

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TERMAL KAYNAK MİKROBİYOMUNUN ÇEVRESEL DNA METABARKODLAMA
İLE BELİRLENMESİ

Işılay Çelik

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Emre Keskin

Temmuz

2021

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Işılal Çelik

İmzası

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Termal Kaynak Mikrobiyomunun Çevresel DNA Metabarkodlama ile Belirlenmesi

Işıl Çelik

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Emre Keskin

Belirli bir habitat içerisinde yaşayan mikroorganizmaların (bakteri, arke, virüs vs.) genomları mikrobiyom olarak tanımlanmaktadır. Evrensel primerler aracılığıyla çevresel DNA örneği içerisinde birden fazla türe ait kısa nükleotit dizilerinden oluşan ve türler arası farklılık gösteren barkod bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması tekniği eDNA metabarkodlama olarak isimlendirilmiştir. Son zamanlarda daha doğru ve detaylı mikrobiyom analizlerinin gerçekleştirilmesi için yüksek verimli DNA dizileme teknolojilerine başvurulmaktadır. Birçok mikroorganizmanın habitatı olan ve ekstrem koşullara sahip termal kaynaklar, henüz tam olarak keşfedilmemiş biyolojik çeşitlilik barındırır. Termal kaynaklardaki yaşamın çeşitliliğinin kültür gibi konvansiyonel tekniklerle tespiti, bu kaynakların fizikokimyasal yapılarından ötürü simüle edilmesi zor ortamlar oluşturmalarından dolayı oldukça sınırlıdır. Bu çeşitliliğin tespiti özellikle biyoteknoloji alanında olası araştırma ve geliştirme potansiyelleri için önem arz etmektedir. Bu tez çalışması ile termal kaynak mikrobiyomunun bu kaynaklardan izole edilen çevresel DNA'ların metabarkodlamasıyla tespit edilmesi, sıcaklık ve kimyasal içerikten kaynaklanan farklılıkların mikrobiyoma yansımalarının ortaya konması ve biyoteknolojik araştırmalarda kullanılmak üzere bir veri tabanı oluşturulması amaçlanmıştır. Böylece Türkiye'de eDNA metabarkodlama yöntemi kullanılarak termal kaynak mikrobiyom tespitinin yapıldığı ilk çalışma olmakla beraber dünya literatürüne bu alanda ham verilerin analizine yönelik yeni bir biyoinformatik iş akışı ve metabarkodlamaya uygun referans veri tabanı oluşturulmuştur.

2021, 115 sayfa

Anahtar kelimeler: Mikrobiyom, Çevresel DNA (eDNA), Metabarkodlama, Termal kaynak, Yeni nesil dizileme.

ABSTRACT

Msc Thesis

Identification of Thermal Spring Microbiota with Environmental DNA Metabarcoding

Işıl Çelik

Ankara University Biotechnology Institute

Emre Keskin

The genomes of microorganisms (bacteria, archaea, virus, etc.) living in a particular habitat are defined as the microbiome. The technique of amplifying the barcode region, which consists of short nucleotide sequences belonging to more than one species and differs between species, from the environmental DNA sample through universal primers, by polymerase chain reaction is called eDNA metabarcoding. Recently, high-throughput DNA sequencing technologies have been used to perform more accurate and detailed microbiome analyzes. Thermal springs, which are the habitat of many microorganisms and have extreme conditions, contain biodiversity that has not yet been fully explored. Detection of the diversity of life in thermal springs by conventional techniques such as culturing is very limited due to the physicochemical (temperature, heavy metal content, pH, etc.) conditions in these places. Detection of this diversity is especially important for possible research and development potentials in the field of biotechnology. In this thesis, it is aimed to determine the thermal source microbiome by metabarcoding of environmental DNA isolated from these sources, to reveal the reflection of differences caused by temperature and chemical content on microbiome, and to create a database to be used in biotechnological research. Thus, as well as it is the first study in Turkey to detect the thermal source microbiome using the eDNA metabarcoding method, a new bioinformatics workflow for the analysis of raw data in this field and a reference database suitable for metabarcoding provided to the world literature.

2021, 115 pages

Keywords: Microbiome, Environmental DNA (eDNA), Metabarcoding, Thermal spring, Next generation sequencing.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının her aşamasında yol gösteren, sınırsız arazi ve laboratuvar olanakları sağlayan ve deneyimi ile değer katan danışmanım Doç. Dr. Emre KESKİN'e, desteklerini daima hissettiğim Evrimsel Genetik Laboratuvarı ekibime, her zaman yanımda olan ve karşılaştığım her zorlukta bana destek olan aileme, birlikte büyüdüğüm sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. MİKROBİYOM	2
2.2. ÇEVRESEL DNA (EDNA), BARKODLAMA VE METABARKODLAMA	3
2.3. YENİ NESİL DİZİLEME	4
2.4. TERMAL KAYNAKLAR	5
3. GEREKÇE VE AMAC.....	7
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	8
4.1. MATERYAL	8
4.2. YÖNTEM.....	9
4.2.1. ARAZİ ÇALIŞMASI	9
4.2.2. LABORATUVAR ÇALIŞMASI.....	13

4.2.2.1. Longmire Koruma Solüsyonunun Hazırlanması	13
4.2.2.2. eDNA Örneklemesi.....	13
4.2.2.3. eDNA İzolasyonu	14
4.2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	16
4.2.2.5. DNA Kütüphanesinin Hazırlanması	17
4.2.2.5.1. İndeks PZR	17
4.2.2.5.2. Kütüphane Basamağı	17
4.2.3. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER	18
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>20</u>
5.1. SU ÖRNEKLERİNİN FİZİKOKİMYASAL ANALİZİ	20
5.2. MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI.....	22
5.2.1. SPEKTROFOTOMETRE SONUÇLARI	22
5.2.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU SONUÇLARI	23
5.2.3. İNDEKSLİ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU SONUÇLARI	34
5.3. BİYOİNFORMATİK BULGULAR.....	37
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>42</u>
6.1. TARTIŞMA	42
6.1.1. ÇEVRESEL DNA METABARKODLAMA İLE TERMAL KAYNAK MİKROBİYOMUNUN ÇIKARILMASI	97
6.1.2. FİZİKOKİMYASAL FARKLILIKLARIN MİKROBİYOMA YANSIMASI	97
6.1.3. BİYOİNFORMATİK İŞ AKIŞI	98
6.2. SONUÇ.....	99
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>102</u>

ÖZGEÇMİŞ..... 112

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR..... 114



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Nevşehir-Kozaklı örnekleme alanı	9
Şekil 4.2. Ankara-Kızılcahamam örnekleme alanı	10
Şekil 4.3. Yozgat-Boğazlıyan örnekleme alanı	10
Şekil 4.4. Muğla-Dalaman örnekleme alanı, 1	11
Şekil 4.5. Muğla-Dalaman örnekleme alanı, 2	11
Şekil 5.1. 2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix ve 5x Firepol Master Mix Gradient PZR Jel Görüntüsü, N: Negatif kontrol.....	26
Şekil 5.2. Ampliqon Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red ve Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix Gradient PZR Jel Görüntüsü, N: Negatif kontrol.....	27
Şekil 5.3. Promega GoTaq Flexi Gradient PZR Jel Görüntüsü, N: Negatif kontrol, seçilen sıcaklıklar kırmızı çerçeve ile belirtilmiştir.....	27
Şekil 5.4. Pro341F-Pro805R (461-462) Primeri Promega GoTaq Flexi Gradient PZR Jel Görüntüsü, N: Negatif kontrol, seçilen sıcaklıklar kırmızı çerçeve ile belirtilmiştir.	28
Şekil 5.5. 3668-3673 numaralı örneklerin 515F-806R ve 16sV3F-R primerleri ve Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix ile kurulmuş pzs sonucu. N: negatif kontrol.	28
Şekil 5.6. 3668-3673 numaralı örneklerin 515F-806R ve 16sV3F-R primerleri ve Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix ile kurulmuş pzs sonucu. 3670 numaralı örnek 1:10, 3671 numaralı örnek 1:100 dilüe edilmiştir. N: negatif kontrol.....	29
Şekil 5.7. 4232-4237 numaralı örnekler ve Çizelge 5.16.'da belirtilen primerlerle kurulan pzs sonucu. PK: Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol.....	30
Şekil 5.8. 1:10 dilüe edilmiş 4232-4237 ve 4242-4245 numaralı örneklerin 515F-806R primerleriyle kurulan pzs sonucu. PK: pozitif kontrol, N: negatif kontrol.....	31

Şekil 5.9. 1:10 dilüe edilmiş 4232-4237 ve 4242-4245 numaralı örneklerin 16sV3F-R primerleriyle kurulan pzs sonucu. PK: pozitif kontrol, N: negatif kontrol.....	31
Şekil 5.10. 1:100 dilüe edilmiş 4232-4237 ve 1:10 dilüe edilmiş 4242-4245 numaralı örneklerin 16sV3F-R primerleriyle kurulan pzs sonucu. PK: pozitif kontrol, N: negatif kontrol.....	32
Şekil 5.11. Dilüe edilmemiş ve 1:10 dilüe edilmiş 4235-4237 numaralı örneklerin 515F-806R primerleriyle kurulan pzs sonucu. PK: pozitif kontrol, N: negatif kontrol	33
Şekil 5.12. 4297-4300 numaralı örneklerinin 515F-806R ve 16sV3F-R primerleri ve Promega enzimi ile kurulan pzs sonucu. PK: pozitif kontrol, N: negatif kontrol	33
Şekil 5.13. 515F_Index ve 806R_Index pzs sonucu, PK:Pozitif kontrol, N:Negatif kontrol	35
Şekil 5.14. 16sV3F_Index ve 16sV3R_Index pzs sonucu, PK:Pozitif kontrol, N:Negatif kontrol.....	36
Şekil 6.1. 16sV3 Negatif ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiğı	42
Şekil 6.2. 16sV3 Negatif ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiğı	43
Şekil 6.3. 16sV3 Negatif ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiğı	44
Şekil 6.4. 16sV3 Negatif ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiğı.....	45
Şekil 6.5. 515 Negatif F ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiğı	46
Şekil 6.6. 515 Negatif R ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiğı.....	47
Şekil 6.7. 515 Negatif F ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiğı	48
Şekil 6.8. 515 Negatif R ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiğı	49
Şekil 6.9. 515 Negatif ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiğı	50
Şekil 6.10. 515 Negatif F ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiğı	51

