, F. ve Kubilay, A. (2019). Bazı bakteriyel balık patojenlerinde biyofilm oluşumunun farklı *in vitro* metodlarla tespiti. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 378-390.
- Freitas, F., Alves, V. D., and Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29, 388–398.

- Freitas, F., Alves, V. D., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira, R., and Reis, M. A. M. (2009). Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol by product. *Carbohydrate Polymers*, 78(3), 549–556.
- Galinski, E. A. (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: Molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia*, 49, 487-496.
- Galinski, E. A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 37, 273-328.
- Galinski, E. A. and Truper, H. G. (1994). Microbial behaviour in salt stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 15, 95-108.
- Gandhi, H. P., Ray, R. M., and Patel, R. M. (1997). Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydrate Polymers*, 34, 323–327.
- Garcia, M. D., Ramos, S. M. C., Rodriquez, J. A., Mateos-Diaz, J. C., Aguilar, C. N., and Camacho-Ruiz, R. M. (2018). Isolation of halophilic bacteria associated with saline and alkaline-sodic soils by culture dependent approach. *Heliyon, Elsevier*, 4(11), 1-18.
- Grant, S., Grant, W. D., Jones, B. E., Kato, C., and Li, L. (1999). Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. *Extremophiles*, 3(2), 139-145.
- Grant, W. D, Gemmell, R. T., and McGenity, T. J. (1998). Halobacteria: The evidence for longevity. *Extremophiles*, 2, 279-287.
- Grosu-Tudor, S. S. and Zamfir, M. (2014). Exopolysaccharide production by selected lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables. *Scientific Bulletin Series: F. Biotechnology*, 18, 2285-1364.
- Gu, D., Jiao, Y., Wu, J., Liu, Z., and Chen, Q. (2017). Optimization of EPS production and chracterization by a halophilic bacterium, *Kocuria rosea* ZJUQH from Chaka Salt Lake with response surface methodology. *Molecules*, 22(5), 814, 1-19.
- Gugliandola, C., Maugeri, T. L., Cacamo, D., and Stackebrandt, E. (2003). *Bacillus aeolius* sp. nov a novel thermophilic, halophilic marine *Bacillus* species from Eolian Islands (Italy). *Systematic and Applied Microbiology*, 26(2), 172-176.
- Gülbenzer, S. ve Ökmen, G. (2012). Ozmotik koruyucular ve mikroorganizmalar. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(I), 41-52.
- Gün, İ. ve Ekinci, F.Y. (2009). Biyofilmler: Yüzeylerdeki mikrobiyel yaşam. *Gıda*, 34(3), 165-173.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S., and Plemenitas, A. (2000). Hypersaline waters in salterns–natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32, 235-240.
- Gupta, P. and Diwan, B. (2017). Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A review on biosynthesis, mechanism, and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13, 58-71.

