

**Halofilik Mikroorganizmaların
Elektron Mikroskopi ile Görüntülenmesi**

Ekin BORA

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs, 2015

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1304F072**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ekin BORA'nın "Halofilik Mikroorganizmaların Elektron Mikroskopi ile Görüntülenmesi" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 10.04.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	<u>Adı Soyadı</u>	İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU
Üye	: Yard. Doç. Dr. Volkan KILIÇ
Üye	: Yard. Doç. Dr. İsmail POYRAZ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HALOFİLİK MİKROORGANİZMALARIN ELEKTRON MİKROSKOPİ İLE GÖRÜNTÜLENMESİ

Ekin BORA

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

2015, 64 Sayfa

Elektron mikroskopları, mikrobiyolojik alanda çok kullanılan ve geliştirilmiş mikroskop türleridir. Bunlar sayesinde her türlü mikroorganizmayı ve hücreyi incelemek ve ince yapısı hakkında bilgi edinmek mümkündür. Elektron mikroskopları yüksek çözünürlük görüşleri ile ışık mikroskoplarına oranla çok ince detaylara ulaşmayı sağlarlar.

Ekstremofilik mikroorganizmaların yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan üyeleri halofilik mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadır. Bir diğer tanımla bu mikroorganizmalar, Sodyum klorür'ün doyma noktasına yakın ya da doyma noktasında olduğu ortamlarda yaşayan mikroorganizmalardır. Halofilik mikroorganizmalar hipersalin ortamlarda bulunurlar. Bu çalışmada izole ettiğimiz halofilik mikroorganizmalar ve hipersalin çevre örnekleri elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Halofilik Mikroorganizmalar, Hipersalin çevreler, Taramalı Elektron Mikroskop

ABSTRACT

Master of Science Thesis

EXAMINATION OF STRUCTURE OF HALOPHILIC MICROORGANISMS WITH USING ELECTRON MICROSCOPY

Ekin BORA

Anadolu University Graduate School of Sciences

Department Of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

2015, 64 pages

Electron microscopes are widely used at microbiological field and they are type of improved microscope. It is possible to examine all kinds of microorganisms and cells and learn about the fine structure of them. With the high resolution views, electron microscope allows to achieve very fine detail than light microscope.

Extremophilic microorganisms members who live in high salt concentrations are called halophilic microorganisms. In another definition, these microorganisms live near the saturation point of sodium chloride or in saturation of sodium chloride. Halophilic microorganisms live at hypersaline environments. In this study, isolated halophilic microorganisms and samples from hypersaline environments have been analyzed by electron microscopy.

Key Words: Halophilic Microorganisms, Hypersaline Environments, Scanning Electron Microscope

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince düşünce ve önerileri ile beni yönlendirip destek olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya,

Bugüne kadar her konuda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili annem, babam ve ablama,

Tüm bu süreçte beni cesaretlendiren ve hep yanımda olan sevgili Oğuzhan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekin BORA

Mayıs, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Halofilik Mikroorganizmalar	3
1.1.1. Ekstrem Halofilik Archaea Taksonomisi	9
1.2. Elektron Mikroskopları	12
1.2.1. Transmisyon/ Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM).....	13
1.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	14
1.3. Konu ile İlgili Önceki Çalışmalar	16
2. MATERYAL VE METOD	19
2.1. Materyal	19
2.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	19
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	20
2.1.3. Kullanılan Besiyeri ve Tamponlar.....	20
2.1.4. Mikroorganizma Olarak Kullanılan Kültürler ve Referansları	27
2.1.5. Kullanılan Su Örnekleri	27
2.2. Metod	27

3. BULGULAR	38
3.1. Su Örneklerindeki Mikrobiyal Çeşitliliğin SEM ile Görüntülenmesi	38
3.2. Kültürlerden Hazırlanan Filtreler ile Elde Edilen SEM Fotoğrafları	43
4. TARTIŞMA	47
KAYNAKÇA	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Mikroorganizmaların büyümesinde NaCl konsantrasyonunun etkisi	5
1.2. İyonların ve Diğer Moleküllerin Halofilik Bakterilerde Membran Boyunca Geçiş Hareketleri.....	9
1.3. TEM'in çalışma prensibi.....	14
1.4. SEM çalışma prensibi	16
2.1. Thermanox veya Aclar malzemelerin istenilen boyutlara getirilmesi.....	29
2.2. Silikon diskin çıkarılıp, süspansiyon içerisindeki numunenin işlem görmesi işlemi.....	30
2.3. Membran filtresinin çıkarılıp transfer edilmesi.....	33
2.4. Örnek kabının kapağının kapatılması örneği.....	33
2.5. SEM taslağına yapıştırılan çift taraflı alüminyum.....	35
2.6. Yapıştırıcı üzerine yerleştirilen membran filtresi.....	36
2.7. İletken boya uygulanan taslak.....	36
3.1. Filtre edilen su örnekleri.....	38
3.2. Filtre edilen su örnekleri.....	38
3.3. Filtre edilen su örnekleri.....	39
3.4. Filtre edilen su örnekleri.....	40
3.5. Tuz Gölü su örneğinden başka bir görüntü alanı.....	41
3.6. Tuz Gölü örneği SEM görüntü alanı.....	41
3.7. Sivas Tuzla gözü örneği SEM görüntü alanı.....	42
3.8. Sivas Tuzla gözü örneği SEM görüntü alanı.....	42

3.9. ZB1 izolatu ile elde edilen SEM görüntüleri.....	43
3.10. ZB1 izolatu ile elde edilen SEM görüntüleri.....	44
3.11. HP2 sıvı kültürü.....	45
3.12. HP2 sıvı kültürü.....	45
3.13. HP2 sıvı kültürü.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Ekstremofiller ve buldukları ekstrem çevre koşulları.....	3
1.2. Dünya'daki önemli tuzlu gölleri.....	6
1.3. Halobacterials ordosuna ait cinsler ve türler.....	11
2.1. Yapay deniz suyu konsantrasyonu içeriği.....	20
2.2. Konsantre tuzlu su stok solüsyonu içeriği.....	21
2.3. Farklı yüzdelerdeki MGM ortamları için gerekli olan malzemeler.....	22

1. GİRİŞ

Ekstremofil; çoğunlukla tek hücreli olup ekstrem koşullarda yaşama gereksinim duyan ve bu koşullarda optimum olarak gelişen organizmalara denilmektedir. Ekstremofiller karasal mezofilik organizmaların büyümeleri ve üremeleri için gerekli optimal koşullardan çok farklı olan ekstrem çevrelerde gelişirler. Çoğu ekstremofiller (ekstrem koşulları seven) mikroorganizmalardır. Archaea domaini ekstremofillerin geniş dağılımlı olduğu bir domain olarak bilinmesine karşın, ekstremofiller hem bakterilerin hem de archaeaların içinde sayısız ve farklı genetik hatlarda yer almaktadır. Archaea ve ekstremofil terimleri ara sıra kendi içerisinde yer değiştirmesine karşın, pek çok mezofilik archaeaların ve pek çok ekstremofilik bakterilerin olduğu bilinmektedir.

Ekstremofil kelimesi (extreme: aşırı, uç; phile: sevmek) ilk olarak 1974 yılında MacElroy tarafından kullanılmıştır. Ekstremofiller, dünya yüzeyinin 3 km altında, nükleer reaktörlerde, hidrotermal ventlerde, asitli kaynaklarda, tuz kristallerinde, yüksek ağır metal içeren bölgelerde, kutup buzları ve göllerinde, basınçlı ortamlarda ve anaerobik koşullarda gelişebilen mikroorganizma gruplarına verilen isimdir. Bu aşırı şartlar; sıcaklık, radyasyon, basınç gibi fiziksel şekilde olabildiği gibi; tuzluluk, kuruluk, pH, oksijen durumu, redoks potansiyeli, metaller ve gazlar gibi jeokimyasal biçimlerde de olabilmektedir (Coşkun, 2010).

Günümüzde endüstride yaygın olarak kullanılan mezofilik mikroorganizmaların avantajlarının fazla olmasına rağmen kimyasal işlemlerdeki ekstrem pH, sıcaklık ve iyon konsantrasyonu gibi uygulamalarda kullanımları sınırlı kalmaktadır. Buna karşılık ekstrem mikroorganizmalardan elde edilen enzimler (ekstreozimler) bahsedilen sert koşullara dayanıklıdır. Bu nedenle ekstreozimler son 20 yılda biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Coşkun, 2010).

Bu enzimler ayrıca protein mühendisliğinde termoaktivite ve termostabilitenin tam olarak anlaşılabilmesi için model enzimler olarak kullanılmaktadır (Coşkun, 2010).

Ekstremofiller, diğer bir çok mikroorganizmanın yaşayamayacağı ortamlarda gelişebilen mikroorganizmalardır. Ekstrem çevre koşulları; çok yüksek (55-121 °C) ya da çok düşük (-2-20 °C) sıcaklık, yüksek tuzluluk (2-5 M NaCl) ve çok yüksek alkali (pH > 8) ya da çok yüksek asitli (pH < 4) koşullardır (Fukara, 2007). Ekstremofilleri buldukları çevresel koşullara göre 7'ye ayırmak mümkündür.

Termofiller (Thermophiles),

Psikrofiller (Psychrophiles),

Alkalifiller (Alkaliphiles),

Asidofiller (Acidophiles),

Halofiller (Halophiles),

Barofiller (Barophiles),

Metalofiller (Metalophiles).

Ekstremofiller, yüksek basınç, yüksek radyasyon ya da toksik bileşik içeren ortamlarda, yeryüzünden çok derinde bulunan kayalarda ya da su seviyesi ve besin miktarı çok düşük olan kuru ortamlarda yaşamlarını sürdürebilen mikroorganizmalardır. Ekstremofillerin optimum gelişme sıcaklıkları ve bulunabildikleri çevreler Çizelge 1.1'de gösterilmektedir (Fukara, 2007).

Çizelge 1.1. Ekstremofiller ve buldukları ekstrem çevre koşulları (Fukara, 2007)

Fenotip	Ortam	Mikroorganizma
Termofilik	55-80 °C	<i>Methanobacterium</i> , <i>Thermoplasma</i> , <i>Thermus</i> ve bazı <i>Bacillus</i> türleri
Hipertermofilik	80-113 °C	<i>Aquifex</i> , <i>Archaeoglobus</i> , <i>Hydrogenobacter</i> , <i>Methanothermus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrodictium</i> , <i>Pyrolobus</i> , <i>Sulfolobus</i> , <i>Thermococcus</i> , <i>Thermoproteus</i> , <i>Thermotoga</i>
Psikrofilik	-2- 20 °C	<i>Alteromonas</i> , <i>Psychrobacter</i>
Halofilik	2- 5 M NaCl	<i>Haloarcula</i> , <i>Halobacterium</i> , <i>Haloferax</i> , <i>Halorubrum</i>
Asidofilik	pH < 4	<i>Acidianus</i> , <i>desulfurolobus</i> , <i>Sulfolobus</i> , <i>Thiobacillus</i>
Alkafilik	pH > 9	<i>Natronobacterium</i> , <i>Natronococcus</i> ve bazı <i>Bacillus</i> türleri

Çalışmamızda kullandığımız mikroorganizmalar halofil mikroorganizmalar olduğundan bu grup ile ilgili genel açıklamalarda bulunulacaktır.

1.1. Halofilik Mikroorganizmalar

Yunanca kökenli olan hals; tuz ve phile ise sevmek anlamına gelmektedir ve halofilik mikroorganizmalarda fonksiyon yeteneği için tuza olan ihtiyacı ifade eder. Halofilik mikroorganizmalar tuzu seven mikroorganizmalardır (Coşkun, 2010). Halofilik prokaryotlar içerisinde hem bakterilere hem de arkebakterilere ait türler bulunur. Bu mikroorganizmalar tuz göllerinde, tuz üretim tesislerinde ve tuzlanmış balık ve derilerin yüzeyinde bulunurlar. Hafif derecede halofiller 0.20-0.85M (%2-5), ılımlı halofiller 0.85-3.4M (%5-20) ve ekstrem halofiller ise üremeleri için 3.4-5.1M (%20-30) NaCl konsantrasyonuna ihtiyaç duyarlar. (DasSarma ve Arora, 2001; Rothschild ve Mancinelli, 2001; Grant, 2004)

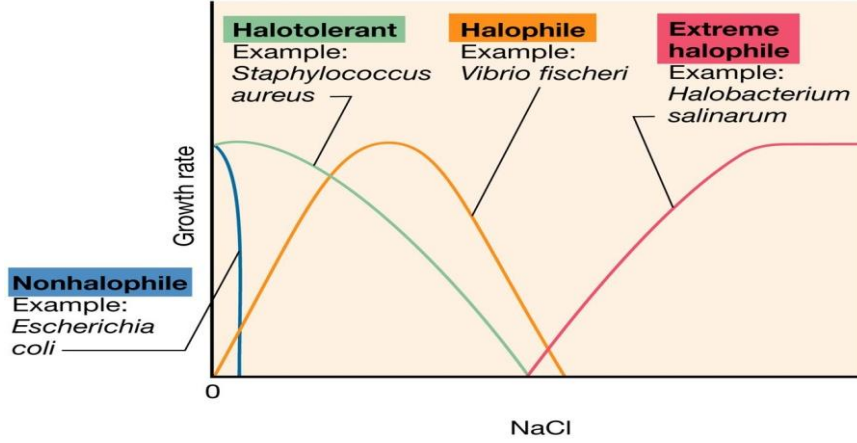
Horikoshi ve Grant (1998) 'a göre, ekstremofilik mikroorganizmaların yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan üyeleri olan halofiller Archaea, Bacteria ve Eucarya olarak üç alanda da yer almaktadır.

Kushner' e (1978) göre ise;

- halofil olmayanlar (non-halophiles) (0-1 M),
- hafif halofiller (slight halophiles) (0,2-2,0 M),
- ılımlı halofiller (moderately halophiles) (0,4-3,5 M),
- ekstreme yakın halofiller (extreme close halophiles) (1,4-4,0 M),
- ekstremler halofiller (extreme halophiles) (2,0-5,2 M),
- halotolerantlar (halotolerant halophiles) (0-1 M) ve
- değişken halofiller (variable halophiles) (0-3 M) olarak sınıflandırılmışlardır (Coşkun, 2010).

En yaygın ökaryotik halofiller *Dunaliella*, *Artemia salina* ve *Ephydra* gibi organizmalardır (Bayramoğlu, 2012). *Salinibacter ruber* en ekstrem halofilik bakteridir. Archea domaininde yer alan ve tuzun çökme noktasına yakın konsantrasyonlarda yaşayabilen *Halobacterium*, *Haloarcula* ve *Haloferax* gibi genuslar bulunmaktadır (Bayramoğlu, 2012).

Şekil 1.1'de tuz toleransları ve istekleri farklı olan mikroorganizmaların büyümesinde farklı Sodyum iyonu konsantrasyonlarının etkisi gösterilmektedir. *V. fischeri* gibi deniz mikroorganizmaları için optimum NaCl konsantrasyonu yaklaşık olarak %3'tür, ekstrem halofiller için bu oran organizmaya göre değişmekle birlikte %15-%30 arasındadır (Randla, 2015).



Şekil 1.1. Mikroorganizmaların büyümesinde NaCl konsantrasyonunun etkisi (Randla, 2015).