Şekil 6.11. 515 Negatif R ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	52
Şekil 6.12. 16sV3 Nevşehir ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği	53
Şekil 6.13. 16sV3 Nevşehir ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	54
Şekil 6.14. 16sV3 Nevşehir ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	55
Şekil 6.15. 16sV3 Nevşehir ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	56
Şekil 6.16. 515 Nevşehir F ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	57
Şekil 6.17. 515 Nevşehir R ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği	58
Şekil 6.18. 515 Nevşehir F ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği	59
Şekil 6.19. 515 Nevşehir R ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	60
Şekil 6.20. 515 Nevşehir ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	61
Şekil 6.21. 515 Nevşehir F ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	62
Şekil 6.22. 515 Nevşehir R ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	63
Şekil 6.23. 16sV3 Kızılcahamam ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	64
Şekil 6.24. 16sV3 Kızılcahamam ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	65
Şekil 6.25. 16sV3 Kızılcahamam ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	66
Şekil 6.26. 16sV3 Kızılcahamam ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	67
Şekil 6.27. 515 Kızılcahamam F ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	68
Şekil 6.28. 515 Kızılcahamam R ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği	69
Şekil 6.29. 515 Kızılcahamam F ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği	70
Şekil 6.30. 515 Kızılcahamam R ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	71
Şekil 6.31. 515 Kızılcahamam ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	72

Şekil 6.32. 515 Kızılcahamam F ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	73
Şekil 6.33. 515 Kızılcahamam R ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	74
Şekil 6.34. 16sV3 Yozgat ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği	75
Şekil 6.35. 16sV3 Yozgat ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	76
Şekil 6.36. 16sV3 Yozgat ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	77
Şekil 6.37. 16sV3 Yozgat ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	78
Şekil 6.38. 515 Yozgat F ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	79
Şekil 6.39. 515 Yozgat R ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği	80
Şekil 6.40. 515 Yozgat F ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	81
Şekil 6.41. 515 Yozgat R ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği	82
Şekil 6.42. 515 Yozgat ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	83
Şekil 6.43. 515 Yozgat F ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	84
Şekil 6.44. 515 Yozgat R ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	85
Şekil 6.45. 16sV3 Dalaman ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği	86
Şekil 6.46. 16sV3 Dalaman ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	87
Şekil 6.47. 16sV3 Dalaman ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	88
Şekil 6.48. 16sV3 Dalaman ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	89
Şekil 6.49. 515 Dalaman F ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	90
Şekil 6.50. 515 Dalaman R ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği	91
Şekil 6.51. 515 Dalaman F ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	92
Şekil 6.52. 515 Dalaman R ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği.....	93

Şekil 6.53. 515 Dalaman ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	94
Şekil 6.54. 515 Dalaman F ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	95
Şekil 6.55. 515 Dalaman R ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği	96



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Arazi ve laboratuvar materyalleri.....	8
Çizelge 4.2. Arazi örnek bilgileri	12
Çizelge 4.3. Longmire solüsyonu hazırlamak için gerekli malzemeler ve miktarları.....	13
Çizelge 5.1. Nevşehir-Kozaklı termal kaynak fizikokimyasal analiz sonucu	20
Çizelge 5.2. Ankara-Kızılcahamam termal kaynak fizikokimyasal analiz sonucu	20
Çizelge 5.3. Yozgat-Boğazlıyan termal kaynak fizikokimyasal analiz sonucu	21
Çizelge 5.4. Muğla-Dalaman termal kaynak fizikokimyasal analiz sonucu	21
Çizelge 5.5. Nevşehir-Kozaklı örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri	22
Çizelge 5.6. Ankara-Kızılcahamam örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri	22
Çizelge 5.7. Yozgat-Boğazlıyan örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri	22
Çizelge 5.8. Muğla-Dalaman örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri	22
Çizelge 5.9. Primer tablosu	23
Çizelge 5.10. 2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix reaktif protokolü	24
Çizelge 5.11. 2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix reaksiyon profili	24
Çizelge 5.12. 5x Firepol Master Mix reaktif protokolü.....	24
Çizelge 5.13. 5x Firepol Master Mix reaksiyon profili	24
Çizelge 5.14. Ampliqon Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red reaktif protokolü.....	24
Çizelge 5.15. Ampliqon Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red reaksiyon profili	25
Çizelge 5.16. Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix reaktif protokolü	25

Çizelge 5.17. Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix reaksiyon profili.....	25
Çizelge 5.18. Promega GoTaq Flexi reaktif protokolü	25
Çizelge 5.19. Promega GoTaq Flexi reaksiyon profili	26
Çizelge 5.20. Primer bağlanma sıcaklıkları	29
Çizelge 5.21. Dilüsyon oranları	34
Çizelge 5.22. İndeksli primer listesi	35
Çizelge 5.23. Birleştirilen örneklerin kalite ve miktar değerleri	36
Çizelge 5.24. Dizilenen verilerin sayıları, * ile belirtilmiş uniq.clean verilerinde 515F-806R primerleri ile elde edilen ileri ve geri okumalar tek bir dosyada birleştirilmiştir.	37
Çizelge 5.25. 16sV3 analiz özeti	38
Çizelge 5.26. 515-F analiz özeti, * ile belirtilmiş 515-F-clean verileri ileri ve geri okumaların tek bir dosyada birleştirilmesinden oluşturulmuştur.	38
Çizelge 5.27. 515-R analiz özeti, * ile belirtilmiş 515-R-clean verileri ileri ve geri okumaların tek bir dosyada birleştirilmesinden oluşturulmuştur.	38
Çizelge 5.28. Negatif örneklerin cins listesi.....	39
Çizelge 5.29. Nevşehir-Kozaklı örneklerinin cins listesi	40
Çizelge 5.30. Ankara-Kızılcahamam örneklerinin cins listesi	40
Çizelge 5.31. Yozgat-Boğazlıyan örneklerinin cins listesi.....	41
Çizelge 5.32. Muğla-Dalaman örneklerinin cins listesi	41

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
Bp	Baz çifti
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Dinükleotittrifosfat
mL	Mililitre
pzr	Polimeraz zincir reaksiyonu
sn	Saniye
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Belirli bir niş içerisindeki mikroorganizmaların tüm genetik materyali mikrobiyom olarak tanımlanmaktadır. Besin döngüsünden insan sağlığının korunmasına kadar geniş bir ekosistem yelpazesindeki birçok sürecin kilit noktasını oluşturdıklarından dolayı mikrobiyomların tespiti ve tanımlanması büyük bir önem teşkil etmektedir (1). Bu süreçte kültür gibi konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra 16S ribozomal RNA analizi gibi moleküler teknikler de kullanılmaktadır. Çevresel örneklerde yapılacak mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında moleküler teknikler, konvansiyonel tekniklere kıyasla daha kapsamlı sonuç vermektedir. Bu moleküler tekniklerden biri olan metabarkodlama, birden çok taksonu barındıran kaynakların moleküler tanımlamasını yapmak için kısa nükleotid dizilerinden oluşan belirteç bölgeleri kullanır. Bu belirteç bölgelerin evrensel primerler ile çoğaltılmasıyla elde edilen milyonlarca DNA parçasının analizi yeni nesil dizileme teknolojileriyle yapılır (2).

20°C'nin üzerinde sıcaklığa sahip yeraltı kaynak suları termal kaynak olarak isimlendirilir. 19. yüzyıldan beri üzerinde araştırmalar yapılan bu kaynakların mikrobiyal içerikleri 1950 yılından itibaren tanımlanmaya başlamıştır. İdeal kültür koşullarının sağlanmasındaki teknik sorunlardan dolayı birçok mikroorganizmanın habitatı olan bu yeraltı suları, hala tam olarak sınıflandırılmamış bir biyolojik çeşitlilik barındırır. Bu biyolojik çeşitliliği tanımlamak hem olası yeni mikroorganizma türlerinin tespiti hem de tespit edilen mikroorganizmaların özgün işlevlerinin (fermentasyon, enerji üretimi, biyolojik arıtım) ve ürettikleri bileşiklerin (biyoaktif bileşikler, asit, enzim, pigment) biyoteknolojik araştırmalarda kullanılması için oldukça önemlidir. Termal kaynaklarda yaşayan mikroorganizmalar, bu kaynaklardan izole edilen DNAların metabarkodlanması ile tür seviyesinde belirlenebilir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. MİKROBİYOM

Mikrobiyom, bir habitat içerisindeki mikroorganizmaları (bakteri, arke, virüs vs.), bu mikroorganizmaların genomlarını ve çevre koşullarının tümünü ifade eder. Klinik veya çevresel veriler ile metagenomik, metabonomik, metatranskriptomik veya metaproteomik gibi yöntemlerin birlikte kullanılması veya uygulanması, mikrobiyomun karakterize edilmesini sağlar (1). Mikrobiyal topluluklar, dünyanın en eski sakinlerini temsil eder ve memeli sindirim sisteminden hidrotermal bacalara kadar çeşitli ortamların dinamiklerini şekillendirir (2). Bu sebeple, belirli bir çevrede yaşamlarını sürdüren ve birlikte çalışan bu toplulukların tespiti, sınıflandırılması ve analizi klinik çalışmalardan biyoteknolojik uygulamalara kadar geniş bir çalışma yelpazesi içerisinde önem kazanmaktadır. Mikrobiyom araştırmalarında kullanılan yöntemler genel olarak ikiye ayrılmıştır: konvansiyonel ve moleküler teknikler (3).