- Gürleyendağ, B. (2006). *Polisakkarit üreten ekstremofillerin belirlenmesi ve ekzopolisakkarit üretimi*. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-60.
- Hassanzadehdiznabi, S. (2019). *İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole edilen halofilik bakterilerde karotenoid izolasyonu ve üretimi potansiyellerinin belirlenmesi*. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1-93.
- Hinç, D. (2011). *Antijen taşıyıcı adjuvan özellikteki çoklu emülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi ve değerlendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-128.
- Hough, D. W. and Danson, M. J. (1989). Archaeobacteria: Ancient organisms with commercial potential. *Letters in Applied Microbiology*, 9, 33-39.
- Huang, H., Li, X., Wu, M., Wang, S., Li, G., and Ma, T. (2013). Cloning, expression, and characterization of a phosphoglucomutase/phosphomannomutase from sphingan producing *Sphingomonas sanxanigenens*. *Biotechnology Letters*, 35(8), 1265–1270.
- Hussain, M., Wilcox, M. H., and White, P. J. (1993). The slime of coagulase-negative staphylococci: Biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiology Letters*, 10, 191-207.
- Huval, J. H., Latta, R., Wallace, R., Kushner, D. J., and Vreeland, R. H. (1995). Description of two new species of *Halomonas*: *Halomonas israelensis* sp. nov. and *Halomonas canadensis* sp. nov.. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 1124-1131.
- İnternet: Live Science. (2016). Why Is the Dead Sea So Salty?. URL: <https://www.livescience.com/56047-why-is-dead-sea-so-salty.html>, Son Erişim Tarihi: 4.11.2019.
- İnternet: Travel. (2011). Taba. URL: <https://egyptall.blogspot.com/2011/10/taaba.html>, Son Erişim Tarihi: 4.11.2019.
- İnternet: Westminster College. (2019). Great Salt Lake Institute, Spiral Jetty. URL: <https://www.westminstercollege.edu/campus-life/centers-and-institutes/great-salt-lake-institute/spiral-jetty>, Son Erişim Tarihi: 4.11.2019.
- Ismail, B. and Nampoothiri, K. M. (2014). Molecular characterization of an exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 and its efficacy to improve the texture of starchy food. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4012-4018.
- Iyer, A., Mody, K., and Jha, B. (2006). Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 220-222.
- Jain, R. M., Mody, K., Mishra, A., and Jha, B. (2012). Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium *Cronobacter sakazakii* isolated from oil contaminated wastewater. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2320–2326.

- Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., and Yu, W. (2011). Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLOS One*, 6(4), 1-11.
- Jindal, N., Singh, D. P., and Khattar, J. I. S. (2011). Kinetics and physico-chemical characterization of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Oscillatoria formosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2139–2146.
- Kaya, T. (2008). *Çeşitli endüstriyel atık maddelerde bazı mikroorganizmaların yüzey aktif özelliklerinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-96.
- Kazak, H. (2009). *Exopolysaccharide production by Halomonas strains isolated from Turkey*. Thesis for The Degree of Master of Science in Bioengineering, Marmara University, Institute for Graduate Studies in Pure and Applied Sciences, İstanbul, 1-54.
- Kılıç, N. K. ve Dönmez, G. (2019). Farklı ortam koşullarının *Micrococcus* sp. ekzopolisakkarit üretimine etkisi. *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering*, 19, 40-46.
- Kulichevskaya, I. S., Milekhina, E. I., Borzenkov, I. A., Zvyagintseva, I. S., and Belyaev, S. S. (1998). Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria. *Microbiology*, 60, 596-601.
- Kumar, A. S., Mody, K., and Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides-A perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2), 103–117.
- Kumar, C. G. and Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9-27.
- Kumar, C. G., Joo, H. S., Choi, J. W., Koo, Y. M., and Chang, C. S. (2004). Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 673-681.
- Kushner, D. J. (1985). The Halobacteriaceae. In: C.R. Woese and R. S. Wolfe (Eds), *The Bacteria-a treatise on structure and function*. Archaeobacteria, Academic Press Orlando, 171-214.
- Lai, L. C., Kosorukoff, A. L., Burke, P. V., and Kwast, K. E. (2006). Metabolic-state-dependent remodeling of the transcriptome in response to anoxia and subsequent reoxygenation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 5(9), 1468-89.
- Lee, I. Y., Seo, W. T., Kim, G. J., Kim, M. K., Ahn, S. G., Kwon, G. S., and Park, Y. H. (1997). Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 16(2), 71-75.
- Lefebvre, O., Vasudevan, N., Torrijos, M., Thanasekaran, K., and Moletta, R. (2005). Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reactor. *Water Research*, 39(8), 1471–1480.