Ekstrem Halofil Archaea üyeleri, tuzlu buhar gölleri, doğal tuz gölleri, yüksek tuz çevreleri veya çok tuzlanmış bazı balık ve et yüzeyleri gibi suni tuz habitatlarında bulunan prokaryotların farklı bir grubudur. Böyle habitatlar genellikle “hipersalin” olarak adlandırılır. Ekstrem halofilik terimi bu organizmaların sadece halofilik değil, aynı zamanda tuz ihtiyaçlarının oldukça yüksek olup, bazı durumlarda doygunluk noktasına yakın olduğunu belirtmektedir. Ekstrem halofiller bazı sosis, deniz balığı ve tuzlu domuz eti gibi fazla tuzlu besinlerde de bulunurlar. Bazı estetik problemlere neden olmasının dışında, ekstrem halofillerin besinlerde üremesi çok önemli değildir. Bu yüzden hiçbir ekstrem halofilin besin zehirlenmesine neden olduğu görülmemiştir. Tuzlu habitatlar dünya üzerinde yaygın olmakla beraber, ekstrem tuz habitatları daha nadirdir. Çoğu ekstrem tuzlu habitatlar dünyanın sıcak, kuru bölgelerinde bulunmaktadır (Uçar ve ark., 2007).

Bu bölgelerdeki iklimsel şartlar buharlaşmaya ve böylece tuz konsantrasyonunun artmasına sebep olur. Bununla beraber tuz gölleri iyonik kompozisyon açısından önemli derecede değişkenlik göstermektedir (Uçar ve ark., 2007). Çevrenin jeoloji, topografi ve genel iklim koşullarına göre tuz göllerinin sahip olduğu iyonlar değişebilir. Thalassohalin ve Athalassohalin olmak üzere 2 grup hipersalin (aşırı tuzlu) ortam bulunmaktadır (Bayramoğlu, 2012).

Thalassohalin ortamlar; deniz suyu özelliklerini taşıyıp Na⁺ ve Cl⁻ (monovalent) iyonlarını fazlaca bulundurur, bunların dışında SO⁻²₄ de yapılarında bulunur ve hafif alkali veya nötral pH'ya sahiptir. Athalassohalin ortamlar ise iyonik kompozisyonu deniz suyundan oldukça farklı olan yüksek konsantrasyonda karbonat/bikarbonat içeren, pH değeri 10-11 ya da daha fazla olan ortamlardır. Utah'daki Büyük Tuz Gölü thalassohalin ve İsrail'deki Ölü Deniz athalassohalin ortamlara örnektir (Bayramoğlu, 2012).

Çizelge 1.2. Dünya'daki önemli tuzlu gölleri (Bayramoğlu, 2012)

Göl	Tuzluluk (g/L)	Göl	Tuzluluk (g/L)	Göl	Tuzluluk (g/L)
Great Salt Lake	150-280	Hazar	(10)-(12)	Zarınanmu	12
Salton	33	Aral	(8)-(10)	Dabuxun	380
Pyramid	5,3	Balkaş	0,5-7	Dalay	5,5
Big Quill	43-53	Işık	5,6	Urmiye	300+
Mono	95	Canı	1,5-4	Van	24
Walker	10,6	Ala	(5)-(7)	Niriz	(7)-(56)
Natron	340	Tengiz	(3)-(19)	Tuzgölü	300+
Magadi	114	Koko	12,5	Ölüdeniz	300+
Nakuru	10-120	Lop Nor	5	Eyre	(-50)-(+300)
Bogoria	50	Namu	3	Corangamite	30-50
Elmenteita	29,5	Selin	19	Bullen Meri	9

Yüksek tuz konsantrasyonunda, (burada toplam tuz aralığı tipik olarak %15 ağırlık/hacim olan, doygunluğu %35'e kadar olabilen durumlardan bahsedilmektedir) hayatta kalabilen bazı organizmalar ve bazı protist grazerler yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Deniz suyunun toplam tuz, özellikle de sodyum klorür oranı yaklaşık %3.5' tur. Ancak halobacteria sadece %12'lik tuz varlığında büyüyebilir ve de optimum büyüme için ihtiyaç duyduğu oran %20-25 arasındadır (Dyall-Smith, 2009).

%8 oranındaki tuz birikintilerinde halofilik arkeler kısmen 16S rRNA dizilimiyle saptanmıştır. Yine yapılan çalışmalarda izole edilen halofilik arkeler %10'luk tuz konsantrasyonunda optimal büyüme göstermiştir (Purdy ve ark., 2004).

Halofilik mikroorganizmalar temel olarak yüksek tuz içeren ortamlara adaptasyon için iki strateji geliştirmişlerdir. Halofilik arkeler, sitoplazmalarını ozmotik dengede tutmak için ortamda bulunan tuzu depolarlar. Ozmoregülasyonun bu mekanizması ortamda yüksek miktarda tuz varlığında hücre içi enzimler ile bazı özel adaptasyonları gerektirir. Diğer yöntemlere göre ise, halofilik ya da halotolerant bakterilerin hücre içi tuz konsantrasyonları düşüktür ve hücre içi enzimlerin özel bir tuz toleransları yoktur. Dış ortam ile ozmotik dengeyi ortamda çözünmüş olarak bulunan yüksek konsantrasyonlu çeşitli organik ozmotik bileşenleri depo ederek devam ettirirler (Sağır, 2014).

Düşük-tuz; organik çözünür madde biriktirme stratejisi (Compatible Solute Stratejisi): Bu stratejide hücreler sitoplazmalarında ozmotik potansiyeli organik çözünenlerle dengeleyerek düşük tuz konsantrasyonu içerir. Bu işlemi çözücülerini olarak veya sentezleyerek yaparlar. Çözünenler gliserol, şekerler ve türevleri, aminoasitler ve türevleri, glisin, betain, ektoin olabilir. Fazla enerji gerektiren bir işlemdir. Enerji hem sentez hem de aynı zamanda çözünür tuzları dışarı pompalama için kullanılır. Hücreler dış ortamla ozmotik olarak eş değer içi konsantrasyona sahip olabilirler (Sağır, 2014).

Yüksek-tuz biriktirme stratejisi (Salt-in Stratejisi): Bunu potasyum klorid'in yüksek konsantrasyonlarını biriktirerek sağlarlar. Potasyum iyonları hücreye uniport sistem aracılığıyla pasif olarak girer. Sodyum iyonları dışarı pompalanır. Klorür sodyum iyonları ise co-transport yoluyla zar potansiyeli karşı hücreye girer. Hücre proteinlerinin stabilite ve aktivite bakımından KCl ya da diğer tuzların molar konsantrasyonlarına ihtiyaç vardır. Hücre içine yüksek oranda K^+ iyonları aktarılır ve hücre içine aktarılan K^+ konsantrasyonu hücre dışı Na^+ konsantrasyonundan oldukça yüksek bir hal alır. K^+ iyonları hücrenin su dengesini sağlamada, hücrenin dehidrasyonunu ve osmotik basıncın yükselmesini engellemede görev alır. Yüksek iyonik kuvvette proteinler kümeleşme eğilimi gösterdiğinden aktivite ve stabilite özelliklerini kaybederler. Bu nedenle hücre mekanizmaları ortama adaptasyonu sağlama eğiliminde olur. Halofilik enzimler oldukça polar yüzeye sahip olduklarından yüksek oranda asidik amino asitler içermektedirler (Sağır, 2014).

Tuzlalar, ekstrem halofilik prokaryotlar için önemli habitatlardır. Tuzlalar deniz suyuyla doldurulmuş küçük havuzlar olup, ticari değeri olan diğer tuzları ve NaCl'ü ihtiva eder (Uçar ve ark., 2007).

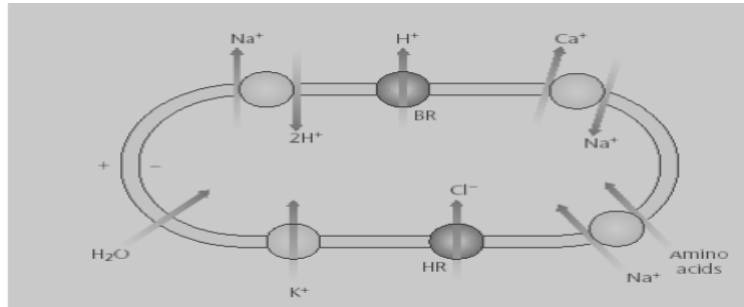
Böyle habitatlar ekstrem halofiller için minimum tuzluluk limitine yaklaştığında suyun rengi halofilik Archaea'nın yoğun ürünlerinden dolayı kırmızımtırak mor renge döner (Uçar ve ark., 2007). Tuz göllerinin de kırmızı renginin nedeni haloarchaea'nın kırmızı karotenoid pigmenti nedeniyledir (bacterioruberins). Bu deniz suyunun buharlaşarak tuz oluşturduğu, güneş nedeniyle tuzların kristalleştiği göletlerde de belirgin olarak görülmektedir. Tuz doygunluğuna yakın olan aralıklarda (~ 35% w/v), bu organizmalar yüksek yoğunluklarda büyüme gösterirler (~ 10⁸ hücre/ml) ancak büyüme oranları düşüktür (bölünme hızları iki günden fazladır) (Pedros-Alio ve ark., 2000).

Utah (USA)'daki Büyük Tuz Gölü (Great Salt Lake) esasen konsantre deniz suyudur. Çünkü çeşitli iyonların kısmi oranları deniz suyundakine benzer, fakat bunun yanında iyonların tüm konsantrasyonları daha yüksektir. Büyük Tuz Gölü'nde en bol bulunan katyon, sodyum ve anyon ise klordur; sülfat önemli miktarda hafif alkali pH'daki ortamlarda bulunmaktadır. Aksine, diğer çok tuzlu havza olan Ölü Deniz (Dead Sea) kısmi olarak sodyumun düşük, fakat magnezyumun yüksek düzeylerini içerir, çünkü bu çevrelerdeki kayalarda Mg minerali oldukça boldur. Soda göllerinin su kimyası Büyük Tuz Gölü'ndekine benzer, fakat çevredeki kayalarda bulunan karbonat mineralinin yüksek seviyede bulunmasından dolayı soda göllerinin pH'ı oldukça yüksek olup, 10-12'lik pH değerleri bu çevrelerde nadir değildir (Uçar ve ark., 2007).

Biyolojik tuza dayanıklılığın model organizmaları ekstrem halofil mikroorganizmalardır. Ayrıca değişik sıcaklıklarda ve tuz konsantrasyonlarında optimum aktivite gösteren amilaz, esteraz, pullulanaz, selülaz, ksilanaz, proteaz, lipaz ve DNAaz gibi birçok hidrolitik enzimlerin kaynakları olabilirler. Halofil arkeaların ekstremozimleri tuza son derece dayanıklı olmalarının yanı sıra uzun süreli yüksek sıcaklıklara karşı da dayanıklılık gösterebilirler (Obayashi ve ark., 1988).

Bu özellikleri nedeni ile halofiller birçok uygulama için oldukça ilgi çekici hale gelmektedir. Bununla beraber halofil arkealara ait ticari değere sahip ekstremozim örnekleri vardır. Halococcus genusuna ait bir türden elde edilen restriksiyon enzimine ait üretim patenti mevcuttur (Obayashi ve ark., 1988). Halofilik mikroorganizmalar diğer ekstremofilik mikroorganizmalarla karşılaştırıldıklarında basit besiyerlerinde kolay üretilibilmelerinden dolayı biyoteknolojik olarak büyük bir potansiyele sahiptirler (Horiskoshi ve Grant, 1998).

Halofilik mikroorganizmalar genel olarak çubuk ve kok şekillerine sahiptirler. Birçok ekstrem halofilik mikroorganizma hücre bütünlüğünü sadece NaCl veya KCl varlığında sürdürürler. Tuz konsantrasyonu düştüğünde hücre morfolojilerini düz çubuk şeklinden, küre haline dönüştürürler. Genellikle tuz konsantrasyonu 1 M civarında olduğunda lizis'e uğrarlar (Coşkun, 2010).



Şekil 1.2. İyonların ve Diğer Moleküllerin Halofilik Bakterilerde Membran Boyunca Geçiş Hareketleri (Coşkun, 2010).

1.1.1. Ekstrem Halofilik Archaea Taksonomisi

Yüksek miktarda tuz içeren habitatlardaki organotrofik mikroorganizmaların çoğu Archaea'dır. Halobacteriaceae familyasına ait cins ve türlerin teşhisi ve sınıflandırılması; hücre morfolojisi, üreme özellikleri, spesifik polar lipidlerin analizine dayanan kemotaksonomik çalışmalar ve nükleik asit dizi verileri gibi özellikleri kapsayan polifazik bir yaklaşıma göre yapılmaktadır (Özcan, 2004).

Halofilik arkelerin taksonomik sıralaması şu şekildedir;

Domain : Archaea

Filum II: Euryarchaeota

Sınıf III: Halobacteria

Ordo I: Halobacteriales

Familya I: Halobacteriaceae

Halobacteriaceae familyası üyeleri ekstrem halofilik arkebakteriler olarak kabul edilirler. Bu familya içerisinde; *Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halomicrobium*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halosimplex*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Halovivax*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronolimnobius*, *Natronomonas*, *Natronorubrum* cinsleri bulunur (Bayramoğlu, 2012).

Halofilik Archaea'da hücre çeperi peptidoglikan içermez, eter bağlı lipidler ve Archaea RNA polimerazları içerir. Tüm halofilik Archaea gram-negatiftir (Uçar ve ark., 2007). Ancak Gram pozitif bakteriler içerisinde de ılımlı halofiller bulunabilmektedir (Bayramoğlu, 2012).

İkiye bölünerek çoğalırlar, spor veya dinlenme safhası oluşturmazlar. Çoğu hareketsizdir, fakat birkaç soy lofotrik kamçı ile hareket eder. *Halobacterium* ve *Halococcus*'un genomik organizasyonu son derece ilginçtir. Total hücresel DNA'nın %25-30'undan fazlasını içeren büyük plazmidler mevcuttur. Bu plazmidlerin GC baz oranı (%57-60), kromozomların GC baz oranından (%66-68) oldukça farklıdır. Ekstrem halofillerdeki plazmidler, doğal olarak meydana gelen en büyük plazmidler arasındadır (Uçar ve ark., 2007).