Kültür, mikroskop ve serolojik araştırmalar gibi yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar konvansiyonel teknikleri oluşturmaktadır. Moleküler filogenetik çalışmalar, herhangi bir çevresel örnekteki bakteriyel çeşitliliğin %1'inden azının laboratuvarda kültürlenebileceğini göstermiştir. Konvansiyonel tekniklerin en önemlilerinden biri olan kültür yöntemi ile yaşanacak olan bu çeşitlilik kaybı, mikrobiyal popülasyonların analizlerinde sorun yaratacaktır (4). Bu sorunu aşmak için yeni moleküler teknikler geliştirilmiştir. Bu yeni teknikler, 16S rRNA gen çoğaltılması, klonlama ve denatüre edici jel elektroforezi (DGGE) gibi yöntemleri içerir ve bir ortamda yaşayan tüm mikroorganizmaların tanımlanmasına yardımcı olabilecek metagenomik yaklaşımla biyolojik çeşitliliğin araştırılmasına olanak sağlar (5). Modern mikrobiyom çalışmaları genellikle bakteri ve arke suşlarının taksonomik olarak tanımlanması için 16S rRNA dizilerinin analizine dayanmaktadır. Bu tür analizler prokaryotik taksonomi için bir standart haline gelmiştir (6). Son yıllarda yeni metotlarla beraber kullanılan yüksek verimli DNA dizileme ve veri analizi teknolojilerindeki gelişmeler sayesinde mikrobiyom analizleri daha doğru ve detaylı gerçekleştirilmektedir (7). Yüksek verimli DNA dizileme ile birleştirilmiş 16S rRNA geninin çoğaltılması tekniği, mikrobiyal topluluklar üzerinde derin araştırmalara izin verir (8).

2.2. ÇEVRESEL DNA (EDNA), BARKODLAMA VE METABARKODLAMA

Konvansiyonel teknikler, tür çeşitliliği ve zenginliğinin araştırılmasında, taksonomik ve sübjektif tanımlama ile sınırlandırılmış olması, habitatların bozulmasına veya tahrip olmasına sebep olabilmesi, küçük veya zor türlerin tespit edilmesinin zor olduğu yöntemlere dayanması ve yalnızca kültürü yapılabilen mikroorganizmaları tespit edebilmesi sebebiyle günümüzde yerini moleküler tekniklere bırakmıştır. Belirli bir çevresel örnekten elde edilen DNA'nın doğrudan sekans analizi, konvansiyonel tekniklerdeki gibi seçim veya zenginleştirme içermediği ve teknik hataları en aza indirdiğinden dolayı o örneğin mikrobiyal topluluk yapısını değerlendirmek için en kullanışlı yöntemlerden biridir.

Çevresel DNA (eDNA), herhangi bir canlı organizmaya direkt ihtiyaç duymadan, çevresel örneklerden (toprak, hava veya su gibi) izole edilen, mukus, deri, dışkı veya biyofilm gibi organik atıklardan elde edilen DNA'yı ifade eder. eDNA, çoklu tür tespiti ve tür zenginliğini araştırmak için hızlı, ekonomik ve etkili bir yöntemdir. eDNA analizinin son derece ümit verici bir yanı, bu yöntem ile morfolojik olarak birbirine benzeyen türleri kolayca ayırt edilebilmesidir. Örneklemenin basitliği ve iyi kurulmuş bir laboratuvar iş akışı tutarlı sonuçlar sağlayabilir ve örnekleme faaliyetinin hedef tür popülasyonları veya habitatları üzerindeki etkilerini en aza indirebilir (9). Ayrıca mikrobiyal türlerin tespitinde rutin olarak kullanılır ve konvansiyonel kültür bazlı metotların güçlü bir tamamlayıcısıdır. Birçok çalışma eDNA'nın konvansiyonel yöntemlerden çok daha iyi bir biyo-izleme aracı olabileceğini göstermiştir (10). Genetik materyali çevresel ortamdan izole etmek ve tanımlamak, araştırmacılara, biyolojik çeşitliliğin, geleneksel yöntemlere kıyasla artan hız ve düşük maliyetle değerlendirmek için benzersiz bir fırsat sunar. Sağladığı bu avantajlar ile eDNA metodu, mikrobiyom analizi için kullanılabilecek en iyi yöntemlerden biri haline gelmiştir.

Elde edilen eDNA örneklerinden tür tespiti yapabilmek için barkodlama yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. DNA'nın çoğaltılması ve dizilenmesi için çekirdek ve organel DNA'ları üzerinde belirli bölgeler belirlenmiş ve 'DNA barkodlama' adı altında standartlaştırılmıştır. Literatürde en çok kullanılan ve standartlaşmış DNA barkod bölgeleri hayvanlar için mitokondriyal sitokrom c oksidaz I (COI) geni, bitkiler için ribuloz 1,5-bifosfat

karboksilaz (*rbcL*) ve maturaz K (*matK*) genleri, mantarlar için ITS geni ve mikroorganizmalar için 16S ribozomal RNA (rRNA) genidir (11). Mikrobiyom analizlerinde sıklıkla kullanılan 16S rRNA geni yaklaşık olarak 1500 baz çifti uzunluğundadır. Bu gen, genellikle bakteri ve arke türleri arasında çeşitlilik gösteren ve türlerin tanımlanmasında kullanılabilecek dokuz aşırı değişken bölge içerir (12). Yüksek oranda korunmuş bir bölge olan 16S rRNA geni çevresel mikrobiyoloji, moleküler evrim, mikroorganizma sınıflandırılması ve filogenetik analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. eDNA barkodlama yöntemi ile canlı grubuna özel olarak tasarlanmış primerler aracılığıyla çevresel DNA örneği içerisinde tek bir türe ait ilgili barkod bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılır ve qPCR, Sanger dizileme gibi yöntemler kullanılarak tür tespiti yapılır. Birden fazla türün tespiti ise daha kısa bölgeleri hedefleyen evrensel primerler aracılığıyla yapılır ve bu metot ‘eDNA metabarkodlama’ olarak isimlendirilir. Bu primerlerle kurulan polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan ve barkodlama yöntemine kıyasla daha kısa ve fazla sayıda olan DNA, yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak analiz edilir. Bu metot bir analizde filogenetik olarak geniş taksonların DNA dizileme verilerini elde etmemizi sağlar (9). Toplam biyoçeşitlilik ve topluluk kompozisyonunu değerlendirmek için kapsamlı ve etkili araçlar sunan eDNA metabarkodlamanın hız, örnek başına maliyet, taksonomik uzmanlığın kapsamı ve bağımsızlığı açısından geleneksel konvansiyonel temelli metotlara kıyasla büyük avantajları vardır (13).

2.3. YENİ NESİL DİZİLEME

Sanger ve Maxam-Gilbert dizileme metotları birinci nesil dizileme teknolojileridir ve bu metotlardan sonra geliştirilen her teknoloji yeni nesil dizileme başlığında toplanmıştır. 454 Roche, IonTorrent, Illumina gibi platformlar ikinci nesil; PacBio ve Oxford Nanopore platformları ise üçüncü nesil dizilemeyi oluşturmaktadır. Yeni nesil dizileme teknolojileri için sürekli olarak platform, reaktif ve protokol güncellemeleri yapılmaktadır ve böylece her geçen gün karmaşık toplulukların profillemesi süreci daha hızlı ve detaylı bir şekilde yapılmaktadır. Bu teknolojiler sayesinde in situ koşullarda toplulukların gen, transkript ve proteinlerinin ve bu topluluklarda bulunan canlıların birbiriyle olan etkileşimlerinin etkilerinin analizi doğrudan yapılmaktadır (14). Bunların yanı sıra yeni nesil dizileme teknolojileri, aynı anda milyonlarca okuma yapabildiği, çıktıları doğrudan algılanabildiği

ve ilk nesle kıyasla daha düşük maliyetli ve hızlı olduğu için 16S rRNA kullanılarak yapılan mikrobiyom metabarkodlama çalışmalarında en uygun yöntem haline gelmektedir. DNA metabarkodlama çalışmaları için seçilecek yeni nesil dizileme teknolojisi, barkod uzunluğu, kullanılan barkod sayısı ve analiz edilmesi gereken örnek sayısı gibi çeşitli parametrelere bağlıdır. Bu parametrelerin belirlenmesinin ve en uygun platformun seçilmesinin ardından ilgili barkodları içeren bir kütüphane oluşturulur. DNA barkodlarının kullanılacak olan platform ile uyumlu bir forma dönüştürülmesi, kütüphane oluşturmanın temel basamağıdır. Kütüphane, adaptör sekanslarının DNA sekanslarına enzimatik olarak bağlanması veya polimeraz zincir reaksiyonuyla ilave edilmesi ile oluşturulur. Seçilen platform tarafından belirlenen bu adaptörler, oluşturulan kütüphanenin çoğaltılması için gerekli spesifik dizilerden oluşur (15). Çoğu yeni nesil dizileme teknolojileri dizilenecek DNA barkod bölgelerini adaptörler aracılığıyla sağlam bir yüzeye veya desteğe tutturur veya sabitler. Böylece aynı anda binler ve milyarlar arasında değişen reaksiyon sayısı ile dizileme işlemi gerçekleşmiş olur (16). Bu aşamalar sonucunda evrensel primerler ile çoğaltılmış milyonlarca DNA parçasının dizilerini elde etmiş oluruz.