- Lentzen, G. and Schwarz, T. (2006). Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 623-634.
- Leriche, V., Sibille, P., and Carpentier, B. (2000). Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1851-1856.
- Li, H., Xu, H., Li, S., Xu, H., Guo, C., Ying, H., and Ouyang, P. (2010). Strain improvement and metabolic flux modeling of wild-type and mutant *Alcaligenes* sp. NX-3 for synthesis of exopolysaccharide welan gum. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(5), 777-784.
- Li, S., Huang, R., Shah, N. P., Tao, X., Xiong, Y., and Wei, H. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7334-7343.
- Liaqat, I., Bachmann, R. T., and Edyvean, R. G. J. (2014). Type 2 Quorum sensing monitoring, inhibition and biofilm formation in marine microorganisms. *Current Microbiology*, 68, 342-351.
- Limoli, D. H., Jones, C. J., Wozniak, D. J., and Cruz, S. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*, 3(3), 1-30.
- Litchfield, C. D. (2002). Halophiles. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 21-22.
- Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., and Zeng, X. (2009). Production, characterization, and antioxidant activities *in vitro* of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers*, 78, 275- 281.
- Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., and Zeng, X. (2010). Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers*, 79, 206-213.
- Llamas, I., Amjres, H., Mata, J. A., Quesada, E., and Bejar, V. (2012). The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. *Molecules*, 17, 7103-7120.
- Llamas, I., Mata, J. A., Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M. C., Quesada, E., and Bejar, V. (2010). Characterization of the exopolysaccharide produced by *Salipiger mucosus* A3^T, a halophilic species belonging to the *Alphaproteobacteria*, isolated on the Spanish Mediterranean Seaboard. *Marine Drugs*, 8, 2240-2251.
- Lü, Y., Lu, H., Wang, S., Han, J., Xiang, H., and Jin, C. (2017). An acidic exopolysaccharide from *Haloarcula hispanica* ATCC33960 and two genes responsible for its synthesis. *Archaea*, 1-12.
- Madern, D., Ebel, C., and Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4, 91-98.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K.S., Buckley, D. H., and Stahl, D. A. (2017). *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, (çev. C. Çökmüş), (Ondördüncü Baskı), Ankara: Palme Yayıncılık, 40-522.
- Manivasagam, P., Sivasankar, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., and Kim, S. (2013). Production and characterization of an extracellular polysaccharide from *Streptomyces violaceus* MM72. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 29-38.
- Margesin, H. and Schinner, F. (2001a). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5, 73-83.
- Margesin, R. and Schinner, F. (2001b). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 650-663.
- Martin, D. D., Ciulla, R. A., and Roberts, M. F. (1999). Osmoadaptation in archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1815-1825.
- Martinez-Checa, F., Toledo, F. L., El Mabrouki, K., Quesada, E., and Calvo, C. (2007). Characteristics of bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: Chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. *Bioresource Technology*, 98, 3130–3135.
- Mata, J. A., Bejar, V., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M. C., Quesada, E., and Llamas, I. (2008). Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family *Alteromonadaceae*. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 521-528.
- Mata, J. A., Bejar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M. C., and Quesada, E. (2006). Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Research in Microbiology*, 157, 827-835.
- Matsunaga, T., Sudo, H., Takemasa, H., and Wachi, Y. (1996). Sulfated extracellular polysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytica* immobilized on light-diffusing optical fibers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 24-27.
- Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Panico, A., Lama, L., and Gamb, A. (2002). Halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marina hot spring. *Biotechnology Letters*, 24(7), 515-519.
- Mitsuda, S., Miyata, N., Hirota, T., and Kikuchi, T. (1981). High viscosity polysaccharide produced by *Bacillus polymyxa*. *Hakkokogaku*, 59, 303-309.
- Moriello, V. S., Lama, L., Poli, A., Gugliandolo, C., Maugeri, T. L., Gambacorta, A., and Nicolaus, B. (2003). Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 95–101.
- Mutlu, M. B. (2006). *Tuz Gölü bakterilerinin karakterizasyonu ve mevsimsel dağılımı*. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 1-162.