Çizelge 1.3. Halobacteriales ordosuna ait cinsler ve türler (Bayramoğlu, 2012)

FAMİLYA	CİNS	TÜR	
<i>Halobacteriaceae</i>	<i>Halobacterium</i> ^T	<i>Halobacterium salinarum</i> ^T	
		<i>Haloarcula</i>	
	<i>Halobaculum</i>	<i>Haloarcula vallismortis</i> ^T	
		<i>Haloarcula marismortui</i>	
		<i>Haloarcula hispanica</i>	
		<i>Haloarcula japonica</i>	
		<i>Haloarcula argentinensis</i>	
		<i>Haloarcula quadrata</i>	
		<i>Haloarcula californiae</i>	
		<i>Haloarcula sinaiensis</i>	
		<i>Haloarcula aidinensis</i>	
		<i>Halobaculum gomorrhense</i> ^T	
		<i>Halococcus</i>	<i>Halococcus morrhuae</i> ^T
			<i>Halococcus saccharolyticus</i>
		<i>Haloferax</i>	<i>Halococcus salifodinae</i>
			<i>Halococcus dombrowskii</i>
			<i>Haloferax volcanii</i> ^T
	<i>Haloferax denitrificans</i>		
	<i>Haloferax gibbonsii</i>		
	<i>Haloferax mediterranei</i>		
	<i>Haloferax alicantei</i>		
	<i>Haloferax lucentensis</i>		
	<i>Haloferax alexandrinus</i>		
	<i>Haloferax borinquense</i> ^T		
	<i>Halogeometricum</i>	<i>Halorubrum saccharovororum</i> ^T	
		<i>Halorubrum coriense</i>	
		<i>Halorubrum distributum</i>	
		<i>Halorubrum lacusprofundi</i>	
		<i>Halorubrum sodomonse</i>	
		<i>Halorubrum trapanicum</i>	
		<i>Halorubrum vacuolatum</i>	
		<i>Halorubrum tebenquichense</i>	
<i>Halorubrum terrestre</i>			
<i>Haloterrigena</i>			
<i>Natrialba</i>	<i>Haloterrigena turkmenica</i> ^T		
	<i>Haloterrigena thermotolerans</i>		
	<i>Natrialba asiatica</i> ^T		
	<i>Natrialba magadii</i>		
	<i>Natrialba taiwanensis</i>		
<i>Halosimplex</i>	<i>Natrialba aegyptiaca</i>		
	<i>Halosimplex carlbadanse</i> ^T		
	<i>Halomicrobium mukohataei</i> ^T		
	<i>Halorhabdus utahensis</i> ^T		
	<i>Halobioforma haloterrestri</i> ^T		
	<i>Natrinema</i>		
	<i>Natrinema pellirubrum</i> ^T		
	<i>Natrinema pallidum</i>		
	<i>Natronobacterium gregoryi</i> ^T		
	<i>Natronococcus</i>		
<i>Natronococcus amylolyticus</i>			
<i>Natronomonas</i>	<i>Natronomonas pharaonis</i> ^T		
	<i>Natronorubrum bangense</i> ^T		
	<i>Natronorubrum tibetense</i>		

Tüm bu özellikleri belirtilmiş olan halofillerin elektron mikroskobu ile incelenmesinin nedeni ise hücresel yapılarının daha iyi anlaşılıp, detaylı inceleme yapılabilmesidir. Bu durumda elektron mikroskobu ile ilgili genel bilgiler vermek yerinde olacaktır.

1.2. Elektron Mikroskopları

İnsan gözünün çok ince ayrıntıları görebilme olanağı sınırlıdır. Bu nedenle görüntü iletimini sağlayan ışık yollarının merceklerle değiştirilerek, daha küçük ayrıntıların görülebilmesine olanak sağlayan optik cihazlar geliştirilmiştir. Ancak bu cihazlar, gerek büyütme miktarlarının sınırlı oluşu gerekse elde edilen görüntü üzerinde işlem yapma imkânının olmayışı nedeniyle araştırmacıları bu temel üzerinde yeni sistemler geliştirmeye itmiştir. Elektronik ve optik sistemlerin birlikte kullanımı ile yüksek büyütmelerde üzerinde işlem ve analizler yapılabilen görüntülerin elde edildiği cihazlar geliştirilmiştir (http://www.selcuk.edu.tr/ileri_arge/yonetim/web/sayfa/ayrinti/5874/tr).

Elektron mikroskobu (EM) görüntü oluşturmak için ışıktan daha çok elektronları kullanan bir mikroskoptur. EM'nun ışık mikroskobuyla (IM) karşılaştırıldığında birçok avantajının olduğu görülür. EM'da IM'nun aksine aydınlatma kaynağı olarak ışık yerine vakum içinde hızlandırılmış elektron demeti kullanılır (Kapakin, 2007).

1931 yılında Alman mühendisler Ernst Ruska ve Maximillion Knoll, elektron görüntülemesi ve büyütmesinde başarılı olmuşlardır ve bu bir bakıma elektron mikroskobunun icadı olmuştur. Ancak ilk prototip, 1933 yılında Ruska tarafından geliştirilmiştir ve 50nm çözümleme kapasitesine sahiptir. İlk ticari elektron mikroskobu Londra'da geliştirilmiş olup EM1 adı verilmiştir (https://www.jic.ac.uk/microscopy/intro_EM.html).

Elektron mikroskobu genel olarak cisimden saçılan elektronların görüntülenmesi üzerine kuruludur. Maddeyle etkileşen elektronların dalga boyu bu görüntülemenin nanometre boyutlarında yapılmasına olanak sağlar.

IM'da genellikle boyanmış preparatlar ışığın, örneğin içinden geçmesi yolu ile incelenerek, tıp ve mühendislik gibi birçok alanda kullanılır. Ancak atom gibi çok küçük cisimcikleri görmemiz için gerekli olan yüksek büyütmeleri veremezler. EM yüksek büyütme yapar. Büyük bir alan derinliğine sahiptir, yani yüksek rezolüsyonlu görüntüler oluşturur (Kapakin, 2007).

Görüntünün kalitesi, netliği ve detay zenginliği rezolüsyona bağlıdır ki IM'nun rezolüsyon gücü 0,5-1 mikron iken EM'da bu oran 2-20 angstromdur (Kapakin, 2007). Elektron mikroskoplarını genel olarak 2'ye ayırmak mümkündür.

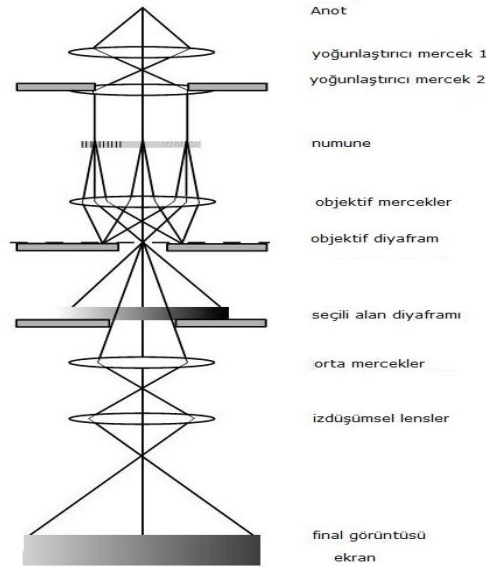
1. TEM (Transmisyon/ Geçirimli Elektron Mikroskobu)
2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)

1.2.1. Transmisyon/ Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

TEM; biyoloji (botanik, hücre biyolojisi), tıp (adli tıp, anatomi, mikrobiyoloji, biyokimya, fizyoloji, toksikoloji, patoloji), madde bilimleri ve yer yüzü bilimlerinden elde edilen örnekleri 600.000 kez büyütür iç yapılarını görüntüler. İncelenecek örneklerin ultramikrotomla 60 nm kalınlığında ince kesitleri alınır. Bunlardan dokunun ultrastrüktürel düzeyde incelenmesi yapılır. Hücre organelleri, yapı taşları, mikroorganizmalar, hücre zarı ve hücrenin çekirdeğine bakılır. İki boyutlu bir görüntüyü fosfofluoresan ekran üzerinde oluşturmak için, elektronları örneğin çok ince kesiti içinden geçirir. Görüntünün özel bir alanının parlaklığı örneğin içinden geçen elektronların sayısıyla orantılıdır. (Kapakin, 2007).

TEM, atom seviyesinde görüntü elde edebilen hassas bir yöntem ve cihazdır. Bu yöntemin SEM'den farkı (her iki yöntemde de elektron demeti kullanılır) TEM'de elektron demetinin numune malzemesinin içinden geçerek yol almasıdır. Malzemenin içinden geçen elektronlar bir ekranda izlenerek malzemenin yapısı ile ilgili görüntü oluştururlar. Bu yöntemde kullanılan elektron demetindeki elektronların enerjisi 100-500 kV civarındadır. Yüksek enerjili elektron demeti, birtakım mercekle sistemlerinden geçtikten sonra numune üzerine odaklanır, malzemenin içinden geçtikten sonra yine birtakım mercekle sistemlerinden geçer ve ekrana yansıtılır. TEM ile görüntü alabilmek için malzemenin ince olması gerekir, çünkü elektronlar içinden geçip gidecektir. Malzeme kalınlığı birkaç yüz nanometreyi geçmemelidir. (Yalçınkaya, 2010).

Geçirimli elektron mikroskobunda yapılan analizin güvenilirliği numune hazırlama süreciyle yakından ilgilidir. Ancak dikkatli ve titiz bir çalışma gerektiren numune hazırlama süreciyle TEM’de istenilen sonuçlara ulaşmak mümkündür. Numune hazırlamaya başlamadan önce malzemenin özellikleri ve kristallografik yapısı hakkında bilgi edinilmeli, TEM ile çözülmesi istenen sorunlar ortaya konulmalı ve bu sorunların çözümü için hangi TEM tekniklerinin kullanılması gerektiği belirlenmelidir (Karakulak, 2010).



Şekil 1.3. TEM’in çalışma prensibi (<http://www.acikbilim.com/2014/02/dosyalar/daha-yakin-olmak-icin-elektron-mikroskoplari-2.html>)

1.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM’de görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir (<http://fen.istanbul.edu.tr/?p=7237>). Yani taramalı elektron mikroskobunda görüntü, bir elektron demeti tarafından yüzeyin taranması ile oluşturulur.

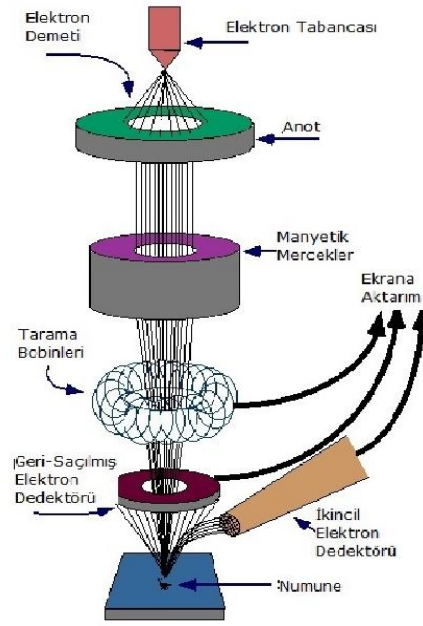
SEM üç boyutlu hayali bir görüntü oluşturur. Her geçen gün geliştirilen özellikleri ile SEM, IM'undan 300 defa daha fokus derinliğine ve 20 ile 100.000 arasında net görme oranına sahiptir (Kapakin, 2007). SEM'de elektron demeti incelenecek bölge üzerinde tarama yapacak şekilde gezdirilir. Bir elektron demeti bir malzemeye çarptığı zaman bir takım elektronlar ve ışınlar (radyasyon) yayar. Elektron-malzeme çarpışması sonucu yayılan ışınların ve elektronların kaynakları ve işlevleri aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Yalçınkaya, 2010).

Katot ışınması: Malzeme atomlarının değerlik (dış kabuk) elektronlarının geçişleri sonucunda oluşan ışınlardır, malzeme atomlarının elektronik yapısı hakkında bilgi verir.

Birincil geri saçılan elektronlar: Elektron demetine ait elektronlardır, malzeme atomları ve yüzey yapısı hakkında bilgi verir.

İkincil elektronlar: Malzeme atomlarından gelen elektronlardır, malzeme yüzeyi hakkında bilgi verir.

Elektron demetindeki elektronların enerjisi 1–40 kV civarında değişebilir. Elektron demeti ile incelenecek malzeme vakumlu ortamda bulunmalıdır. Elektron kaynağından çıkan elektron demeti birtakım manyetik merceklere geçtikten sonra odaklanmış olarak malzeme üzerine gönderilir. Gelen elektronlar ile malzeme arasında esnek olmayan çarpışma sonucu malzemedeki birtakım elektronlar çıkar. Bu tür malzemedeki elektronlara ikincil elektronlar denir. İkincil elektronlar algılayıcılarla (dedektör) tespit edilir. Algılayıcıya gelen elektronların oluşturduğu sinyal görüntüye dönüştürülür. Böylece incelenen malzemenin yüzeyi hakkında bilgi edinilir (Yalçınkaya, 2010). Şekil 1.4'te SEM'in çalışma prensibi verilmiştir.



Şekil 1.4. SEM çalışma prensibi (<http://www.acikbilim.com/2014/02/dosyalar/daha-yakin-olmak-icin-elektron-mikroskoplari-2.html>)

Teoride yüksek gerilim, küçük açıklıklar, küçük nokta boyutları ve küçük çalışma mesafeleri daha iyi çözünürlükle eş değerdedir. Ancak pratikte, optimal ayarlar uygulamaya bağlı olarak değişme gösterebilmektedir. Abbe Kanunu, çözünürlüğün görüntüleme için kullanılan dalga boyuyla orantılı olduğunu belirtmektedir. Elektronlar, voltaj arttıkça daha kısa dalga boyuna sahip olurlar ve bu da daha iyi çözünürlüğe karşılık gelir. Ancak, özellikle biyolojik örneklerin içine daha yüksek enerji ile geçebilir ve ışınlar daha derine nüfuz edebilirler. Bu da çözünürlüğü düşürecektir. Elektronlar fotonlara kıyasla daha kısa dalga boylarında seyahat edebilir, bu da elektron mikroskobuna ışık mikroskobuna oranla daha iyi bir çözünürlük sağlar (Fischer ve ark., 2012).

1.3. Konu ile İlgili Önceki Çalışmalar

Kansas Tuz Bataklığı'ndan orta dereceli halofilik bakterinin karakterizasyonunda iki bakteri türü Kansas'taki bir tuz bataklığından izole edilmiştir. Bataklıktaki su örnekleri izolasyon için %12 NaCl takviyeli triptik soy agar üzerine ekilmiştir (Johnson ve ark., 2007).

Plakaların görsel taramaları sonucu iki önemli koloni türü ortaya çıkmıştır. Bu iki koloni tipi hastalık bulaştırıcı olmayan kültürler elde edilene dek tekrar tekrar pasajlanmıştır. Bu iki organizmanın da orta dereceli halofil olduğu gösterilmiştir. Bu organizmalar yağlı asit metil ester analizi, 16S rRNA dizilimi, taramalı elektron mikroskobu yöntemleriyle kısmen karakterize edilmiştir. Bu çalışma göstermiştir ki bu bakteriler *Marinococcus* ve *Halomonas* cinslerinin önceden bildirilmemiş üyeleridir (Johnson ve ark., 2007).

Bakterilerde klasik elektron mikroskobu tekniği adlı çalışma ise şu şekildedir: TEM’de olduğu gibi SEM’de de pek çok farklı teknik mevcuttur. Klasik SEM fikse edilmiş, suyu uzaklaştırılmış ve kurutulmuş bakterileri görselleştirmek amacıyla kullanılır. Hızlıca dondurulmuş bakteriler oldukça düşük sıcaklıklarda (-120 °C altında) cryo-SEM ile görüntülenebilir. Her iki teknikte de örnek yüksek bir vakum odasına yerleştirilir. Burada örnek herhangi bir uçucu madde ile birlikte olmamalıdır. Çok düşük sıcaklıklarda dondurma ya da kurutma bunları gerektirmektedir. Çevresel/Environmental SEM (ESEM) örnekleri yüksek vakuma maruz bırakmadan sulu örnekleri de incelemeye olanak sağlar (Kalab ve ark., 2008).