2.4. TERMAL KAYNAKLAR

Türkiye, tektonik olarak aktif olan Alp-Himalaya Kuşağı üzerinde yer alır. Yüksek sayıda genç fay hattı ve volkanik oluşumları beraberinde getiren bu tektonik aktivite Türkiye'deki jeotermal potansiyelin oluşumuna da sebep olmaktadır. Çıkış noktasındaki sıcaklık değeri 20°C'den yüksek olan sular termal kaynak olarak isimlendirilmiştir. Ülkemiz geneline yayılmış, farklı özelliklere (sıcaklık, debi, radyoaktivite, eriyik mineral oranları ve ulaşılabilirlik) ve sıcaklıklara sahip, doğal çıkışlı yaklaşık 1000 adet termal kaynak bulunmaktadır. Sayı ve niteliklerinden ötürü termal kaynak bakımından Türkiye Avrupa'da birinci; dünyada ise ilk beş ülke arasındadır. Ülkemizde bu kaynaklar genel olarak termal otel ve kaplıca şeklinde kullanıma açılmışken yüksek sıcaklığa sahip olanlar aynı zamanda ısınma ve enerji üretimi için de kullanılmaktadır. Termal kaynakların zengin bir mikrobiyal çeşitliliği desteklediği ve termofilik (>50°C) ve hipertermofilik (>80°C) gibi mikroorganizmalar için doğal niş oluşturan ekosistemler olduğu bildirilmiştir (17).

Termal kaynaklar fizikokimyasal (sıcaklık, ağır metal içeriği, pH vb. özellikler) yapılarından ötürü kültür ile simüle edilmesi zor ortamlardır. Bu sebeple termal kaynaklardaki mikrobiyal çeşitliliğin kapsamlı ve doğru tespiti konvansiyonel yöntemlerle

oldukça zordur. Bu çeşitliliğin tespiti özellikle biyoteknoloji alanında olası araştırma ve geliştirme potansiyelleri için önem arz etmektedir. Bu konudaki en bilindik örnek ise polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleşmesini sağlayan ve laboratuvar ortamında sıklıkla kullanılan *Taq* polimeraz enzimidir. Yellowstone Ulusal Parkı'nda bulunan termal kaynaklardan izole edilmiş (18) *Thermus aquaticus*'a ait olan ve yüksek sıcaklıklarda çalışabilen bu enzimin keşfiyle ekstrem koşullarda yapılan yaşam araştırmalarının sayısı ciddi oranda artmıştır. *Taq* polimerazın yanı sıra termofil canlılardan elde edilen amilaz, lipaz, proteaz gibi termostabil enzimler biyoteknoloji alanında ve endüstriyel süreçlerde geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Dünya üzerindeki en eski yaşam formlarının ekstrem koşullarda yaşamaya uyum sağlamış canlılar olduğu düşünüldüğünde, ekstrem koşullara sahip termal kaynaklar yaşamın kökeni ve erken evrimi hakkında bilgi sağlayabilir. Aynı zamanda yaşamın sürdürülebileceği sınırların tanımlanmasında da yardımcı olur (4). Bu sebeplerden ötürü termal kaynak mikrobiyomunun belirlenmesi büyük bir önem arz etmektedir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Dünya literatürü incelendiğinde, 20. yüzyılın başından beri termal kaynaklarda yaşayan mikroorganizmalar hakkında yapılan çalışmaların büyük bir kısmının konvansiyonel tekniklere (kültür, mikroskop gibi) dayandığı, klonlama ve tüm 16S rRNA dizileme gibi moleküler tekniklerle de desteklendiği görülmüştür. eDNA metabarkodlama yönteminin kullanıldığı çalışmalar ise yalnızca toprak bakteriyel toplulukların tespit edildiği veya sınırlı sıcaklıklara sahip su örneklerinde yapılmış çalışmalar ile kısıtlıdır. Siyanobakteri ve algler gibi belirli gruplar üzerine yapılmış araştırmalar ve belirli türlerden kültür ve klonlama teknikleriyle enzim eldesi gibi sınırlı çalışmalar Türkiye'nin termal kaynakları hakkında yapılmış biyolojik araştırmaların büyük bir kısmını oluşturmaktadır.

Türkiye'de eDNA metabarkodlama yöntemi kullanılarak termal kaynak mikrobiyom tespitinin yapıldığı ilk çalışma olan bu tez ile birden fazla zorlu koşulu birlikte barındıran ve birçok mikroorganizmanın habitatı olan bu kaynakların biyolojik çeşitliliğinin ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır. Çalışma sürecince dünya literatüründe bu alanda kullanılan mevcut filtrasyon, eDNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu protokolleri geliştirilecek, bu çalışmalar sonucu elde edilecek dizi verilerinin analizinde kullanılması amacıyla yeni biyoinformatik iş akışları ve benzer metabarkodlama çalışmalarında kullanılmak üzere referans veri tabanı oluşturulacaktır. Her arazi çalışmasında farklılık gösteren fizikokimyasal yapının mikrobiyoma yansması ortaya konacaktır. Elde edilecek sonuçlarla ortaya çıkarılacak olan mikrobiyom içeriği ile biyoteknoloji alanında kullanılmak üzere yeni türlerin, enzimlerin, proteinlerin ve metabolik fonksiyonların belirlenmesine yönelik bir ön çalışma gerçekleştirilecek olması bu tez çalışmasını birçok alanda önemli kılmaktadır.

4. MATERİYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERİYAL

Arazi ve laboratuvarında kullanılan materyallerin listesi Çizelge 4.1.de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Arazi ve laboratuvar materyalleri

Arazi	Laboratuvar
Kuru buz	Sterivex filtre (0.22 µm por çaplı)
Steril 2 litrelik şişeler	Giriş-çıkış kapakları
Defter	Longmire koruma solüsyonu
Kalem	Peristaltik pompa
Makas	Steril hortum
Kuru buzdan koruyucu materyal	Bağlantı aparatı
Sıcak ve soğuk eldiveni	Cam termometre
Cam termometre	Distile su
Nitril eldiven	Parafilm
Sıcağa dayanıklı plastik beher	Nitril eldiven
	Beher
	Pipet ve pipet ucu (10, 100 ve 1000 µL)
	0.2 mL tüp

4.2. YÖNTEM

4.2.1. ARAZİ ÇALIŞMASI

Tez arazi çalışması Kasım 2019 tarihinde Nevşehir-Kozaklı bölgesinde başlamış olup Mart 2021'e kadar sırasıyla Ankara-Kızılcahamam, Yozgat-Boğazlıyan ve Muğla-Dalaman'da gerçekleştirilmiştir. Nevşehir, Yozgat ve Muğla arazilerinde ikişer litrelik steril şişelerde 3 şişe halinde toplam 6 litre; Ankara arazisinden 4 şişe halinde 8 litre su örneği alınmıştır. Her arazi öncesinde laboratuvarıda hazırlanan UV'ye maruz bırakılmış 2 litre saf su negatif örnek olarak kullanılmış olup peristaltik pompa, bu pompaya uyumlu steril hortum ve bağlantı aparatları kullanılarak 0.22 µm porlara sahip kapalı sistem sterivex filtrelerden geçirilmiştir. Ardından aynı ekipman kullanılarak arazilerden getirilen su örnekleri aynı şekilde filtre edilmiştir.



Şekil 4.1. Nevşehir-Kozaklı örnekleme alanı



Şekil 4.2. Ankara-Kızılcahamam örnekleme alanı



Şekil 4.3. Yozgat-Boğazlıyan örnekleme alanı



Şekil 4.4. Muğla-Dalaman örnekleme alanı, 1



Şekil 4.5. Muğla-Dalaman örnekleme alanı, 2

Aşağıda verilen arazi protokolü uygulandı;

- Sıcak eldiveni kullanılarak su örneği steril şişelere alınır, suyun şişenin ağzına teması mümkün oldukça engellenir.
- Sıcağa dayanıklı plastik behere alınan su örneğinin sıcaklığı cam termometre ile ölçülür ve kaydedilir.
- Şişelerin ağzı kapatılır, parafilmleir ve kuru buz içeren kutunun içerisine arada yalıtım malzemesi olacak şekilde yerleştirilir ve laboratuvara getirilir.

Arazi örnek bilgi çizelgesi Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Arazi örnek bilgileri

Örnek numarası	Örnek açıklaması
3668	Nevşehir-Kozaklı Negatif longmire
3669	Nevşehir-Kozaklı Negatif sterivex Filtre
3670	Nevşehir-Kozaklı 1. filtre longmire
3671	Nevşehir-Kozaklı 1. filtre sterivex
3672	Nevşehir-Kozaklı 2. filtre longmire
3673	Nevşehir-Kozaklı 2. filtre sterivex
4232	Ankara-Kızılcahamam negatif sterivex filtre
4233	Ankara-Kızılcahamam 2 mL liziz solüsyonlu sterivex filtre
4234	Nevşehir-Kozaklı longmiresız sterivex filtre
4235	Ankara-Kızılcahamam 1. filtre sterivex
4236	Ankara-Kızılcahamam 2. filtre sterivex
4237	Ankara-Kızılcahamam 3. filtre sterivex
4242	Yozgat-Boğazlıyan negatif sterivex filtre
4243	Yozgat-Boğazlıyan 1. filtre sterivex
4244	Yozgat-Boğazlıyan 2. filtre sterivex
4245	Yozgat-Boğazlıyan 3. filtre sterivex
4297	Muğla-Dalaman negatif sterivex filtre
4298	Muğla-Dalaman 1. filtre sterivex
4299	Muğla-Dalaman 2. filtre sterivex
4300	Muğla-Dalaman 3. filtre sterivex

4.2.2. LABORATUVAR ÇALIŞMASI

4.2.2.1. Longmire Koruma Solüsyonunun Hazırlanması

Filtre içerisinde bulunan DNA'nın uzun süre korunması amacıyla Longmire solüsyonu hazırlanmış ve her sterivex filtrenin içerisine 2 ml aktarılmıştır.