- Mutlu, M. B., Garcia, M. M., Santos, F., Peña, A., Guven, K., and Antón, J. (2008). Prokaryotic diversity in Salt Lake, a hypersaline environment in inland Turkey. *Ecology*, 65(3), 3474-3483.
- Navon-Venezia, S., Banin, E., Ron, E. Z., and Rosenberg, E. (1998). The bioemulsifier alasan: role of protein in maintaining structure and activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 382-384.
- Nicholson, C. A. (2005). *Biodegradation of petroleum hydrocarbons by halophilic and halotolerant microorganisms*. Master Thesis, Oklahoma State University, USA, 3- 40.
- Nicolaus, B., Kambourova, M., and Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: From fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31(10), 1145-1158.
- Nicolaus, B., Lama, L., Esposito, E., Manca, M. C., Improta, R., Bellitti, M. R., Duckworth, A. W., Grant, W. D., and Gambacorta, A. (1999). *Haloarcula* spp. able to biosynthesize exo- and endopolymers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23, 489-496.
- Nieto, J. J., Ventosa, A., and Ruiz-Berraquero, F. (1987). Susceptibility of halobacteria to heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1199-1202.
- Nouha, K., Hoang, N. Y., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. (2015). Characterization of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Cloacibacterium normanense* isolated from wastewater sludge for sludge settling and dewatering. *Journal of Civil and Environmental Engineering*, 5, 6.
- Nour El-Dein, M. M., El-Fallal, A. M., Toson, E. A., and Hereher, E. F. (2004). Exopolysaccharides production by *Pleurotus pulmonarius*: Factors affecting formation and their structures. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(6), 1078-1084.
- Nwodo, U. U., Green, E., and Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 14002-14015.
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J. L., and Mah, R. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiological Reviews*, 58(1), 27-38.
- Ölmez, Z. (2009). *Süt sanayisinde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ve biyofilm oluşumunun önlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 5-11.
- Oren, A. (1983). *Clostridium lortetii* sp. nov., a halophilic obligatory anaerobic bacterium producing endospores with attached gas vacuoles. *Archives of Microbiology*, 136, 42-48.
- Oren, A. (1999). *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*. Boca Raton, CRC Press, 1-384.

- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 56-63.
- Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*, 31, 825-834.
- Oren, A. (2011). *Diversity of halophiles*. Extremophiles handbook. Ed.: Horikoshi, K. Japan, Tokyo, 309–325.
- Oren, A., Gurevich, P., Azachi, M., and Henis, Y. (1992). Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. *Biodegradation*, 3, 387–398.
- Oren, A., Gurevich, P., Gemmell R. T., and Teske, A. (1995). *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 747-754.
- Oren, A., Pohla, H., and Stackebrandt, E. (1987). Transfer of *Clostridium lortetii* comb. nov. and description of *Sporohalobacter marismortui* sp. nov.. *Systematic and Applied Microbiology*, 9, 239-246.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49-79.
- Ovchinnikov, Y. A., Abdulaev, N. G., Feigina, M. Y., Kiselev, A. V., and Lobanov, N. A. (1979). The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: An overview. *FEBS Letters*, 100, 219–224.
- Özcan, B. (2004). *Türkiye’den haloofilik arkebakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-37.
- Öztürk, B. Ş., Sakarya, S., Öncü, S., ve Ertuğrul, B. M. (2008). Biyofilmler ve yabancı cisim infeksiyonları. *Klinik Dergisi*, 21(3), 79–86.
- Öztürk, S., Aslım, B., and Suludere, Z. (2010). Cadmium(II) Sequestration characteristics by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresource Technology*, 101(24), 9742–9748.
- Parolis, H., Parolis, L. A. S., Boan, I. F., Rodriguez-Valera, F., Widmalm, G., Manca, M. C., Jansson, P. E., and Sutherland, I. W. (1996). The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). *Carbohydrate Research*, 295, 147-156.
- Patel, R. M. and Desai, A. J. (1997). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 91-94.
- Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G. R., and Nicolaus, B. (2011). Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea*, 1-13.