Gelişmiş bir teknik tasarım numuneleri mikroskobun içinde küçük bir alanda, suyun donma derecesinden birkaç derece yüksekte tutar. Düşük bir su buharı kısmi basıncı elektronları nötralize etmeye yarayacak konsantrasyonda iyonlar içerir, böylece şarj olma sırasındaki artifaktları önler. Cryo-SEM ve ESEM klasik SEM’den farklı olarak kendilerine has özelliklere sahiptirler. Her elektron mikroskobu modlarının avantaj ve dezavantajları vardır. Klasik SEM nispeten basit ve hızlı bir tekniktir ve görüntüleri yorumlamak kolaydır ancak TEM’deki gibi yüksek çözünürlüklü görüntüler vermez. Prensip SEM için örnek hazırlama bakterilerin izole edilmesi ya da numune kesimini içermektedir. Örnekler fikse edilir, etanol ile suyu uzaklaştırılır, kritik nokta kurutması yapılır, bir SEM taslağına monte edilir, altınla kaplanır ve uygun bir hızlanan gerilimde görüntü kaydı yapılır (Kalab ve ark., 2008).

Bakteri, DNA ve proteinler gibi biyolojik örnekler yüksek miktarda su ihtiva ederler ve düşük iletkenliğe sahiptirler. Bu örnekler normal durumlarında SEM ile doğrudan incelenemezler çünkü elektron mikroskobunun kullanımında gerekli olan yüksek vakum, yüzeyde ve yüzeyin altında bulunan suyun buharlaşmasına neden olur. Bunun neticesinde de örnek çöker ya da kendini imha eder. Buna ek, örnek haznesinde bulunan su buharı vakumu azaltır ve dedektör ve kolonların kirlenmesine neden olur. Biyolojik örneklerin düşük iletkenliği de ayrıca elektron ışınına ve örnekten ikincil elektron emisyonuna engel olacak bir elektrik şarjına neden olur. Bu yüzden, biyolojik örnekler fikse edilmeli, kurutulmalı, kritik nokta kurutması yapılmalı ve geleneksel bir yüksek vakumlu SEM için kaplanmalıdır (Piroeva ve ark., 2013).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

- Etanol
- Distile Su
- Tris Base
- Tris Klorür
- NaCl
- Na₂SO₄
- NaHCO₃
- H₃BO₃
- MgCl₂
- MgSO₄
- MgCl₂.6H₂O
- MgSO₄.7H₂O
- KCl
- H₃BO₃
- KBr
- CaCl₂
- SrCl₂
- NaF
- NaSiO₃
- FePO₄
- FeSO₄
- CAC
- PB
- OsO₄
- Gluteraldehit (GA)

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj : Eppendorf Centrifuge 5415 R
- Su Banyosu: Julabo TW 20
- İnkübatör : Nüve inkübatör EN120
- Çalkamalı Etüv : Innova 44
- SEM (Zeiss Ultra Plus)
- Kaplama Cihazı
- Critical Point Dryer

2.1.3. Kullanılan Besiyeri ve Tamponlar

Konsantre Yapay Deniz Suyu (%3.6 tuz): %3.6'lık tuz konsantrasyonu için aşağıda belirtilen içerik kullanılmaktadır (Dyall-Smith, 2009).

Çizelge 2.1.Yapay deniz suyu konsantrasyon içeriği (Dyall-Smith, 2009)

TUZ	Litredeki Gramı	Litredeki Gramı
	Pelczar, M.J., Jr., 1957	Zobell, C.E., 1946
NaCl	27.5	24.32
MgCl ₂	5.0	5.14
MgSO ₄	2.0	
Na ₂ SO ₄		4.06
NaHCO ₃		0.20
H ₃ BO ₃		0.027
KBr		0.10
KCl	1.0	0.69
CaCl ₂	0.5	1.14
SrCl ₂		0.026
NaF		0.003
NaSiO ₃		0.002
FePO ₄		0.001
FeSO ₄	0.001	

Konsantre Tuzlu Su Stok Solüsyonu %30 (w/v): Bu formülasyon *Rodriguez-Valera* ve arkadaşları ve *Torreblanca* ve arkadaşlarının çalışmalarına dayanır ve deniz suyuyla neredeyse aynı denilecek oranda tuz içerir ancak toplam tuz konsantrasyonu daha yüksek miktardadır. Pek çok halobacteria %25'lik tuzlu su ve %0.5'lik maya ekstraktında büyümektedir (Dyall-Smith, 2009).

Çizelge 2.2. Konsantre tuzlu su stok solüsyonu içeriği (Dyall-Smith, 2009)

TUZ	1 Litredeki Gramı	5 Litredeki Gramı	10 Litredeki Gramı
NaCl	240	1200	2400
MgCl ₂ .6H ₂ O	30	150	300
MgSO ₄ .7H ₂ O	35	175	350
KCl	7	35	70
1M Tris.Cl, pH 7.5	5ml	15ml	50ml
*NaBr	0.8	4.0	8
*NaHCO ₃	0.2	1.0	2

Hazırlık aşamaları şu şekildedir;

1. Büyük bir behere Çizelge 2.2'de belirtilen tuzlar eklenir.
2. Yeterli hacmi tamamlayacak kadar saf su eklenir ve cam bir çubuk ya da manyetik karıştırıcı yardımıyla tuz tamamen çözünür.
3. 1M'lık steril stok solüsyonundan yavaşça CaCl₂.2H₂O eklenir.

(sonuç konsantrasyonu = 0.5 g/L); 5 ml (**1L için**) 25 ml (**5L için**) 50 ml (**10L için**)

1 M'lık CaCl₂.2H₂O solüsyonu; 147g/L (= %11 w/v'lık CaCl₂)

4. Eğer gerekliyse pH, 1M'lık Tris bazı için minimum 7.5 olacak şekilde ayarlanır (Bazı durumlarda pH birkaç haftalık depolama ya da otoklav sonrası düşebilir).
5. Daha büyük, dereceli bir silindire transfer edilir ve sonrasında istenen hacme kadar su ile doldurulur.
6. Otoklavlanabilen, kullanışlı cam birimlere dağıtılır (Örneğin 200ml'lik şişelere 100ml'lik yapay tuzlu su).

7. Minimum 15 dakika 101kPa (15lb)' da otoklava tabii tutulur. Oda sıcaklığında saklanır.
- Otoklavlama sonrası çökme olmamalıdır, olması durumunda otoklav sonrası çözelti oda sıcaklığına eriştiğinde CaCl₂ eklenmesi denenebilir.
 - Ya da alternatif olarak tüm solüsyon büyük bir şişe içinde 4°C'de, 6 ay sterilizasyon olmadan muhafaza edilebilir (üstü plastik film ile kaplı şekilde) (Dyall-Smith, 2009).

Haloarchea İçin Modifiye Büyüme Ortamı (MGM): Haloferax türleri için bu ortamın, orijinal %0.5'lik maya ekstraktı yöntemine göre daha hızlı büyüme sağladığı gözlemlenmiştir. Pepton markası konusunda dikkatli olmak gerekir, hepsi aynı değildir. Bunlar safra tuzları içerebilir, ki bunlar da halobacteriayı lize eder (Difco Bacto-Peptide) (Dyall-Smith, 2009).

Genelde halobacteria için %23 tuzlu su içeren MGM kullanılmaktadır. Ancak *Haloferax* spp. %18'lik MGM'de daha hızlı büyümektedir. *Halobacterium* spp. de %25'lik MGM'de hızlı büyür. *Haloarcula hispanica* %23'ü tercih eder ve en düşük %20'de büyür. Ortamdaki tuz konsantrasyonu sadece sodyum klorürden ibaret değildir. Çizelge 2.3'te MGM için gerekli içerik belirtilmektedir (Dyall-Smith, 2009).

Çizelge 2.3. Farklı yüzdelerdeki MGM ortamları için gerekli olan malzemeler (Dyall-Smith, 2009)

	%12 MGM	%18 MGM	%23 MGM	%25 MGM
Tuzlu Su (%30'luk stoktan)	400	600	767	833
Saf Su	567	367	200	134
Pepton (Oxoid)	5	5	5	5
Maya Ekstraktı	1	1	1	1

Hazırlık aşamaları şu şekildedir;

1. Büyük bir şişeye Çizelge 2.3'te belirtilen malzemeler eklenir.
2. Çözünmesi için erlen çalkalanır (biraz ısıtma gerekebilir).
pH 1M Tris.Cl ile 7.5' ayarlanır, 7.5 olduğunda litre başına 5ml kullanılır.
Eğer bu başarılı olmazsa, istenen pH'a ulaşıncaya kadar damla damla 1M Tris bazı eklenir.
3. Hacim 1000 ml olana dek saf su eklenir.
Katı besiyeri için; plakalara 15g Difco Bacto-agar eklenir, üst katman agarı için 7 gr eklenir (virüs yayılması veya transformasyon için). Agarın otoklavlama öncesi iyice çözülmüş olması gerekmektedir (100°C' de 10-20 dk). Ancak bu büyük hacimler için zor olabilir. Min. 30 dk'lık bir otoklavlama bu problemin üstesinden gelmektedir.
4. 30dk, 101 kPa'da sterilize edilir (Büyük, geniş ağızlı 2-3L'lik şişelerde), 55-60 °C'ye kadar soğutulur ve petri kaplarına dökülür.
5. Otoklav sonrası, dipte çökme eğilimi olduğundan agarın iyice karıştığından emin olunmalıdır. 60°C'lik bir sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonunda agarın çözünmesi için uygun olacaktır. Burada kabarcıklardan kurtulmak normal besi yerindekinden daha zordur.
6. Kullanım öncesi plakalar kurutulur (30-60 dk, 37°C'de kapakları çıkarılmış ve ters şekilde ya da daha uygun olarak 1 gece oda sıcaklığında bençte bekletme). Plakalar 4°C'de ağızları plastik filmle kaplı şekilde muhafaza edilebilir (Dyall-Smith, 2009).

CDM (Chemically Defined Medium)- Haloarchea İçin Minimal Ortam:

Hazırlık aşamaları şu şekildedir;

1. %18'lik tuzlu su hazırlanır (*Haloferax volcanii* için ya da diğer haloarchea için optimum yüzdeli tuzlu suyu hazırlayın).

NaCl – 125 gr

MgCl₂. 6H₂O – 50gr

K₂SO₄ – 5 gr

CaCl₂. 2H₂O – 0.26gr

2. 1000 ml'ye kadar saf su eklenir. Katı ortam için 15gr. Difco Bacto-Agar eklenir. pH kontrol edilir ve eğer gerekliyse pH'ı 7.5 yapmak için 1M Tris.Cl eklenir (bu da yaklaşık 1-5 ml kadardır).
3. Büyük, geniş ağızlı 2-3L'lik şişelerde, 30dk 101 kPa'da otoklavlanır.
4. 55-60°C'ye soğuduğunda şunlar eklenir;

1 litre (1000 ml) için;

1M NH₄Cl – 5ml

Karbon Kaynağı – Karbon kaynağı olarak glukoz, gliserol ya da galaktoz kullanıldığında 5ml/L 1M NaHCO₃ eklenir.

K₂HPO₄ – 2ml^a (a ile belirtilen; 2.5, 2.4 ya da 2.7. 2; 0.5M, pH 7.5)

İz Element – 1ml

1mg/ml tiamin – 0.8 ml

1mg/ml biotin – 0.1 ml

5. pH tekrar kontrol edilir, pH 7.5 olmalıdır. Eğer değilse 1M Tris bazı kullanılır.
6. Plakalar kurutulur ve depolanır.

a. Agar hacmi; ince bir agar plakası *Hfx. volcanii* için daha iyi bir büyüme sağlamıştır.

b. Plakaları kurutma;

- ✓ Plakaları bençte, bir gece boyunca oda sıcaklığında bekleterek,
- ✓ 30-40dk. , 37°C'de ters şekilde, kapakları çıkarılmış olarak inkübe ederek,
- ✓ 20-30dk. , 60°C'de ters şekilde, kapakları çıkarılmış olarak inkübe ederek (burada zaman çok önemlidir, yoksa çok fazla kururlar)

Olmak üzere 3 şekilde yapılabilir.

7. Agar konsantrasyonu seçimi; marka ve tipe göre belirlenir. Farklı tipler farklı jelleşme gücüne sahiptir. Ayrıca amaca göre de değişiklik göstermektedir, örneğin plakaları sadece üst agar tabaka desteği için kullanıyorsanız 15g/L yeterli olacaktır. Ancak eğer kopya plaklama yapıyorsanız, sert bir jel (20g/L) daha az bozulmuş ya da ezilmiş olabilir. Genel olarak çalışmalarda Difco Bacto-Agar tercih edilmektedir ancak Oxoid Bacteriological Agar da kullanılmaktadır (Dyall-Smith, 2009).

%30 Salt Water (1L);

NaCl: 240 gr

MgCl₂.6H₂O: 30 gr

MgSO₄.7H₂O: 35 gr

KCl: 7 gr

CaCl₂. 2H₂O(1M): 5 ml

HNaCO₃: 0,2 gr

NaBr: 0,8 gr

1M Tris Base: 2 ml

Distile su ile 1000ml ye tamamlanır (Dyall-Smith, 2009).

%23 MGM (Modified Growth Medium) 1L ;

%30 Salt Water: 767 ml

Distile su: 200 ml

Pepton(Oxoid) : 5 gr

Yeast Ekstract: 1 gr

1M Tris base: 1 ml

pH:7.5

Hacim 1000 ml ya tamamlanana kadar saf su eklenir (Dyall-Smith, 2009).

Katı besiyeri için 1 L ya 17-20 gr Bacteriologic Agar eklenir.

121⁰ C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

%18 MGM (Modified Growth Medium) 1L ;

%30 Salt Water: 600 ml

Distile su: 367 ml

Pepton(Oxoid) : 5 gr

Yeast Ekstract: 1 gr

1M Tris base: 1 ml

pH:7.5

Hacim 1000 ml ya tamamlanana kadar saf su eklenir.

Katı besiyeri için 1 L ya 17-20 gr Bacteriologic Agar eklenir.

121⁰C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir (Dyall-Smith, 2009).

2.1.4. Mikroorganizma Olarak Kullanılan Kùltürler ve Referansları

- *Haloferax mediterranei*, Josefa Anton, İspanya
- *Haloarcula hispanica* ATCC 33960, Michael Dyal-Smith, Avustralya
- *Haloferax volcanii*, Josefa Anton, İspanya
- *Haloarcula argentinensis*
- *Saliseata* (Aharon Oren, İsrail)
- 50418 (DSMZ, Almanya)
- 68B (Sivas İzolatı (Seval ÇINAR'ın çalışmasından))
- 17466 (DSMZ, Almanya)
- HP2 (Sivas İzolatı (Seval ÇINAR'ın çalışmasından))

2.1.5. Kullanılan Su Örnekleri

Su örnekleri Tuz Gölü Cihanbeyli tuzlasından ve Sivas Tuzlagözü kaynak tuzlasından alınmıştır.

2.2. Metod

Temel Protokol 1: SEM İçin İncelenecek Biyolojik Örneklerin Korunması İçin Kimyasal Preparasyon Teknikleri

Bu kısım, tek bir tabaka ya da süspansiyon içinde yetiştirilen prokaryotik ve ekaryotik hücrelerin muhafazasını açıklamaktadır. Genellikle numuneler kuruyana kadar işleme tabi tutulmalıdır. Yiğın, granül ve toz halindeki malzeme bu işlemi gerektirmeyebilir. Biyolojik örnekler protein ve lipid çapraz bağlama maddeleri ile (sırasıyla; glutaraldehit (GA) ve osmiyum tetroksit (OsO₄)) muamele edilmelidir. Sonrasında, organik bir çözücü ile (Etanol (ETOH) ya da aseton gibi) kurutulmalıdır ve karbondioksit aracılığı ile kritik nokta kurutması yapılmalıdır.