1 litre Longmire DNA koruma solüsyonu hazırlamak için gerekli kimyasallar Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Longmire solüsyonu hazırlamak için gerekli malzemeler ve miktarları

Kimyasal adı	Kimyasal miktarı
2M Tris-HCl, pH 8.0	50 mL
0.5 M EDTA, pH 8.0	200 mL
5 M NaCl	2 mL
%20'lik SDS	25 mL

Kimyasallar 1000 mL'lik mezüre aktarıldıktan sonra 1 litreye kadar saf su ile tamamlanır. Daha sonra hazırlanan karışım cam şişeye alınır.

Yalnızca Nevşehir-Kozaklı arazisine ait negatif örnekle beraber toplamda 3 filtreye 2 mL Longmire koruma solüsyonu eklenmiştir. İzolasyon aşamasında Longmire eklenmiş örneklerin izolasyonu hem bu koruma solüsyonu hem de filtreden yapılmıştır.

4.2.2.2. eDNA Örneklemesi

Aşağıdaki verilen eDNA örnekleme protokolü uygulandı;

1. Laboratuvara getirilen örneklerin sıcaklığı cam termometre ile tekrar ölçülür, 45°C'nin altına inmesi beklenir.
2. Doku odasına filtrasyon için peristaltik pompa, steril hortum, bağlantı aparatı, 0.22 µm Sterivex filtreler, giriş ve çıkış kapakları, pipet, pipet ucu, distile su (negatif örnek için), koruma solüsyonu, beher (filtre edilen su miktarını ölçmek için) getirilir.
3. Önce negatif örneğin daha sonra aynı malzemelerle asıl örneklerin filtrasyonu yapılır;

4. Hortumun bir ucu su şişesine diğer ucu ise Sterivex filtrenin giriş kısmına yerleştirilir.
5. Her bir filtre için eşit miktarda su filtrelendikten sonra filtre içerisinde kalan su peristaltik pompa aracılığıyla boşaltılır ve çıkış kapağı kapatılır.
6. Hortum çıkarılır, 1000 uL pipet ile koruma solüsyonu çekilir.
7. Filtrenin girişine pipet ucu sokularak eğilir ve koruma solüsyonu eklenir (filtre hacmi 2000 uL olduğu için tekrarlanır).
8. Filtre girişi kapatılır.
9. Filtrenin dışı dna decon veya lab cleanerla temizlenir ve kurulanır.
10. Filtre parafilmelenir ve kilitli poşete yerleştirilir.
11. Longmire eklenmiş örnekler -30°C'ye konur, eklenmemiş olanların izolasyonuna beklemeden başlanır.

4.2.2.3. eDNA İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan eDNA izolasyon protokolü, Spens vd. (2016) tarafından DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN, Stockach, Germany) kullanılarak uygulanan protokolden geliştirilmiştir. Longmire eklenen örneklerin izolasyonu hem Longmire koruma solüsyonu hem de sterivex filtreden yapılmıştır.

Longmire'dan izolasyon;

1. Longmire'in aktarımı için filtrenin inlet kısmı steril 5ml'lik tüpün içerisine geçirilip parafilmelenir ve 50 ml'lik falkon içerisine yerleştirilir. 2000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir.
2. 5 mL'lik tüplere alınan koruma solüsyonu 6000xg (8000 rpm)'de 45 dakika santrifüjlenir. Ardından sıvı faz dökülür ve çökelti kurumaya bırakılır.
3. Her örnek için 180 µL ATL tamponu ve 20 µL proteinaz K karışımı hazırlanır. Hazırlanan karışım çökeltiye eklenir ve 15 saniye vortekslenir.
4. Örnekler döner halde, 56 °C'de 24 saat inkübe edilir.

5. Örnekler 15 saniye vortekslenir.

Bundan sonraki basamaklar sterivex filtrelerinden izolasyon protokolünün 8. basamağından itibaren ortaktır.

Sterivex filtrelerinden izolasyon;

1. DNA kaybını ve kontaminasyonu engellemek için filtre kapsül içerisinde kalacaktır. Giriş ve çıkış kapakları çıkarılır, filtreler giriş kısmı aşağıda olacak şekilde kuruması için çeker ocağı konur. Damlayan su için örneklerin altına peçete yerleştirilir.

2. Her örnek için, 450 uL ATL tampon, 50 uL proteinaz K ve 1500 uL saf sudan oluşan liziz solüsyonu hazırlanır.

3. Çıkış kapağı kapatılır. 1000 uL steril pipet ucuyla filtrenin dışı ve kapsül duvarının arasına gelecek şekilde liziz solüsyonu eklenir. Giriş kapağı kapatılır ve parafilmelenir. Birkaç saniye güçlü bir şekilde çalkalanır.

4. Örnekler döner halde 56°C'de 24 saat boyunca inkübe edilir.

5. Kapsüller beş kez güçlü bir şekilde çalkalanır.

6. Sterivex filtre kapsülündeki solüsyonu aktarmak için filtrenin giriş kısmı 5 mL steril tüpe geçirilir, sıkıca parafilmelenir ve 50 mL falkona yerleştirilir. 5.500xg (4.200 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.

7. Örnekler birkaç saniye vortekslenir.

8. 200 uL AL tampon eklenir ve 56°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilir.

9. Örnekle aynı hacimde %99 soğuk etanol eklenir.

10. Örnekler güçlü bir şekilde çalkalanır.

11. Bir defada en fazla 650 uL alınır ve 2 mL DNeasy Mini Spin Column'a aktarılır.

12. 4°C ve 6.000xg (8.000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.

13. Sıvı faz atılır.

14. 10-12. basamaklar tüm hacim filtrelene kadar tekrar edilir.

15. DNeasy spin columnlar yeni 2 mL tüpe aktarılır, 500 uL AW1 yıkama tamponu eklenir, 6.000xg (8.000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir. Sıvı faz atılır.

16. DNeasy spin columnlar yeni tüpe aktarılır, 500 uL AW2 yıkama tamponu eklenir, 20.000xg (14.000 rpm)'de 3 dakika boyunca santrifüjlenir. Sıvı faz atılır. DNeasy spin columnlar tüpe aktarılır ve 17.000xg (13.000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.

17. DNeasy spin columnlar kapakları çıkarılmış yeni 1.5 ya da 2 mL tüplere aktarılır.

18. Spin columnlara 50 uL AE tamponu eklenir.

19. Örnekler 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir.

20. Örnekler 6.000xg (8.000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.

21. Spin columnlar atılır.

22. DNA önceden işaretlenmiş kapaklı tüplere aktarılır ve -30°C'de saklanır.

Elde edilen DNA izolatlarının DNA miktar ve kaliteleri Colibri Microvolume Spektrometre cihazları ile ölçülmüştür.

4.2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak reaktif karışımı için enzim, primer, uygun sıcaklık, döngü sayısı ve örnek dilüsyon optimizasyonları önce pozitif kontroller ardından asıl örnekler ile gerçekleştirildi. eDNA izolasyonu yapılan kalıp DNA'lar bakteri ve arkeler için evrensel metabarkodlama primerleri kullanılarak pqr ile çoğaltıldı. Belirtilen şartlarda ve pozitif ve negatif kontrol kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlar sonrasında çoğaltılan pqr ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenerek 120 voltta 45 dakika yürütüldü. Ardından UV görüntüleme sisteminde uygun bant boyu ve negatif kontrol bakımından değerlendirilerek kütüphane işlemi öncesinde pozitif kontrol sağlandı.

4.2.2.5. DNA Kütüphanesinin Hazırlanması

Kütüphane hazırlığının tamamlanması için önce tüm örneklerin indeksli primerlerle polimeraz zincir reaksiyonu kuruldu. Daha sonra üretici firmanın kit yönergeleri takip edilerek kütüphane oluşturuldu. Oluşturulan kütüphane Illumina NextSeq 550 cihazı ile örnek başı 100.000 okuma ile dizilenmiştir.

4.2.2.5.1. İndeks PZR

4.2.2.4'te elde edilen en uygun enzim, sıcaklık ve örnek dilüsyon sonuçlarına göre yine aynı basamakta belirlenen primerlere Illumina NextSeq 550 yeni nesil dizileme platformuna uygun adaptör dizileri eklenmiş ve indeksli polimeraz zincir reaksiyonu kurulmuştur. Çoğaltılan pzs ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenerek 120 voltta 45 dakika yürütülüp UV görüntüleme sistemiyle uygun bant boyu ve negatif kontrol bakımından kontrol edilmiştir. Aynı arazi çalışmasına ait pzs ürünleri birleştirildikten sonra Qubit™ 3.0 Florometre ile kalite ve miktarları ölçülmüştür.