- Poli, A., Kazak, H., Gürleyendağ, B., Tommonaro, G., Pieretti, G., Öner, E. T., and Nicolaus, B. (2009). High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydrate Polymers*, 78, 651-657.
- Qian, C., Li, W., Li, H., Ou, D., Zhu-Ge, Y., and Liu, Y. (2018). Responses of genes for the uptake of glycine betaine in *Virgibacillus halodenitrificans* PDB-F2 under NaCl stress. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 132, 192–199.
- Quesada, E., Bejar, V., and Calvo, C. (1993). Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia*, 49, 1037–1041.
- Quesada, E., Bejar, V., Ferrer, M. R., Calvo, C., Llamas, I., Martínez-Checa, F., Arias, S., Ruíz-García, C., Páez, R., Martínez-Cánovas, M. J., and del Moral, A. (2004). *Moderately halophilic exopolysaccharide producing bacteria*. Berlin, In: Ventosa, A. (Ed.), *Halophilic Microorganisms*, Springer-Verlag, 295–314.
- Qurashi, A. W. and Sabri, A. N. (2012). Biofilm formation in moderately halophilic bacteria is influenced by varying salinity levels. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 566–572.
- Radchenkova, N., Boyadzhieva, I., Atanasova, N., Poli, A., Finore, I., Di Donato, P., Nicolaus, B., Panchev, I., Kuncheva, M., and Kambourova, M. (2018). Extracellular polymer substance synthesized by a halophilic bacterium *Chromohalobacter canadensis* 28. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 4937-4949.
- Rafigh, S. M., Yazdi, A. V., Vossoughi, M., Safekordi, A. A., and Ardjmand, M. (2014). Optimization of culture medium and modeling of curdlan production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 463–473.
- Rainey, F. A., Zhilina, T. N., Boulygina, E. S., Stackebrandt, E., Tourova T. P., and Zavarzin, G. A. (1995). The taxonomic status of the fermentative halophilic anaerobic bacteria: description of Halobacteriales ord. nov., Halobacteroidaceae fam. nov., Orenia gen. nov., and further taxonomic rearrangements at the genus and species level. *Anaerobe*, 1: 185-199.
- Ramos-Cormenzana, A. (1993). *Ecology of moderately halophilic bacteria*. In: The Biology of Halophilic Bacteria, (Ed. R. H. Vreeland and L. I. Hochstein), Boca Raton, CRC Press, 55-86.
- Rocha, M. V. P., Oliveira, A. H. S., Souza, M. C. M., and Gonçalves, L. R. B. (2006). Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1295–1299.
- Rodriguez-Valera, F. (1993). *Introduction to saline environments*. In: The Biology of Halophilic Bacteria, (Ed. R. H. Vreeland and L. I. Hochstein), Boca Raton, CRC Press, 1-12.
- Romano, I., Gambacorta, A., Lama, L., Nicolaus, B., and Giordano, A. (2005). *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus* subsp. nov., a haloalkaliphilic aerobe from Campania Region (Italy). *Systematic and Applied Microbiology*, 28(1), 34-42.

- Ruas-Madiedo, P. and de los Reyes-Gavilan, C. G. (2005). Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 843–56.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., and Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163–171.
- Sakarya, S. (2005). Biyofilm yapısı ve infeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. *Klimik Dergisi*, 18(1), 3-8.
- Sarikaya, H. (2014). *Laktik asit bakterilerinin kültür filtratları ve ekzopolisakkaritlerinin (EPS) bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) ve antibiyofilm etkilerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-89.
- Sarikaya, H., Aslim, B., and Yuksekdağ, Z. (2017). Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (l-EPSs) from Lactobacilli strains. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 362-371.
- Saum, S. H. and Müller, V. (2008). Growth phase-dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile: Ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*. *Environmental Microbiology*, 10, 716-726.
- Sekoulov, I. and Görg, S. (1995). Endüstriyel atıksu arıtımında sabit yataklı sistemler. *Su Kirliliği ve Kontrolü Dergisi*, 5(2), 9-16.
- Sellek, G. A. and Chaudhuri, J. B. (1999). Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Biotechnology*, 25, 471-482.
- Sethi, D., Mohanty, S., and Pattanayak, S. K. (2019). Effect of different carbon, nitrogen, and vitamin sources on exopolysaccharide production of *Rhizobium* species isolated from root nodule of redgram. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 56, 86-93.
- Shi, X. and Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 407-413.
- Simoes, M., Simoes, L. C., and Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
- Singh, A. and Singh, A. K. (2017). Haloarchaea: Worth exploring for their biotechnological potential. *Biotechnology Letters*, 39(12), 1793-1800.
- Söğütçü, E., Emrence, Z., Arikan, M., Cakiris, A., Abaci, N., Öner, E. T., Ustek, D., and Arga, K. Y. (2012). Draft genome sequence of *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Journal of Bacteriology*, 194(20), 5690-5691.
- Soyuçok, A., Ekiz, T., ve Kılıç, G. B. (2016). Ekzopolisakkaritlerin önemi ve gıda sanayideki önemi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD*, Özel Sayı, 332-344.