Bunun için, uygun boyutlu ve gözenekli, kimyasal toleransı olan örnek kapları kullanılmalıdır. Örnekler, polistiren 24 hücre kuyucuklu doku kültür plakları (aseton veya propilen oksit kullanımı dışında), mikrofuj tüpler, cam şişeler, uygun kapaklı paslanmaz çelik ve politetrafluroetilen (PTFE ya da Teflon) sepetleri içine konulabilir.

Yapışık hücreler, silikon çipler, Aclar, membran filtreleri, Thermanox ya da cam lameller üzerinde büyüyebilirler. Son yıllarda silikon çipler SEM görüntülemesinde numunelerin yüzeye montajında popüler bir yüzey haline gelmiştir. Bazı hücre tipleri belirli bir yüzeyi tercih etmektedir.

Elektron mikroskobu için numune hazırlama örneklerin yapısal değişimini gerektirmektedir, bu da çeşitli madde ve yapı kaybına neden olabilir. Bu da optimize hazırlama teknikleri ile azaltılabilir. (Fischer ve ark., 2012).

Malzemeler

Süspansiyon içinde ya da katı bir yüzey üzerinde yetiştirilen ökaryotlar için: Thermanox, silikon çipler, Aclar film ya da transwell membran filtresi. Aclar genelde yaprak/levha halinde edinildiğinden, istenilen boyuta kesilir ya da üzerine delik açılır.

- Birincil Fiksatif: Genelde 0.1M'lık sodyum kakodilat (CAC) ya da fosfat tamponu için, %2.5'lik GA ya da %4'lük paraformaldehit (PFA), pH 6.8-7.4
- Fiziksel olarak uygun tampon: Örneğin Hank'in Tuzlu Tampon Solusyonu (HBSS)
- Durulama Solusyonu: 0.1 M CAC ya da PB

Tampon seçimi; uygun tampon kapasitesi, pH, tuz ve iyonik güç kriterlerine göre yapılmalıdır.

- İkincil Fiksatif: Genelde, dH₂O içinde %1'lik OsO₄ ya da dH₂O'da potasyum ferrosiyaniür ile indirgenmiş osmiyum (0.5%OsO₄/0.8% K₄Fe(CN)₆) ya da 0.1M CAC.

- Distile su (dH₂O)
- Dehidrasyon maddesi, genellikle etanol (ETOH) ya da aseton
- Yüzey montaj maddesi (silikon çip, lamel ya da membran filtresi gibi)
- İnce uçlu pens
- Makas veya zımba
- İşlem için kap (24 yuvalı plaka, mikrofuj tüpler, PTFE sepeti gibi)
- Parafilm ya da bant
- Tehlikeli atık madde kabı

Aksi belirtilmedikçe tüm işlemler oda sıcaklığında yapılmalıdır (Fischer ve ark., 2012).

Yapışkan/Yapışkan Olmayan Hücrelerin Fiksasyonu

1. Deney için gerekli sayıda silikon çip, transwell membran ya da lamel. İki taraftaki Trim lamelleri, eğer uygunsa, sonrasında kritik nokta kurutması için kaplara yerleştirilebilir (Şekil 2.1'deki gibi).



Şekil 2.1. Thermanox veya Aclar malzemeler kolayca kesilebilir ya da bir makas veya delgeç aracılığı ile istenilen boyutlara getirilebilir (Fischer ve ark., 2012)

Thermanox lameller genelde steril halde gelir ve hücre kültürü bir yüzeyinde işleminden geçirilir. Bu yapışkan olmayan hücreleri çözmek için bir etken olmasa da, kullanıcının yapışkan hücreler için doğru tarafı belirleyebilmesinde önemli olabilir (Fischer ve ark., 2012).

2a. Yapışkan Hücreler: Steril bir lamel, silikon çip (parlak taraf yukarıda olacak şekilde) ya da membran filtresi üzerine yerleştirilir (Bknz Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Önceden hazırlanmış silikon diskin çıkarılması, sonrasında süspansiyon içerisindeki numunenin işlem görmesi işlemi (Fischer ve ark., 2012).

Etiketli plakanın üzeri kaplanır ve örneğin belirlenmesi için su/etanol geçirmez bir kalemle işaretlenir.

2b. Yapışkan Olmayan Hücreler: Hücrelerin deney için yıkanması ve yavaş bir santrifüjden sonra ($> \sim 500,000$), örnekler mikrofuj tüplerde uygun bir fizyolojik tampon ile (PBS ya da HBSS gibi) hücre başına 1000-2000 g ve yaklaşık 5-10 dakika kadar işleme tabii tutulur. Süpernatantı kaldırılır ve nazikçe tekrar 50 μ l içinde süspansiyon haline getirilir.

3. Sabitlemek için, ortamdaki sıvının çoğu (ancak tamamı değil) uzaklaştırılır. Sıvının bir kısmının uzaklaştırılması örneğin kurumaması ve buna bağlı olarak yapısının bozulmaması açısından önemlidir. Kısa süreyle PBS ya da HBSS gibi bir tamponla yıkanır.

4. Bir çeker ocakta, hızlı ve nazikçe yaklaşık 0.5 ml birincil fiksatif (genellikle 0.1 M CAC ya da PBS içinde %2.5'lik GA) eklenir. Çipin/lamelin kaymasını engellemek için dikkatli olunmalı ve numunenin tamamen daldırılmış olduğundan emin olunmalıdır. Transwell membran filtresini kullanırken, kuyucukların içi doldurulmalı ve aynı çözeltiler kullanılmalıdır.

5. Numune GA içinde, oda sıcaklığında, 30-60 dakika bırakılır. Örnekler eğer gerekliyse bir gece 4°C'de saklanabilir. Çeker ocaktan çıkarılması durumunda, parafilm ile kaplanır ya da kullanıcının tehlikeli gazlara maruz kalmasını engellemek adına bantlanır.

6. Durulama tamponu ile 3x2 kez yıkanır, numunenin kurumamasına dikkat edilmelidir.

7. Distile suda %1'lik OsO₄ ile sabitleme yapılır ya da 0.1M CAC tamponu içinde %0.5'lik OsO₄/%0.8 K₄Fe(CN)₆ ile 30-60 dakika süreyle sabitleme yapılır.

Transwell membran filtreleri, son yıkama için distile su ile yarı doldurulmuş çukurlara yerleştirilir ve sonrasında ETOH ile dehidrasyona tabi tutulur. Böylece yetersiz olan osmiyum çıkarılarak kontaminasyon engellenmiş olur.

8. 1x2 dakika durulama tamponuyla, sonrasında distile su ile 2x2 dakika durulanır.

9. Kademeli etanol serileri ile kurutulur. Distile su içerisindeki seyreltilmeleri şu şekildedir;

- %25 ETOH, 1x5 dakika, hassas örnekler için,
- %50 ETOH, 1x5 dakika,
- %75 ETOH, 1x5 dakika (bu aşamada örnek bir gece 4°C'de saklanabilir)
- %100 susuz ETOH, 3x10 dakika (tek tabakalar için süre daha kısa olabilir).

10. Numunenin kurutma seçenekleri için Temel Protokol 2'ye, kaplama seçenekleri için de Temel Protokol 3'e geçilir (Fischer ve ark., 2012).

Temel Protokol 2: Örneklerin Kritik Nokta Kurutması (CPD)

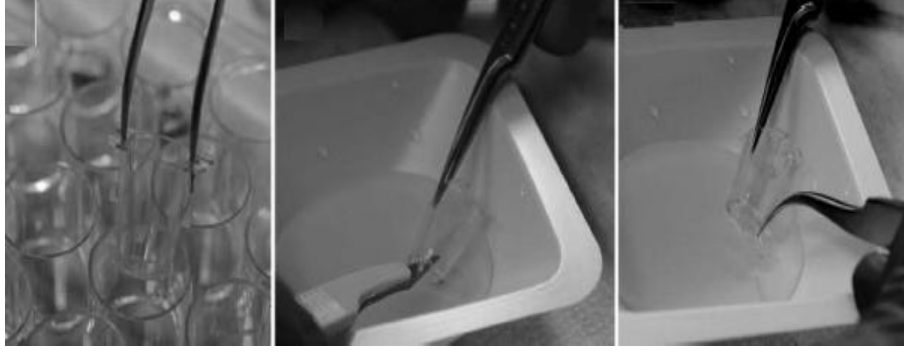
Biyolojik örnekler büyük ölçüde sudan oluşmaktadır. Çevresel SEM ve cryo aşamalarıyla donatılmış mikroskoplar örneklerden su uzaklaştırılmasını gerektirmezken, klasik SEM'de hala bu işleme ihtiyaç duyulmaktadır (Fischer ve ark., 2012).

Eğer sadece havada kurutma yapılırsa, pek çok biyolojik yapı büzülecektir ve çökecektir. Numuneden çıkan su yüzey gerilimini kıracaktır. Kritik nokta kurutması (CPD) ile çözücünün suyunu alma, SEM'e örnek hazırlama aşamalarında biyolojik örneklerden suyun uzaklaştırılması için en çok tercih edilen yöntemdir. Buna ek olarak kimyasal yöntemler de kullanılabilir. Adından da anlaşılacağı gibi örnek, geçiş etkeninin kritik noktasına kadar ısıtılır. Belirli sıcaklık ve basınçlarda, gaz ve sıvı faz birbirinden ayırt edilemez. Bu fazda, etken madde yavaş yavaş gaz olarak serbest bırakılır ve böylece büzülme sonucu oluşan maddeler de minimize edilmiş olur. Su ve ETOH için kritik nokta son derece yüksektir (yaklaşık olarak 374°C ve 217 atmosfer basıncı ile 241°C ve 60 atmosfer basıncı). Ancak CO₂ gibi diğer etken maddeler pek çok örnek için kabul edilebilir aralıktadır (31.1 °C ve 73 atmosfer basıncı) (Fischer ve ark., 2012).

Kritik Nokta Kurutması (CPD)'nin Aşamaları

Ek Malzemeler:

- CO₂ sifon tankı (Sifon tank bir silindir altından sıvıyı çeker, sıvı CO₂ aktarımını yaparak kritik nokta kurutmasının daha verimli olmasını sağlar),
- Kritik nokta kurutucusu,
- Numune kabı,
- Polietilen numune kabı (PE)
 1. Örnek, çözücü dayanıklı bir kap içine yerleştirilir, örneğin PE numune kabı % 100 kuru ETOH ile üzerine kadar doldurulur.
 2. İnce uçlu forsepsler ile hızlıca kaldırarak çip yerleştirilir ya da CPD tutucusunun yuvasına önceden kesilmiş lamel yerleştirilir. Örneğe zarar vermemeye ve kurutmamaya özen gösterilmelidir.
 3. Transwell membran filtreleri, %100 ETOH içeren bir kaba batırılıp çıkarılır (kurumayı önlemek adına) ve dikkatli bir şekilde filtrenin ağız çevresi kesilir. Sonrasında filtre ince uçlu bir cımbızla alınır ve CPD kaplarına yerleştirilir (bknz Şekil 2.3).



Şekil 2.3. 24 hücre doku kültür plakasından membran filtresi çıkarılır, hızlıca transfer edilir ve kesmek için batırılır. Sonrasında membran ince uçlu bir cımbızla, CPD kaplarına yerleştirmek için kaldırılır (Fischer ve ark., 2012)

4. CPD cihazının haznesine numune tutucu yerleştirilir ve %100 ETOH ile doldurulur. Haznelerin yaklaşık 10°C'ye soğutulması gerekmektedir (üretici farklı bir ısı belirtiyorsa buna ayarlanabilir).

O halkasında hasar ya da kalıntı olup olmadığı kontrol edilir, eğer varsa temizlenir ya da gerekliyse değiştirilir. Kapağın düzgün yerleştirildiğinden ve vidalandığından emin olunmalıdır (bknz. Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Örnek kabının kapağını dikkatle kapatılır ve düzgünce vidalandığından emin olunur. Bu bölme yüksek basınca ulaşacağından sıkıca kapatılmış olması gereklidir (Fischer ve ark., 2012)

5. Kap 10°C olduğunda geçiş ajanı (sifon tankından gelen CO₂), üretici tarafından belirtildiği gibi tatbik edilmelidir. Burada asıl amaç, basınç altında ısıyı arttırarak sıvı CO₂ ile ETOH'un yer değiştirmesini sağlamaktır.
6. Bu adımda sabırlı olmak gerekmektedir. Geçiş maddesinin eksik değişimi ya da nemli ETOH kullanımı kurutmada ek maddeler ortaya çıkmasına neden olabilir. Slurry/ Schlieren çizgileri geçiş maddesi ile sıvı CO₂ karışırken görünür olacaktır. Komple değişim tamamlandığında daha da belirgin olacaktır. ETOH tamamen tahliye edildiğinde, yoğunluğu azalan CO₂, serbest kalacak ve küçük kuru buz topakları halini alacaktır. Bu noktada birkaç ek değişim yapılması gerekebilir. Daha büyük örnekler, örneğin dokular, ek ve genişletilmiş değişimler gerektirebilir. Bu örnekler için CO₂'nin son değişiminden önce ilave bir 15 dakika daha yayılmasına izin vermek yararlı olacaktır (Fischer ve ark., 2012).

Temel Protokol 3: Püskürtmeli Kaplama

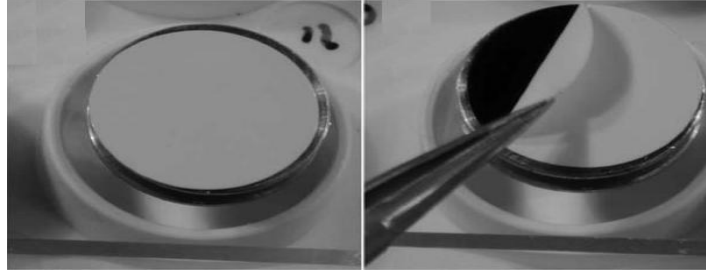
Temel Protokol 1 ve 2'de belirtildiği gibi sabitlenen ve kurutulan örnekler, iletken bir metal ile ince bir tabaka olacak şekilde kaplanır (Fischer ve ark., 2012).

Bu, örneklerin hasar görmesini minimuma indirirken, SEM'de ikincil elektron tespiti kullanılarak topografik kontrastı arttırır, bu da gelişmiş bir görüntüleme sağlar. Genel olarak iki tip püskürtmeli kaplama ünitesi bulunur, düşük vakum sistemleri, ki bunlar düşük büyütme ve düşük çözünürlüklü çalışmalar için yeterlidir. İkinci olarak yüksek vakum sistemleri, bunlar da yüksek çözünürlüklü görüntüleme için gereklidir. Kullanılacak metalin seçimi uygulamaya göre yapılmalıdır. Altın, altın/paladyum ya da platin alaşımları ya da platin (Au, Au/Pd, Au/Pt, Pt) düşük çözünürlüklü görüntüleme için ortak tercihlerdendir. İridyum (Ir), tungsten (W) ya da karbon (C) yüksek çözünürlüklü görüntüleme için daha iyi bir kaplama sağlar. Tüm durumlarda, ince bir tabakanın uygulanması yapısal detayları engelleyici durumları önlemek açısından önemlidir (Fischer ve ark., 2012).