4.2.2.5.2. Kütüphane Basamağı

Kütüphane oluşturma basamağında Illumina Nextera DNA Prep Library Prep Kit kullanılmıştır. Öncelikle indekli pzs sonrasında elde edilen ürünlerin temizliği 'AMPure XP Beads' ile üretici firma protokolüne uygun bir şekilde tamamlanmıştır. Daha sonra indeks dizileri ile Illumina dizileme adaptörlerini birleştirmek için kit içerisinde bulunan uygun enzim ve primerlerle polimeraz zincir reaksiyonu kurulmuştur. Bu aşamada elde edilen pzs ürünleri tekrar AMPure XP Beads kullanılarak temizlenmiş ve kütüphane oluşturmaya uygun hale getirilmiştir. Kütüphane validasyonunun yapılması için 1:50 dilüe edilmiş kütüphane örneklerinden 1 µL alınarak Bioanalyzer DNA 1000 çipi aracılığıyla ürün boyu kontrol edilmiştir. Bu ölçümden elde edilen sonuç kullanılarak aşağıdaki formül ile DNA konsantrasyonu hesaplanmıştır;

$$DNA\ konsantrasyonu\ (nM) = \frac{Konsantrasyon\ \left(\frac{ng}{\mu L}\right)}{660\ \frac{g}{mol}} * ortalama\ kütüphane\ boyu * 10^6$$

Kütüphane, resüpsansiyon solüsyonu ile DNA konsantrasyonu 4 nM olacak şekilde dilüe edilmiştir. Dilüe edilen kütüphane 0.2 N NaOH solüsyonu ile denatüre edilip,

hibridizasyon solüsyonu ile tekrar dilüe edildikten sonra sıcaklık denatürasyonu yapılmıştır (19). Kütüphane oluşturma aşaması bittikten sonra örnekler Illumina NextSeq 550 cihazına 2x150 okuma uzunluğu ile yüklenmiştir.

4.2.3. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER

Biyoinformatik analizler Linux/Unix tabanlı işletim sisteminin terminali aracılığıyla tamamlanmıştır. Illumina NextSeq 550 cihazından çıkan ve “.fastq” formatıyla elde edilen ileri ve geri okumalı dizilerin kalite kontrolleri FASTQC programıyla kontrol edilmiştir. 16sV3F-R ve 515F-806R primerleri ile çoğaltılan dizilerin analizi iki ayrı koldan yürütülmüştür.

16sV3F-R primerleri ile çoğaltılan ileri ve geri dizilerin analizi için oluşturulan iş akışı;

1. “illumina-paired-end” kodu ile kalitesi 30’dan büyük olacak şekilde hizalanıp ve birleştirilmiştir.
2. Obigrep komutu ile 1. aşamada birleştirilemeyen okumalar filtrelenmiştir.
3. Tagcleaner programı ile her iki uçtaki ileri ve geri yönlü primerler maksimum 3 yanlış eşleşmeye izin verilerek çıkarılmıştır.
4. Obiuniq komutu ile tekrar eden veriler temizlenmiştir.
5. Obiannotate komutu ile her örnek başlığından bulunan gereksiz veriler temizlenmiştir.

515F-806R primerleri ile çoğaltılan ileri ve geri dizilerinin analizi birbirinden ayrı olarak yapılmış olup akış şeması aşağıdaki gibidir;

1. Trimmomatic programı kullanılarak dizilerin kalitesi 30’dan büyük olacak şekilde filtrelenmiştir (20).
2. Tagcleaner programı ile her iki uçtaki ileri ve geri yönlü primerler maksimum 3 yanlış eşleşmeye izin verilerek çıkarılmıştır.
3. Obiuniq komutu ile tekrar eden veriler temizlenmiştir.
4. Obiannotate komutu ile her örnek başlığından bulunan gereksiz veriler temizlenmiştir.

Bu iş akışı sonucu elde edilen tüm dizi verilerinde ‘uniq’ ifadesi kullanılmıştır. Bu basamaktan sonra 3 farklı filtre uygulanmıştır. İlk filtrelemede uniq dizilerin okunma tekrarı 10’dan fazla olanları kaydedilmiş ve bunlar için ‘c10’ kısaltması kullanılmıştır. İkinci filtrelemede ilk filtreleme sonrası elde edilen uniq diziler, pqr ve dizileme hatalarından temizlenmiş ve ‘uniq.clean’ olarak kaydedilmiştir. Son filtrelemede ise ilk filtreleme sonucu elde edilen ‘c10’ dizilerinden pqr ve dizileme hatalarından temizlenerek ‘c10.clean’ dizileri elde edilmiştir. Her bir primer ve arazi örneği için uniq, c10, uniq.clean ve c10.clean olmak üzere 4 farklı veri elde edilmiş olup aynı primer ve aynı filtreleme basamaklarından geçen veriler çevrimiçi analiz sistemi olan ‘SILVAngs’e yüklenmiştir. 16sV3F-R primerleri ile çoğaltılıp analizi tamamlanan örneklerin ismi ‘16sV3-arazi adı’ şeklinde ifade edilirken, 515F-806R primerleri ile çoğaltılan ve ileri-geri okumaları ayrı analiz edilen örneklerin isimleri ‘515-okuma yönü-arazi adı’ olarak belirtilmiştir. SILVAngs sistemine yüklenen dizileme dosyaları sırasıyla hizalama, kalite kontrolü, tekrarlı dizilerin temizlenmesi, %98’den fazla benzerlik gösteren dizilerin gruplandırılması ve BLASTN veri tabanı ile eşleştirilmesi basamaklarından geçerek dizileme verilerine ait özet sonuç dosyaları ve Krona pasta grafikleri oluşturulmuştur.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. SU ÖRNEKLERİNİN FİZİKOKİMYASAL ANALİZİ

Arazi çalışmalarında alınan su örneklerinin fizikokimyasal analizi Maden Tetkik Arama, Halk Sağlığı gibi kurumlarda daha önceden yapılmış olup, elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Çizelge 5.1. Nevşehir-Kozaklı termal kaynak fizikokimyasal analiz sonucu

Parametre	Ölçüm değeri
Sıcaklık	89.1°C
pH	7.5
Bikarbonat	555.1 mg/L
Klorür	730 mg/L
Florür	3.35 mg/L
Sülfat	587 mg/L
Nitrat	13.7 mg/L
Silikat asidi	72.1 mg/L
Arsenik	0.226 mg/L

Çizelge 5.2. Ankara-Kızılcahamam termal kaynak fizikokimyasal analiz sonucu

Parametre	Ölçüm değeri
Sıcaklık	86°C
pH	7.2
Bikarbonat	1586 mg/L
Klorür	229.14 mg/L
Florür	1.57 mg/L
Sülfat	100.78 mg/L
Nitrat	8.44 mg/L
Silikat asidi	69 mg/L
Borik asit	38.22 mg/L

Çizelge 5.3. Yozgat-Boğazlıyan termal kaynak fizikokimyasal analiz sonucu

Parametre	Ölçüm değeri
Sıcaklık	52°C
pH	6.25
Bikarbonat	852 mg/L
Klorür	1180 mg/L
Florür	1.98 mg/L
Silikat asidi	51.3 mg/L
Sodyum	667 mg/L
Kalsiyum	276 mg/L

Çizelge 5.4. Muğla-Dalaman termal kaynak fizikokimyasal analiz sonucu

Parametre	Ölçüm değeri
Sıcaklık	26.9°C
pH	6.54
Bikarbonat	857 mg/L
Sülfat	1014 mg/L
Klorür	8463 mg/L
Silikat asidi	16 mg/L
Sodyum	4092 mg/L
Arsenik	0.22 mg/L

Fizikokimyasal analiz sonuçlarına göre Nevşehir ve Kızılcahamam termal kaynaklarının çok sıcak, Yozgat'ın sıcak ve Dalaman'ın ise düşük sıcaklığa sahip olduğu; sıcaklık faktörünün yanı sıra bikarbonat, sülfat, nitrat gibi parametreler bakımından da bu kaynakların ekstrem ortam oluşturduğu görülmüştür.

5.2. MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI

5.2.1. SPEKTROFOTOMETRE SONUÇLARI

4.2.2.3.'te belirtilen şekilde yapılan DNA izolasyonunun ardından Colibri Microvolume Spektrometre cihazı ile spektrofotometrik ölçümler tamamlanmıştır. Her bir araziye ait ölçüm sonuçları Çizelge 5.1.'den 5.4.'e kadar gösterilmiştir.

Çizelge 5.5. Nevşehir-Kozaklı örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri

Sample no	3668	3668	3669	3669	3670	3670	3671	3671
Konsantrasyon	2.483	2.312	1.893	1.838	0.205	0.200	0.742	0.744
A260/A280	1.553	1.724	1.923	1.248	1.253	1.254	1.248	1.250
A260/A230	1.754	1.763	2.416	4.279	0.795	0.799	0.793	0.791
Sample no	3672	3672	3672	3673	3673	3673	4234	4234
Konsantrasyon	-0.755	-0.176	-0.563	-0.694	-0.582	-0.424	0.219	0.238
A260/A280	0.967	1.500	0.630	0.712	1.419	0.863	1.165	1.179
A260/A230	0.982	0.127	0.335	0.083	0.066	0.045	0.983	0.993

Çizelge 5.6. Ankara-Kızılcahamam örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri

Sample no	4232	4232	4233	4233	4235	4235	4236	4236	4237	4237
Konsantrasyon	1.681	1.926	117.380	116.856	94.829	95.126	109.318	109.097	74.264	73.989
A260/A280	1.212	1.355	1.340	1.347	1.355	1.343	1.355	1.359	1.358	1.353
A260/A230	0.595	0.568	0.703	0.702	0.727	0.728	0.727	0.728	0.713	0.720

Çizelge 5.7. Yozgat-Boğazlıyan örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri

Sample no	4242	4242	4243	4243	4244	4244	4245	4245
Konsantrasyon	0.845	0.794	445.926	444.701	484.956	485.360	321.704	320.432
A260/A280	1.348	4.479	1.400	1.393	1.394	1.393	1.403	1.401
A260/A230	0.923	0.836	0.850	0.849	0.864	0.867	0.798	0.796

Çizelge 5.8. Muğla-Dalaman örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri

Sample no	4297	4297	4298	4298	4299	4299	4300	4300
Konsantrasyon	4.449	3.643	17.937	18.364	17.614	16.937	30.356	32.453
A260/A280	1.972	1.992	1.982	2.028	1.986	2.011	1.953	2.012
A260/A230	1.049	1.066	2.357	2.185	2.130	2.315	2.047	1.679

5.2.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU SONUÇLARI

1:10 ve 1:20 dilüe edilmiş bakteri ve arke pozitif kontrol DNA'ları kullanılarak Çizelge 5.9.'da verilen primerlerin enzim ve sıcaklık optimizasyonları yapılmıştır. Rutin laboratuvar çalışmalarında 515F-806R ve 16sV3F-R primerleri 53°C; 341F-785R primeri 48°C'de Promega GoTaq Flexi marka enzimle kullanıldığından dolayı bu primerler için enzim ve sıcaklık optimizasyonu yapılmamıştır.