- Spring, S., Ludwig, W., Marquez, M. C., Ventosa, A., and Schleifer, K. H. (1996). *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov., and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46, 492-496.
- Squillaci, G., Finamore, R., Diana, P., Restaino, O. F., Schiraldi, C., Arbucci, S., Lonata, E., La Cara, F., and Morana, A. (2015). Production and properties of an exopolysaccharide synthesized by the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), 613-623.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., and Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-9.
- Sutherland, I. (2002). A sticky business. Microbial polysaccharides: Current products and future trends. *Microbiology Today*, 29, 70–71.
- Sutherland, I. W. (1977). Microbial Exopolysaccharide synthesis. In Extracellular Microbial Polysaccharides, (eds Sanford, P. A. and Laskin, A.), *Journal of the American Chemical Society*, Washington, 40-57.
- Sutherland, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, 16, 41-46.
- Sutherland, I. W. (1999). Microbial polysaccharide products. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 16, 217-230.
- Tallon, R., Bressollier, P., and Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154, 705–712.
- Taşdelen, E. (2018). *Ekzopolisakkarit üreticisi Lactobacillus plantarum suşlarının tarhananın kalite özellikleri üzerine etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 2-16.
- Tavernier, P., Portais, J. C., Nava Saucedo, J. E., Courtois, J., Courtois, B., and Barbotin, J. N. (1997). Exopolysaccharide and Poly- β -Hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 21-26.
- Thongthai, C. and Suntinanalert, P. (1991). *Halophiles in Thai fish sauce (Nam Pla)*. In: General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms, (Ed. F. Rodriguez-Valera), New York, Plenum Press, 381-388.
- Tsuda, H., Hara, K., and Miyamoto, T. (2008). Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *Journal of Dairy Science*, 91, 2960-2966.
- Turhan, E. Ü. ve Erginkaya, Z. (2019). Bakteriyel biyofilmlerdeki antimikrobiyel direnç mekanizması. *Akademik Gıda*, 17(1), 131-139.