Ek Malzemeler

- Mikroskop özel numune tablası (alüminyum taslakları gibi),
- İnce uçlu cımbız,
- SEM taslak cımbızı,
- İletken, çift taraflı yapışkan bant ve/veya iletken boya,
- Püskürtmeli kaplayıcı,
- Metal bir hedef (Ir, Au/Pd, Cr, Pt, C gibi),
- SEM numune saklama kutusu

1. Mikroskop özel numune tablası olan alüminyum taslaklarını saklama kabına yerleştirilir.
2. Taslağa çift taraflı iletken bant uygulayınır ve koruyucu tabakası kaldırılır (bkz Şekil 2.5).

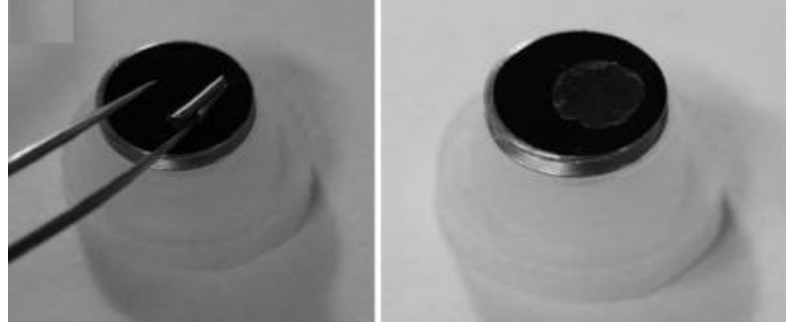


Şekil 2.5. SEM taslağına yapıştırılan çift taraflı alüminyum (Fischer ve ark., 2012)

Gümüş ya da karbon gibi iletken boyalar uygulandığında numuneler boya kurumadan monte edilmelidir.

3. Temel Protokol 1 ve 2’de gösterildiği gibi sabitlenip kurutulan örnekler, taslaklar üzerine uygun şekilde yerleştirilir.

CPD’de kuruduktan sonra filtreler doğal bir şekilde hücre tarafına doğru kıvrılırlar. Numunenin montajında, ince cımbızlar kullanılarak ve de hücrelere zarar vermemeye dikkat ederek, banda hafifçe bastırılır (bkz Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Yapıştırıcı üzerine yerleştirilen membran filtresi (Fischer ve ark., 2012)

4. Örnek yerleştirildikten sonra, numune tablası ve numune arasındaki irtibat numune etrafına uygulanacak ince bir tabaka iletken boya ile iyileştirilebilir (bkz Şekil 2.7). Vakum altında püskürtmeli kaplama öncesi, yeterli kuruma süresince beklenmelidir (4saat ya da bir gece boyunca, bir kurutucu içinde).



Şekil 2.7. İletken boya dikkatli bir şekilde, altta yatan kısım ile tam temas kuracak şekilde uygulanır (Fischer ve ark., 2012)

5. Püskürtmeli kaplayıcıya kuru örnek monte edilir, üreticinin tavsiye ettiği şekilde işleme devam edilir. Temel adımlar:
 - a) Gerekli vakumun sağlanır,
 - b) Argon gazı çıkarma ya da gerilim uygulamadan önce gaz hattı oluşturulur,
 - c) Doğru hedef belirlendiğinden emin olunur,
 - d) Eğilme ve döndürme koşulları ayarlanılır,
 - e) Gerilim uygulanır,

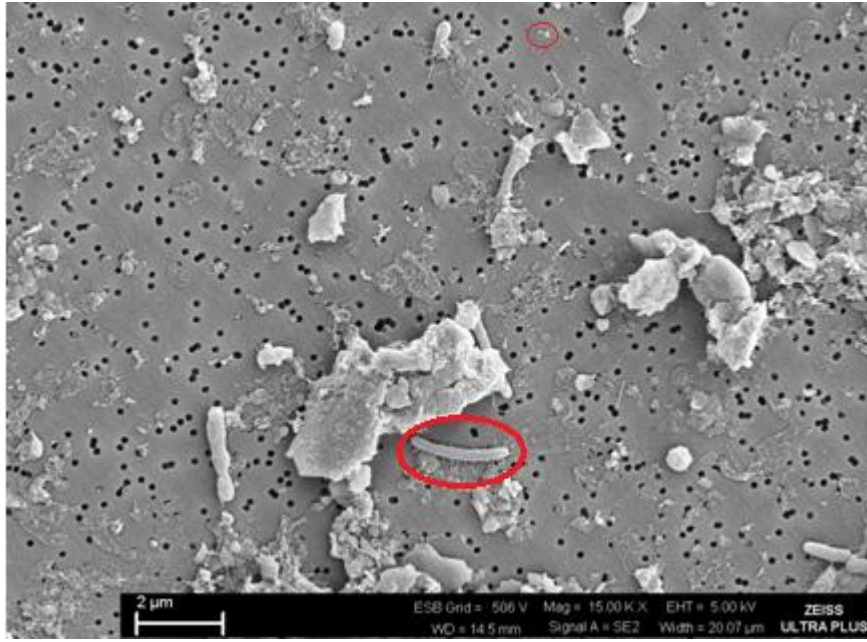
- f) Belirli emisyon için gaz vanalarını açılır,
- g) İstenen kalınlıkta ya da zamanda kaplanır ve güç kaynağını kapatılır,
- h) Vakumu serbest bırakılır,
- i) Örnek alınır, taslak SEM saklama kutusuna yerleştirilir ve inceleme için hazır olana kadar kurutucuda bekletilir (Fischer ve ark., 2012).

3. BULGULAR

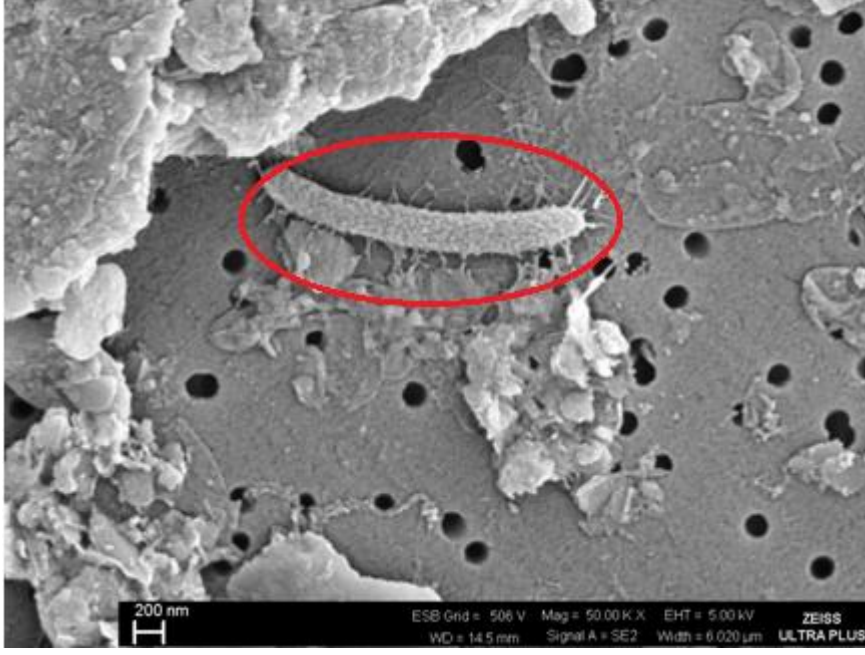
3.1. Su Örneklerindeki Mikrobiyal Çeşitliliğin SEM ile Görüntülenmesi



Şekil 3.1. Filtre edilen su örnekleri (5.520X büyütme)



Şekil 3.2. Filtre edilen su örnekleri (15.000X büyütme)



Şekil 3.3. Filtre edilen su örnekleri (50.000X büyütme)

Şekil 3.1, 3.2, 3.3' de görüldüğü gibi su örnekleri filtre edilerek alkol serisinden geçirilmiş ve kritik nokta kurutması sürecinden sonra Zeiss Ultra Plus SEM ile fotoğraflanmıştır. Fotoğraf 5.00 kV EHT değerinde, SE2 detektörü kullanılarak elde edilmiştir. Görüntü alanında genel olarak çubuk ve kok morfolojisine sahip mikroorganizmalar gözlenmektedir. Çubuk şekilli organizmaların uzunluğu 2-3 mikrometre civarındadır. Bunun yanında 0.5 mikrometreden daha küçük çaplı koklar dikkat çekmektedir. Şekil 3.2' de 15.000X ve Şekil 3.3'te 50.000X büyütme uygulanmıştır.



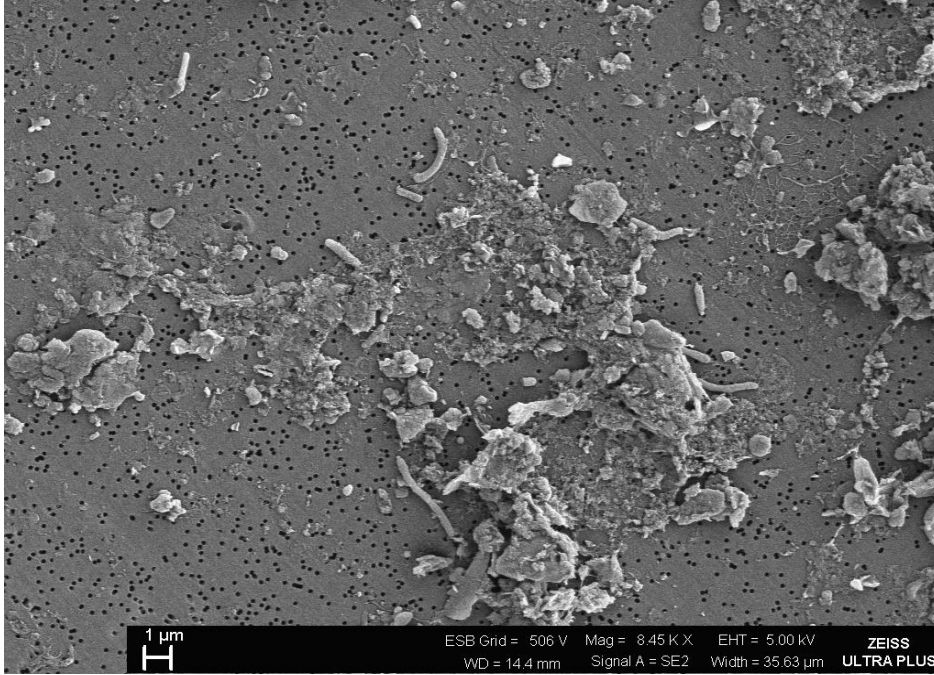
Şekil 3.4. Filtre edilen su örnekleri

Şekil 3.4' te de su örnekleri filtre edilerek alkol serisinden geçirilmiş ve kritik nokta kurutması sürecinden sonra Zeiss Ultra Plus SEM ile fotoğraflanmıştır. Fotoğraf 5.00 kV EHT değerinde, SE2 detektörü kullanılarak elde edilmiştir. Görüntü alanında yaklaşık 300 nanometre çaplı ve 5 kenarlı yüzleri olan yapılar gözlenmiştir.

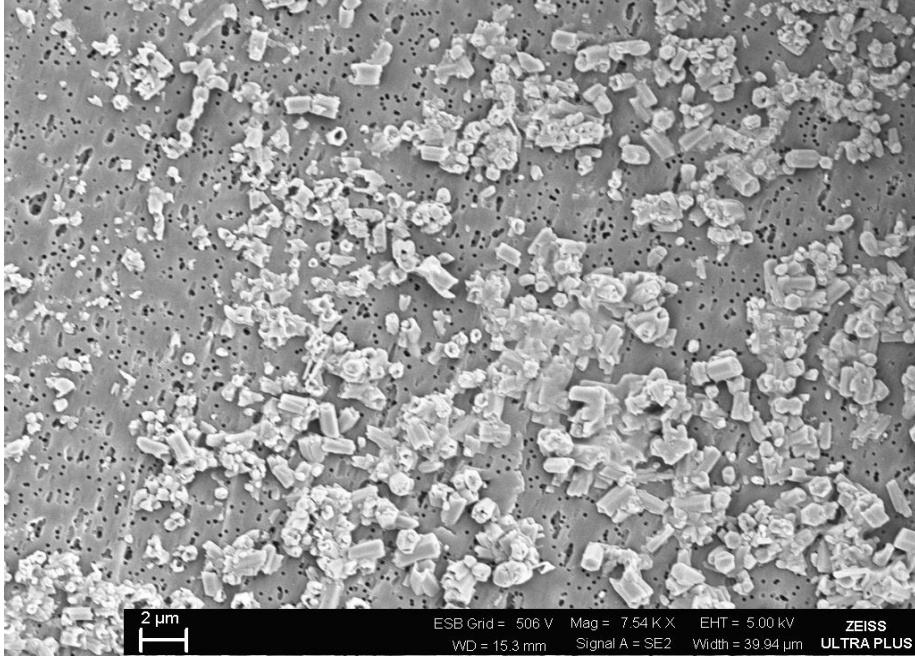


Şekil 3.5. Tuz Gölü su örneğinden başka bir görüntü alanı (24.400X büyütme)

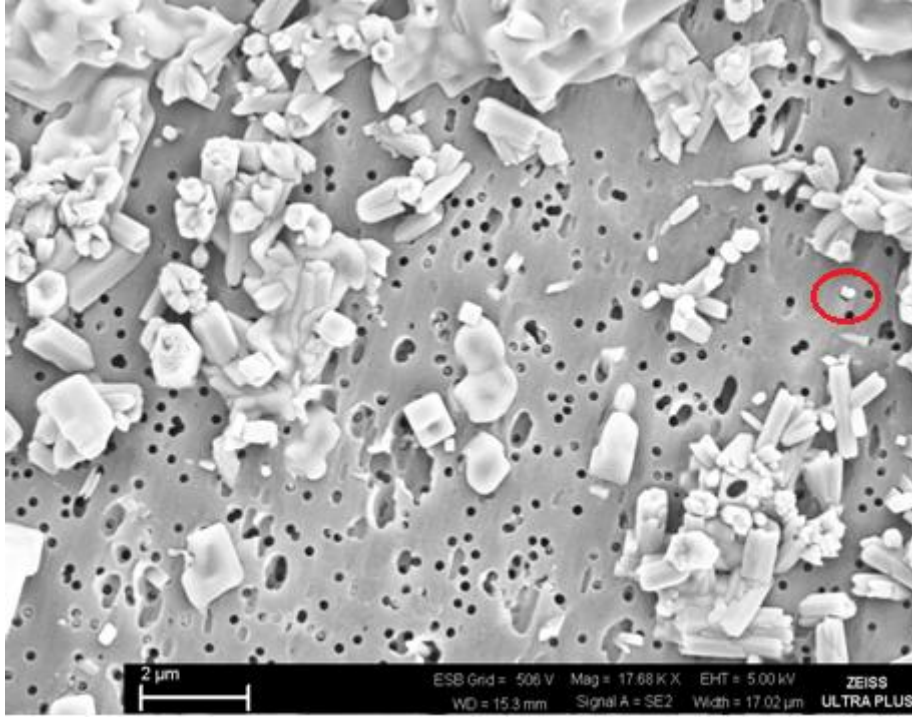
Şekil 3.5'te görüntülenen alanda Nanohaloarchaea olması muhtemel ve yaklaşık 0.1 mikrometre çaplı yapılar gözlenmiştir. Burada 24.400X büyütme, 5.00 kV EHT ve SE2 detektör kullanılmıştır.