Çizelge 5.9. Primer tablosu

Primer adı	Primer dizisi	Hedef organizma	Gen bölgesi	Referans
SSU1ArF (459)	TCCGGTTGATCCYGCBRG	Arke	V1-V2	(21)
SSU520R (460)	GCTACGRRYGYTTTARRC	Arke	V1-V2	(21)
Pro341F (461)	CCTACGGGNBGCASCAG	Prokaryot	V3-V4	(22)
Pro805R (462)	GACTACNVGGGTATCTAATCC	Prokaryot	V3-V4	(22)
S-D-Arch-0519-a-S-15 (463)	CAGCMGCCGCGGTAA	Arke	V4-V6	(23)
S-D-Arch-1041-a-A-18 (464)	GGCCATGCACCWCCTCTC	Arke	V4-V6	(23)
S-D-Arch-0349-a-S-17 (465)	GYGCASCAGKCGMGA AW	Arke	V3-V4	(23)
S-D-Arch-0786-a-A-20 (466)	GGACTACVSGGTATCTAAT	Arke	V3-V4	(23)
515F-Y	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	Bakteri	V4	(24)
806R-B	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	Bakteri	V4	(25)
16sV3F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	Bakteri	V3	(26)
16sV3R	ACCGCGGCTGCTGGCAC	Bakteri	V3	(26)
341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	Bakteri	V3-V4	(22)
785R	GACTACHVGGGTATCTAATCC	Bakteri	V3-V4	(22)

Enzim optimizasyonunda 2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix, 5x Firepol Master Mix, Ampliqon Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red, Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, ve Promega GoTaq Flexi kullanılmıştır. Sırasıyla her bir enzimin reaktif protokolü ve reaksiyon profili Çizelge 5.10.'dan Çizelge 5.19.'a kadar gösterilmiştir.

Çizelge 5.10. 2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix reaktif protokolü

Mix	5 µl
Primerler	0.6 µl
Su	3.4 µl
DNA	1 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 5.11. 2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix reaksiyon profili

Ön Denatürasyon	98°C	3 dk	
Denatürasyon	98°C	20 sn	35 döngü
Primer Bağlanması	48-60°C	15 sn	
Sentez	72°C	15 sn	
Son Sentez	72°C	1 dk	
Bekleme	4°C	∞	

Çizelge 5.12. 5x Firepol Master Mix reaktif protokolü

Mix	2 µl
Primerler	0.2 µl
Su	7.3 µl
DNA	0.5 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 5.13. 5x Firepol Master Mix reaksiyon profili

Ön Denatürasyon	95°C	5 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	30 döngü
Primer Bağlanması	48-60°C	45 sn	
Sentez	72°C	2 dk	
Son Sentez	72°C	10 dk	
Bekleme	4°C	∞	

Çizelge 5.14. Ampliqon Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red reaktif protokolü

Mix	5 µl
Primerler	0.8 µl
Su	3.7 µl
DNA	0.5 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 5.15. Ampliqon Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red reaksiyon profili

Ön Denatürasyon	95°C	3 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	30 döngü
Primer Bağlanması	48-60°C	30 sn	
Sentez	72°C	30 sn	
Son Sentez	72°C	5 dk	
Bekleme	4°C	∞	

Çizelge 5.16. Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix reaktif protokolü

Mix	5 µl
Primerler	1 µl
Su	3 µl
DNA	1 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 5.17. Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix reaksiyon profili

Ön Denatürasyon	98°C	30 sn	
Denatürasyon	98°C	5 sn	30 döngü
Primer Bağlanması	48-60°C	10 sn	
Sentez	72°C	20 sn	
Son Sentez	72°C	2 dk	
Bekleme	4°C	∞	

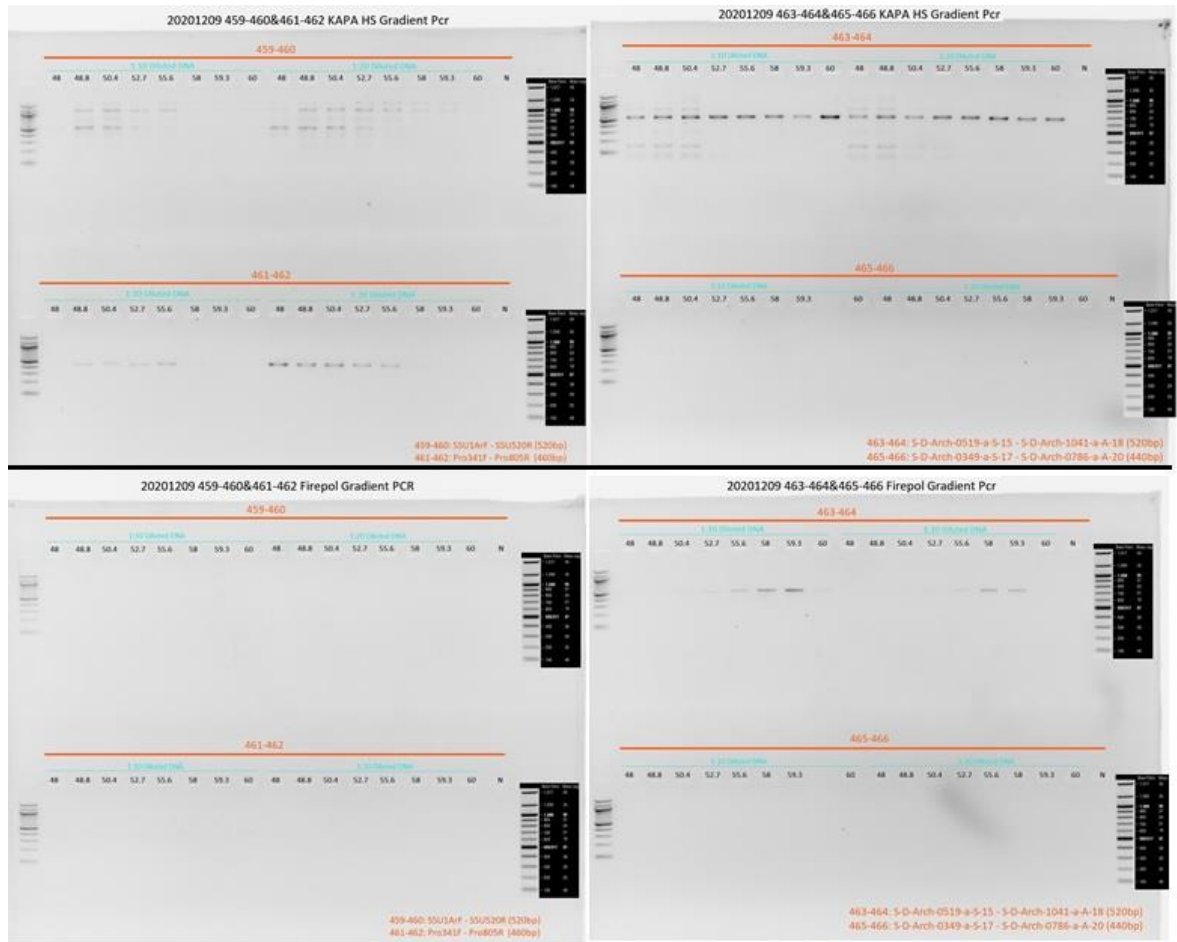
Çizelge 5.18. Promega GoTaq Flexi reaktif protokolü

5X Buffer	2 µl
MgCL2	1 µl
dNTP	0.8 µl
Primerler	1 µl
Polimeraz	0.1 µl
Su	4.6 µl
DNA	0.5 µl
Toplam	10 µl