- Ünal, D. (2011). *Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas, Klebsiella, Staphylococcus ve Candida cinsi mikroorganizmalarda biyofilm varlığının araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-298.
- Ventosa, A. (2006). *Unusual micro-organisms from unusual habitats: Hypersaline environments*. In: Prokaryotic Diversity-Mechanism and Significance, (Ed. N.A. Logan H. M. Lappin-Scott and P. C. F. Oyston), Cambridge, Cambridge University Press, 223-254.
- Ventosa, A. and Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 85-94.
- Ventosa, A., Gutierrez, M. C., Garcia M. T., and Ruiz-Berraquero, F. (1989). Classification of *Chromohalobacter marismortui* in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39, 382-386.
- Ventosa, A., Nieto J. J., and Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 504-544.
- Vestby, L. K., Moretro, T., Langsrud, S., Heir, E., and Nesse, L. L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 5, 20, 43-48.
- Vilhelmsson, O., Hafsteinsson, H., and Kristjánsson, J. K., (1996). Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from fully cured salted cod (bachalao). *Journal of Applied Microbiology*, 81, 95-103.
- Völkel, S., Fröls, S., and Pfeifer, F. (2018). Heavy metal ion stress on *Halobacterium salinarum* R1 planktonic cells and biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 9:3157, 1-14.
- Vreeland, R. H. (1987). Mechanisms of halotolerant in microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 14, 311-356.
- Vreeland, R. H. and Huval, J. H. (1991). *Taxonomy of halophilic bacteria from underground saline waters and salt formations*. In: General and Applied Aspects of Halophilic Bacteria, (Ed. F. Rodriguez-Valera), New York, Plenum Press, 53-60.
- Waino, M., Tindall, B. J., and Ingvorsen, K. (2000). *Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the archaea from Great Salt Lake, Utah. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 183-190.
- Wang, J., Salem, D. R., and Sani, R. K. (2019). Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate Polymers*, 205, 8-26.

- Welman, A. D., Maddox, I. S., and Archer, R. H. (2006). Metabolism associated with raised metabolic flux to sugar nucleotide precursors of exopolysaccharides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(5), 391.
- Yang, Y., Shao, Z., Du, J., He, Q., and Chai, H. (2018). Enhancement of organic matter removal in an integrated biofilm-membrane bioreactor treating high-salinity wastewater. *Archaea*, 1-8.
- Yavuz, G. (2017). *Nanoteknolojik dezenfektanların etkinliği ve biyofilm üzerine etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-116.
- Yavuztürk, B. (2005). *Ekstremofillerin ülkemiz Çamaltı Tuzlasından izole edilmesi ve tanılanması*. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 18- 73.
- Yılmaz, M. M. (2019). *Ayvalık Tuzlası (Balıkesir) 'ndan halofilik bakterilerin izolasyonu ve biyoteknolojik enzim potansiyellerinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, 1-95.
- Yılmaz, M. ve Çelik, G. Y. (2007). Bakteriyel ekstraselüler polisakkaritler (EPS). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(2), 7-13.
- Zeikus, J. G., Hegge, P. W., Thomson, T. E., Phelps, T. J., and Langworthy, T. A. (1983). Isolation and description of *Haloanaerobium praevalens* gen. nov. and sp. nov., an obligately anaerobic halophile common to Great Salt Lake sediments. *Current Microbiology*, 9, 225-233.
- Zheng, C., Li, Z., Su, J., Zhang, R., Liu, C., and Zhao, M. (2012). Characterization and emulsifying property of a novel bioemulsifier by *Aeribacillus pallidus* YM-1. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1), 44–51.
- Zhu, P., Chen, X., Li, S., Xu, H., Dong, S., Xu, Z., and Zhang, Y. (2014). Screening and characterization of *Sphingomonas* sp. mutant for welan gum biosynthesis at an elevated temperature. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(9), 1849–1858.
- Zhuang, X. L., Han, Z., Bai, Z. H., Zhuang, G. Q., and Shim, H. J. (2010). Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil. *Environmental Pollution*, 158, 1119–1126.
- Zivkovic, M., Miljkovic, M., Madieto, P., Strahinic, I., Tolinacki, M., Golic, N., and Kojic, M. (2015). Exopolysaccharide production and ropy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1387-1396.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BAŞER, Hilal
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 24.08.1994, Aydın
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0551 592 94 00
 e-mail : baserrhilal@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2016
Lise	Celal Yardımcı Anadolu Lisesi	2012

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
-		

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Başer, H. ve Yüksekdağ, Z. (2019, June 28-29). *Halofilik bakterilerde ekzopolisakkarit (EPS) üretimi*, 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem), Ankara, Turkey.

Başer, H. ve Yüksekdağ, Z. (2019). Halofilik bakterilerde ekzopolisakkarit (EPS) üretimi, *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2(2), 84-89.

Hobiler

Yüzme



GAZİ GELECEKTİR..