Şekil 3.6. Tuz Gölü örneği SEM görüntü alanı (8.450X büyütme)



Şekil 3.7. Sivas Tuzlagözü örneği SEM görüntü alanı (7.540X büyütme)

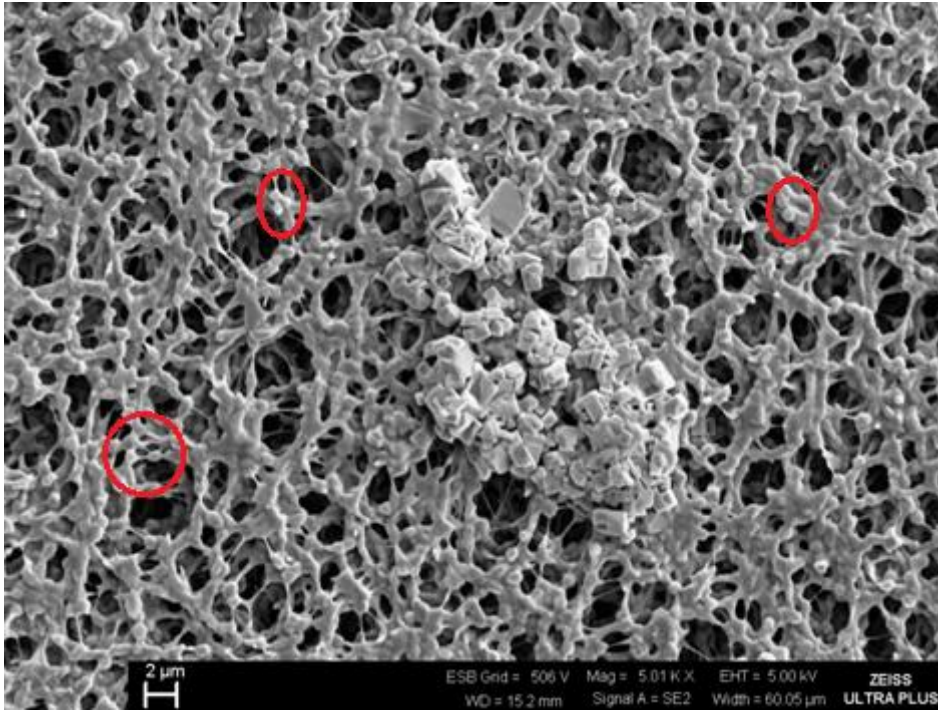


Şekil 3.8. Sivas Tuzlagözü örneği SEM görüntü alanı (17.680X büyütme)

Bu örnekte kullanılan filtre tipi değiştirilmiş ve GTTP filtre yerine GVP filtre kullanılmıştır.

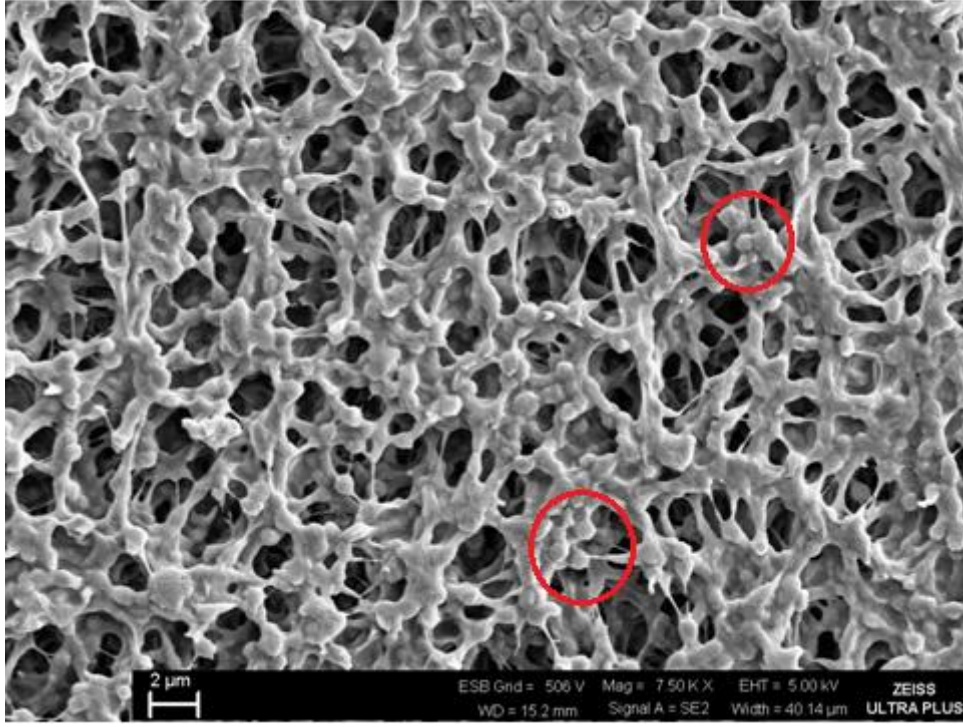
Kritik nokta kurutması sürecinden sonra Zeiss Ultra Plus SEM ile fotoğraflanmıştır. Fotoğraf 5.00 kV EHT değerinde, SE2 detektörü kullanılarak elde edilmiştir. Görüntü alanında nadir olarak kok morfolojisine sahip mikroorganizmalar gözlenmiştir. Filtre tipinden ve işlem prosedüründen kaynaklı olarak görüntü alanında birçok kristalize olmuş yapı bulunmaktadır.

3.2. Kültürlerden Hazırlanan Filtreler ile Elde Edilen SEM Fotoğrafları



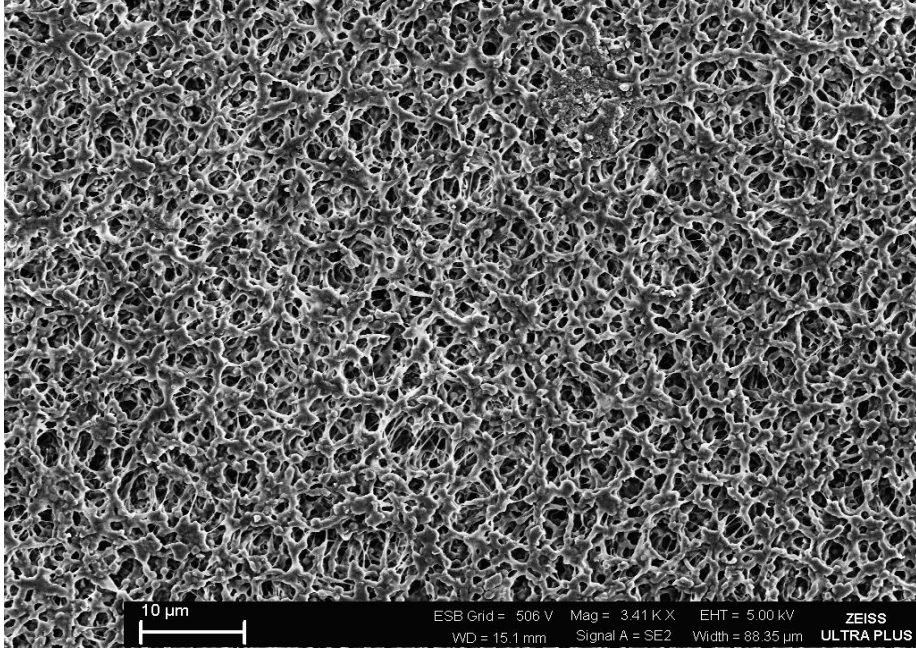
Şekil 3.9. ZB1 izolatu ile elde edilen SEM görüntüleri (5.010X büyütme)

Şekil 3.9’da da ZB1 sıvı kültürü filtre edilerek alkol serisinden geçirilmiş ve kritik nokta kurutması sürecinden sonra Zeiss Ultra Plus SEM ile fotoğraflanmıştır. Fotoğraf 5.00 kV EHT değerinde, SE2 detektörü kullanılarak elde edilmiştir.

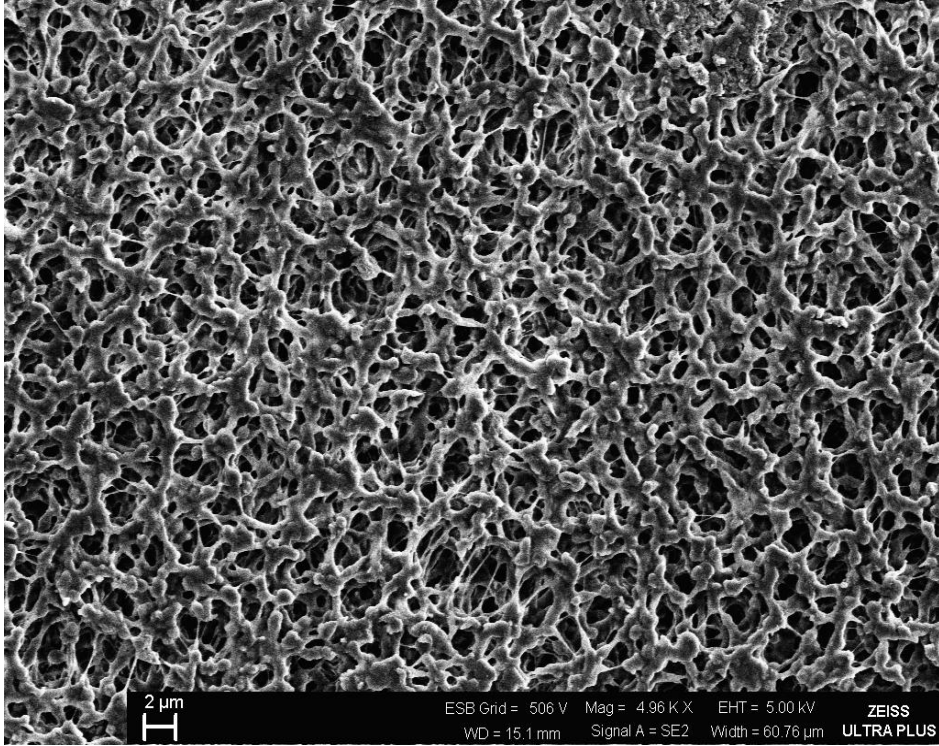


Şekil 3.10. ZB1 izolatu ile elde edilen SEM görüntüleri (7.500X büyütme)

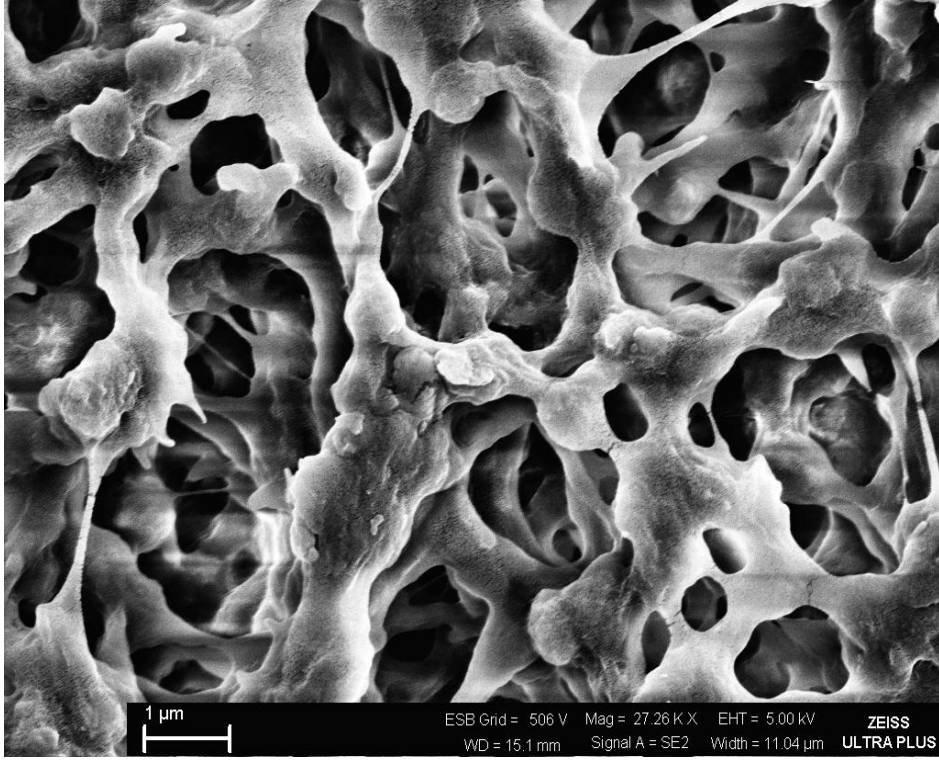
Şekil 3.10' da da ZB1 sıvı kültürü filtre edilerek alkol serisinden geçirilmiş ve kritik nokta kurutması sürecinden sonra Zeiss Ultra Plus SEM ile fotoğraflanmıştır. Fotoğraf 5.00 kV EHT değerinde, SE2 detektörü kullanılarak elde edilmiştir. 7.500X büyütme kullanılmıştır. Yaklaşık 1 mikrometre çaplı kok şeklinde hücreler gözlenmektedir. Ancak kaplama miktarı ve filtre özelliği nedeniyle daha net bir görüntü alınması mümkün olmamıştır.



Şekil 3.11. HP2 sıvı kültürü (3.410X büyütme)



Şekil 3.12. HP2 sıvı kültürü (4.960X büyütme)



Şekil 3.13. HP2 sıvı kültürü

Şekil 3.11, 3.12, 3.13' te de HP2 sıvı kültürü filtre edilerek alkol serisinden geçirilmiş ve kritik nokta kurutması sürecinden sonra Zeiss Ultra Plus SEM ile fotoğraflanmıştır. Fotoğraf 5.00 kV EHT değerinde, SE2 detektörü kullanılarak elde edilmiştir. 7.500X büyütme kullanılmıştır. Yaklaşık 1 mikrometre çaplı kok şeklinde hücreler gözlenmektedir. Ancak kaplama miktarı ve filtre özelliği nedeniyle daha net bir görüntü alınması mümkün olmamıştır.

4. TARTIŞMA

SEM’de kullanılacak her örnek kuru olmalıdır. Yaşayan mikroorganizmalar gibi bakteriler de hücrelerinde protein ve yüksek oranda su içerirler. SEM için hazırlarken bunların yapılarına zarar vermeden fikse etmek önemlidir. Makul bir süre içinde bu adımları gerçekleştirmek için örneklerin oldukça ince (<2 mm) ve küçük (sadece birkaç mm) olması gerekmektedir. Yüzeylerinde bakteri bulunduran bozuk et, deri, sebze, kompost malzemeler ya da agar jel tabakaları öncelikle çıkarılıp, yaklaşık 10mmX10mm olacak şekilde mümkün oldukça ince kesilmeli (1-2mm) ve daha küçük parçalara (5mmX5mm) ayrılmadan önce fikse edilmelidir. Eğer bakteriler yoğurt, peynir, kefir ya da diğer materyaller gibi kolay kesilebilir örneklerin içindeyse bunlar 10-15mm prizma olarak kesilmelidir. Karıştırılmış yoğurt ya da krema gibi akışkan örnekler en iyi 10-15 mm sütunlar şeklinde agar jel tüpler içinde kapsülendir. Çiğ yumurta sarısı gibi ısıya duyarlı gıdalar ise kalsiyum alginat jel tüplerde kapsülendir. Agar jel plakası üzerindeki bakteri kolonileri temiz bir agar jel bandından 1mm’e kadar çıkarılabilir. Eğer mümkünse SEM’de incelenecek örnekler 2mm’den ince plakalar üzerinde büyütülmelidir, bu çıkarma işlemini kolaylaştıracaktır. Katı örnekler bir tamponda fikse edilir (0.1M, pH 6.5-7.0). %2-3 glutaraldehit gibi bir fiksatif kullanılır ve 5dk-24 saat arasında değişen periyotlarda uygulanır. Eğer ki örnek bileşenleri lipidler ya da polisakkaritler gibi protein bazlı değilse, Osmiyum tetroksit ya da Ruthenyum kırmızısı ile postfiksasyon yapılır (Kalab ve ark., 2008).

Süspansiyonlardaki bakteriler ön temizleme gerektirebilir. Bu da tercihen iri parçacıkları filtreleyerek gerçekleşir. Oldukça geniş bir filtre yelpazesi vardır ve bunlar amaçlarına uygun por çaplarıyla farklılıklar gösterirler. Saf bakteriler SEM filtresi üzerinde yakalanabilir, bunlar SEM metal taslaklarına uyacak şekilde 13mm çaptadır ve küçük porlara sahiptir (0.2-1 µm). Polikarbonat ‘nuklepor’ filtreler görece olarak pürüzsüz yüzeylere sahiptirler, etanol ve sıvı karbondioksit karşı dayanıklıdır (asetona değil) ve alkol dehidrasyonu ve kritik nokta kurutması için uygundur. Bakterilerin yaşayan ya da sabit formları filtreler ile yakalanabilir (Kalab ve ark., 2008).

Bu tür filtrelerin bir yüzü parlak (oldukça pürüzsüz), diğer yüzü mattır (biraz pürüzlü/iri taneli). İkinci taraf sonraki hazırlık aşamaları sırasında bakterileri daha iyi tutmak için uygundur. Yaşayan bakteriler burada fikse edilmiş bakterilerden daha uygundur (Kalab ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda da gözlemlerimize göre nükleopor filtrelerin SEM çalışmaları için daha iyi sonuç verdiğini söyleyebiliriz. Ancak bu filtrelerin kullanımı sırasında filtrelenecek örneğin içerdiği organik ve inorganik yüklerin durumu muhakkak düşünülmeli ve buna göre optimizasyonlar gerçekleştirilmelidir.

Filtrelere %0.1'lik polilizin hidrobromür çözeltisiyle bir ön arıtma yapılması bakterilerin filtreye yapışmasını kolaylaştırır. 13mm'lik filtrede ince paslanmaz bir çelik filtre tutucu, kısa esnek borular kullanılarak bir vakum şişesine monte edildiğinde oldukça yararlı olduğu gözlenmiştir. Şişe pamuk, yün bir filtre ve bir valf aracılığıyla vakum hattına bağlıdır. Bakteriye süspansiyonlar eğik bir filtre üzerine Pasteur pipeti aracılığı ile uygulanır. Süspansiyonun büyük bir kısmı filtrenin alt kısmından süzdürülür, ki bu da bakteriyel katmanın filtrenin üst kısmında en ince ve alt kısmında en kalın olduğu anlamına gelir. Bu nedenle, filtre üzerinde bakterilerin arzu edilen yoğunluğa sahip olduğu bir alan geliştirilir. Bakteriler filtre yüzeyinin yansıtıcılığını değiştirmektedir. Biraz tecrübe ile laboratuvar çalışanı her zaman filtrenin bazı kısımlarında bakterilerin uygun yoğunluğunu elde edecektir. Filtre üzerinde gözle görülür bir sıvı olmadığı durumlarda vakum uygulaması hemen durdurulmalıdır ama filtre (ve bakteri) bir fiksatif içine transfer edilirken ıslak/nemli olmalıdır. Eğer ki bakteriler fikse edilmişse o zaman dehidrasyon için %20'lik etanolle muamele edilmelidir (Kalab ve ark., 2008).

Çalışmamızda filtre üzerindeki bakteri yoğunluğunun ayarlanabilmesi amacıyla farklı seyreltmeler kullanılmış ve bu sayede uygun görüntü alınabilmektedir.

Fiksasyon ve/veya dehidrasyon filtrelere uyum sağlamak için en iyi kapaklı ve geniş boyunlu şişelerde yapılmaktadır. Örneklerin dehidrasyonu kademeli bir etanol serisiyle (20, 40, 60, 80, 95, 100, 100, 100% etanol) yavaş hareket eden eğimli döner masada yapılır. 5-10 dakikalık kısa aralıklarla cam şişe içinde çeşitli filtreler dehidrasyon için yeterlidir (Kalab ve ark., 2008).

Son olarak filtrelere kritik nokta kurutması yapılır. Gerektiğinde birden fazla numune tutucu kullanılabilir. Filtre her zaman ıslak olmalıdır. Kritik nokta kurutması öncesi saf etanolü tahliye etmek için bir filtre kağıdının üzerine oldukça kısa süreli transfer edilebilir. Basınçlı hücre içine sıvı karbondioksit girişi filtre üzerindeki bakterilerin uzaklaşmasını azaltmak için korumalıdır. Katı örneklerin aksine gözenekli filtreler SEM taslaklarındaki çift taraflı yapışkan bant üzerine monte edilmemelidir (eğer SEM birkaç güne kadar yapılamazsa). (Kalab ve ark., 2008).

Bizim çalışmamızda kullandığımız gözenekli filtrelerden GTTP tipi olanların çift taraflı bant üzerine monte edilse bile görüntü almada sorun oluşturmadığı belirlenmiştir. Ancak diğer filtre tipleri bu konuda daha dikkatli olmayı gerektirmektedir.

Çalışmamızda denediğimiz HVLP filtreler bu anlamda çift taraflı bantlarla kullanıma uygun değildir. Ayrıca kritik nokta kurutması yapılmadan da çoğu durumda filtrelerin SEM ile incelenmesi mümkün olabilmektedir. Ancak örnek tipi ve filtre tipi gibi değişkenlere göre buradan alınacak sonucun kalitesi de farklı olabilir.

Elektron mikroskopunda, serbest hareket eden elektron demetlerinin bulunduğu ortamda, yüksek vakum ile biyolojik yapının korunması önceliklidir. Biyolojik numuneler genellikle, iletken olmayan, termal olarak duyarlı, kırılğan malzemelerden oluşur ve stabilize edilmedikleri takdirde görüntülerde farklı materyaller bulunması ve numunenin hasar görmesi gibi durumlar söz konusudur. Örnekler fiziksel (Cryo koruması) ya da kimyasal yöntemlerden biri veya her ikisi ile birlikte hazırlanabilir. Cryo koruması, optimum doğal ortam korunmasında tercih edilen yöntem olsa da, pahalı aletler ve profesyonel beceri gerektirmektedir. Bu nedenle de bir çok bilimsel araştırma için gerekli görülmemektedir. SEM incelemesi için örneklerin hazırlanmasında, yapıların Temel Protokol 1'deki gibi stabilize edilmesi gerekmektedir. Sonrasında örneklerin Temel Protokol 2'deki gibi dehidrasyonu gelir. Son olarak da Temel Protokol 3'te belirtildiği gibi örneğin yeterli iletkenliğinin sağlanması gerekmektedir. Özellikle, Temel Protokol 1, hayvan doku ve hücreleri, bakteriler, virüsler ve makromoleküler örneklerin kimyasal muhafazası için ipuçları sunmaktadır (Fischer ve ark., 2012).

Temel Protokol 2, örneklerin bağlanması ve kritik nokta kurutması/kimyasal kurutma için seçenekler sağlar. Temel Protokol 3, metal kaplamanın ve bunun alternatiflerinin mantığını açıklar (Fischer ve ark., 2012).

Bizim çalışmamızda temel olarak hipersalin ortamlara ait su örnekleri ve saf kültür haline getirdiğimiz izolatlar, çeşitli filtrelerin yüzeyinde tutularak ve sonrasında alkol serilerinden geçirilerek incelemeye hazır hale getirilmişlerdir. Örneklerin bazılarında filtrelere kritik nokta kurutması uygulanmadan SEM ile incelemeleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda Tuz Gölü su örneklerinin bakteri çeşitliliği anlamında oldukça zengin olduğu belirlenmiştir. Filtre yüzeyinde basil, kok, kare şekilli ve farklı morfolojilerde mikroorganizmaların varlığı gözlenmiştir. *Salinibacter* genusuna ait olduğu düşünülen uzun basiller göldeki dominant Bacteria domaini üyesi olarak daha önceki çalışmalarla örtüşmektedir. Yine aynı şekilde Archaea domaini açısından dominant olduğu daha önceki çalışmalarda ifade edilen *Haloquadratum* üyeleri de görüntülenmiştir.

Tuz gölü su örnekleri filtre edilerek alkol serisinden geçirilmiş ve kritik nokta kurutması sürecinden sonra Zeiss Ultra Plus SEM ile fotoğraflanmıştır. Görüntüler için optimum şartlar 5.00 kV EHT değerinde, SE2 detektörü kullanılarak elde edilmiştir. Görüntü alanında genel olarak çubuk ve kok morfolojisine sahip mikroorganizmalar gözlenmiştir. Çubuk şekilli organizmaların uzunluğu 2-3 mikrometre civarındadır. Bunun yanında 0.5 mikrometreden daha küçük çaplı koklar dikkat çekmektedir. Bu organizmaların son zamanlarda keşfi yapılan *Nanohaloarchaea* üyeleri olabileceği ihtimali değerlendirilmektedir.

Tuzlagözü tuzlası örnekleri ise çeşitlilik anlamında zayıf görünmektedir. Tuz Gölü örneklerinde rastlanan morfolojilere burada pek rastlanmamıştır.

Sonuç;

1. Bu çalışma, hipersalin su örneklerinin mikrobiyal çeşitliliğinin taramalı elektron mikroskopisi yöntemi ile araştırılması üzerine ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. Çeşitliliği belirlemek için farklı filtre tipleri ve örnek hazırlama yöntemleri kullanılmıştır.

2. Tuz Gölü su örneklerinde mikrobiyal çeşitliliğin oldukça zengin olduğu ortaya konmuştur. Ancak Tuzlagözü örneğinde çeşitliliğin zayıf olduğu gözlenmiştir.

3. GTTP tipi 0.2 mikrometre por çaplı nükleopor membran filtrelerin SEM ile analizlerde uygun olduğu belirlenmiştir.

4. Kritik nokta kurutması uygulaması yapılmadan direkt olarak su örneğinin filtrelenmesini takiben sadece alkol serisi uygulamasının çoğu örnekte iyi görüntü almak için yeterli olduğu ortaya konmuştur.

5. Örneklerin kaplanmasında 1 dakika süreli kaplama işleminin genel olarak yeterli olduğu ancak numune tipine göre bu değer düşürülebileceği belirlenmiştir.

6. Kültür edilmiş örneklerin filtrasyonu sırasında seyreltme oranlarının optimize edilmesinin önemli olduğu ortaya konmuştur.

7. Su örneklerinde rastlanan ve 0.5 mikrometreden daha küçük çaplı organizmaların *Nanohaloarchaea* üyeleri olabileceği düşünülmektedir.

Gelecekte yapılması planlanan çalışmalar;

Ülkemiz hipersalin çevrelerindeki *Nanohaloarchaea* üyelerinin varlığının tespitine yönelik çalışmalar detaylandırılarak çalışılacaktır.

Ayrıca fikse edilip kurutulmuş örnekler ile çalışmanın yanında sıvı ortamlardaki organizmaların SEM ile incelenmesine izin veren özel bir teknik olan Wet-SEM için optimizasyon çalışmaları yapılacak ve sıvı örnek içindeki mikroorganizmaların doğal hallerini daha iyi yansıtabilecek fotoğraflama ve analiz teknikleri geliştirilmeye çalışılacaktır.

KAYNAKÇA

- Bayramoğlu, E. E., ivi, S., 2012, *Deri Sanayiinde Koruyucu Olarak Tuz ve Tuzda Gelişen Mikroorganizmalar*, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 2, 13-26.
- Coşkun, A., *Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni Bacillus Sp. Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu*, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2010.
- DasSarma, S. ve Arora, P. ; *Halophiles*. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, 2001.
- Dyall-Smith, M., (2009), *Halohandbook*, Protocols for haloarchaeal genetics, Version 7.1.
- Fisher, E. R., Hansen, B. T., Nair, V., Hoyt, F. H., Dorward, D. W., (2012), *Scanning Electron Microscopy*. Curr Protoc Microbiol, doi:10.1002/9780471729259.mc02b02s25.
- Fukara, G., *Bazı Ekstrem Termofil Bakterilerin Amilazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.
- Grant W. D., (2004), *Life at low water activity*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences, 359,1249- 1267.
- Horikoshi, K., Grant, W.D., (1998), *Extremophiles- Microbial life in extreme environments*, 93-133.
- Kalab, M., Yang, A., Chabot, D., *Conventional Scanning Electron Microscopy of Bacteria*. (2008).
- Kapakin Terim, K. A., (2007), *Transmission Elektron Mikroskobu*. YYÜ Vet Fak Derg, 18(1):105-110.

- Karakulak, T., *GaAs/AlGaAs Tabanlı Kuantum Kuyularının Geçirimli Elektron Mikroskobu ile Analizi*, Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2010.
- Obayashi, A., Hiraoka, N., Kita, K., Nakajima, H., Shuzo, T., (1988), *Process for producing restriction enzyme*. US Patent 4: 724,209, US Cl. 435/199.
- Özcan, B., *Türkiye'den Halofilik Arkebakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu*. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2004.
- Pedros-Alio, C., Calderon-Paz, J.I., MacLean, M.H., Medina, G., Marrase, C., Gasol, J.M., and Guixa-Boixereu, N., (2000), *The microbial food web along salinity gradients*. *FEMS Microbiol Ecol* 32:143-155.
- Piroeva, I., Atanassova-Vladimirova, S., Dimowa, L., Sbirikova, H., Radoslavov, G., Hristov, P., Shivachev, B. L., (2013), *A simple and rapid scanning electron microscope preparative technique for observation of biological samples: application on bacteria and DNA samples*, Bulgarian Chemical Communications, Volume 45, Number 4, 510-515.
- Purdy, K. J., Cresswell-Maynard, T. D., Nedwell, D. B., McGenity, T. J., Grant, W. D., Timmis, K. N., Embley, T.M., 2004, *Isolation of haloarchaea that grow at low salinities*. *Environ Microbiol*, 6, 591-5.
- Randla, T., *Mikrobioloogilises töös kasutatavad põhimõtted ja –meetodid*, Biotehnoloogia laboratoorsed tööd. Lisad. TTÜ Biotehnoloogia õppetool, Tallinn 2015.
- Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L., *Life in extreme environments*. *Nature*, 409, 1092-1101, 2001.
- Sağır, T., *Halofilik Mikroorganizmalar ile Biyoaktif Metabolit Üretimi*, Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2014

Uçar, F., Tamer, A., Yaşa, İ., Koçyiğit, A., *Prokaryotik Çeşitlilik*, İzmir Güven Yayınevi, İzmir, 2008.

Yalçınkaya, Ö., *Bazı Eser Elementlerin Alüminyum Oksit/Tek Duvarlı Karbon Nanotüp ve Zirkonyum Oksit/Bor Oksit Nano Malzemeler Kullanılarak Katı Faz Özütleme Tekniği ile Zenginleştirilmesi ve Tayini*. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010.

(<http://www.acikbilim.com/2014/02/dosyalar/daha-yakin-olmak-icin-elektron-mikroskoplari-2.html>).

(<http://fen.istanbul.edu.tr/?p=7237>).

(https://www.jic.ac.uk/microscopy/intro_EM.html)

(http://www.selcuk.edu.tr/ileri_arge/yonetim/web/sayfa/ayrinti/5874/tr)