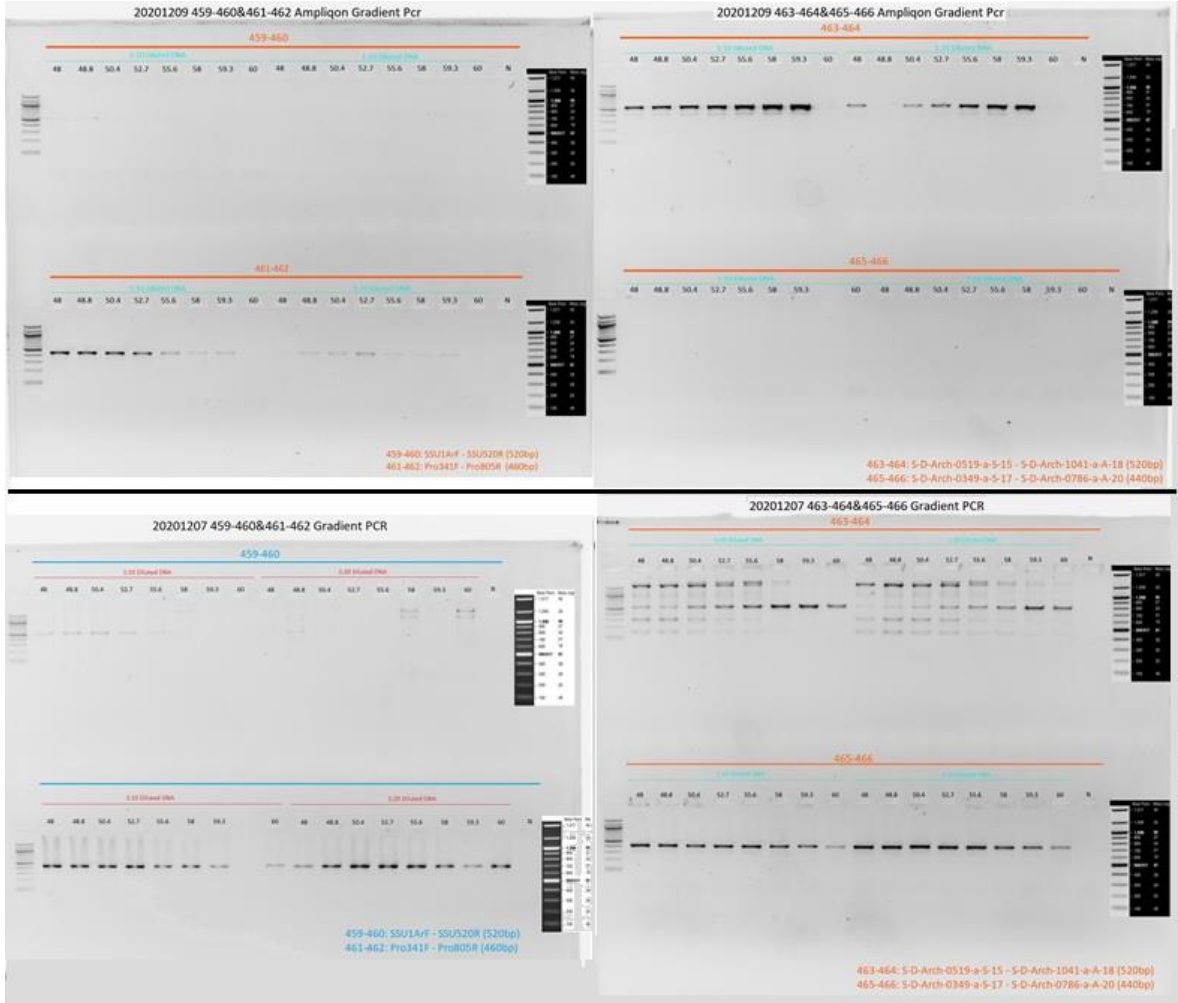
Çizelge 5.19. Promega GoTaq Flexi reaksiyon profili

Ön Denatürasyon	94 °C	2 dk	
Denatürasyon	94 °C	1 dk	30 döngü
Primer Bağlanması	48-60 °C	45 sn	
Sentez	72 °C	1 dk	
Son Sentez	72 °C	5 dk	
Bekleme	8°C	∞	

Sıcaklık optimizasyonu 48-60°C arasında yapılmış olup, elde edilen pzc ürünleri %2'lik agaroz jelde 120 voltta 45 dakika boyunca yürütülmüştür. Her bir enzimin jel görüntüsü sonuçları Şekil 5.1.'den Şekil 5.3.'e kadar gösterilmiştir.



Şekil 5.1. 2X KAPA HiFi HotStart Ready Mix ve 5x Firepol Master Mix Gradient PZR Jel Görüntüsü, N: Negatif kontrol

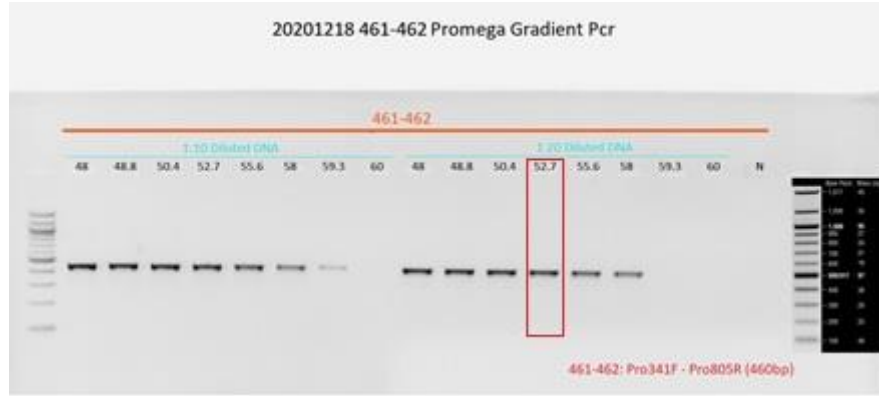


Şekil 5.2. Ampliqon Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red ve Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix Gradient PZR Jel Görüntüsü, N: Negatif kontrol



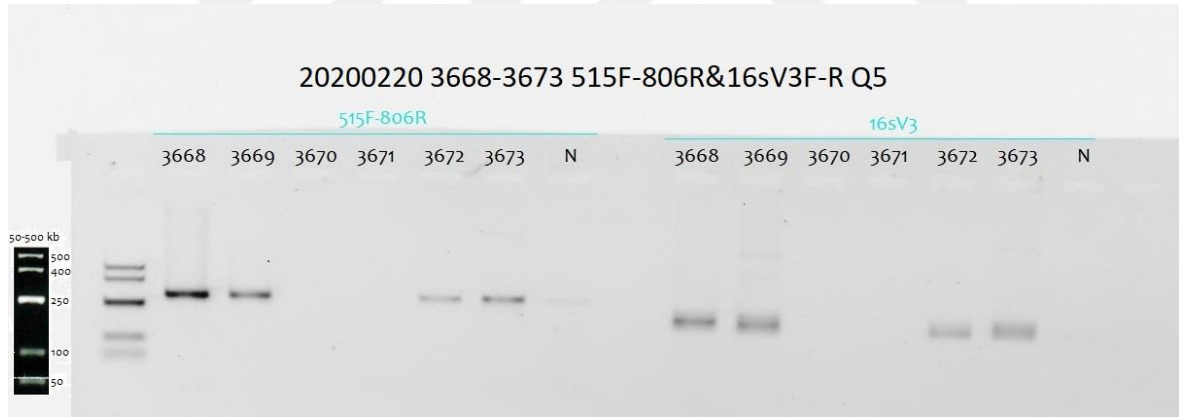
Şekil 5.3. Promega GoTaq Flexi Gradient PZR Jel Görüntüsü, N: Negatif kontrol, seçilen sıcaklıklar kırmızı çerçeve ile belirtilmiştir.

461-462 numaralarıyla ifade edilen Pro341F-Pro805R primerleri ve Promega GoTaq Flexi ile kurulan gradient pcr tekrarlanmış olup jel görüntüsü Şekil 5.4.'te gösterilmiştir.



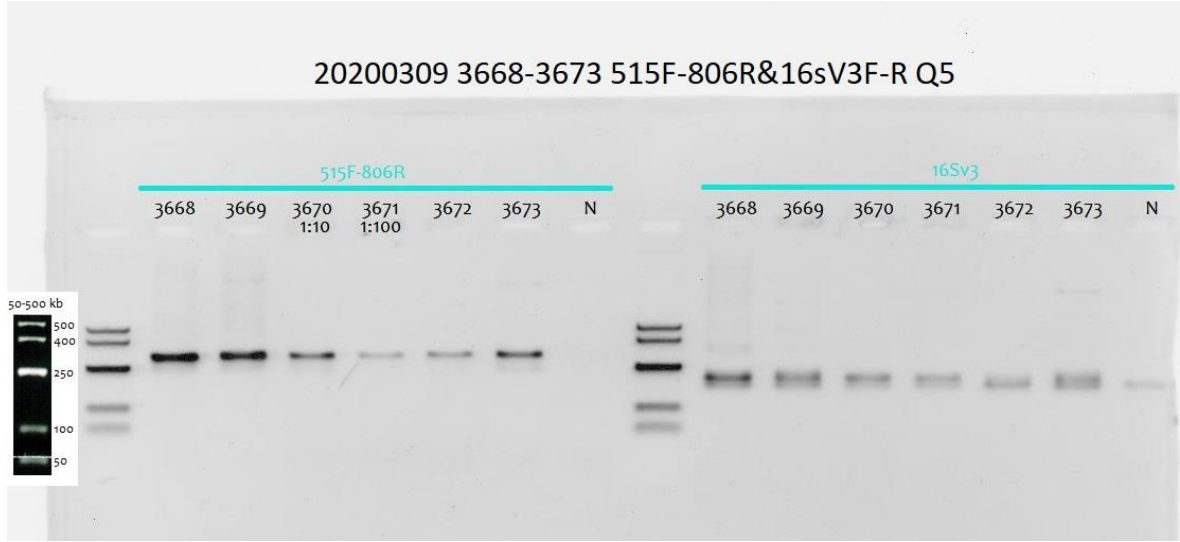
Şekil 5.4. Pro341F-Pro805R (461-462) Primeri Promega GoTaq Flexi Gradient PZR Jel Görüntüsü, N: Negatif kontrol, seçilen sıcaklıklar kırmızı çerçeve ile belirtilmiştir.

3668-3673 numaralı Nevşehir örneklerinin polimeraz zincir reaksiyonları, laboratuvarında bulunan Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix ile optimize edilmiş 515F-806R ve 16sV3F-R primerleri ile kuruldu. Reaksiyon sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 5.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 5.5. 3668-3673 numaralı örneklerin 515F-806R ve 16sV3F-R primerleri ve Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix ile kurulmuş pcr sonucu. N: negatif kontrol.

Çıkmayan 3670 ve 3671 örnekleri için farklı dilüsyonlar denendi. Aynı şartlar altında kurulan pcr sonucu Şekil 5.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 5.6. 3668-3673 numaralı örneklerin 515F-806R ve 16sV3F-R primerleri ve Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix ile kurulmuş pcr sonucu. 3670 numaralı örnek 1:10, 3671 numaralı örnek 1:100 dilüe edilmiştir. N: negatif kontrol.

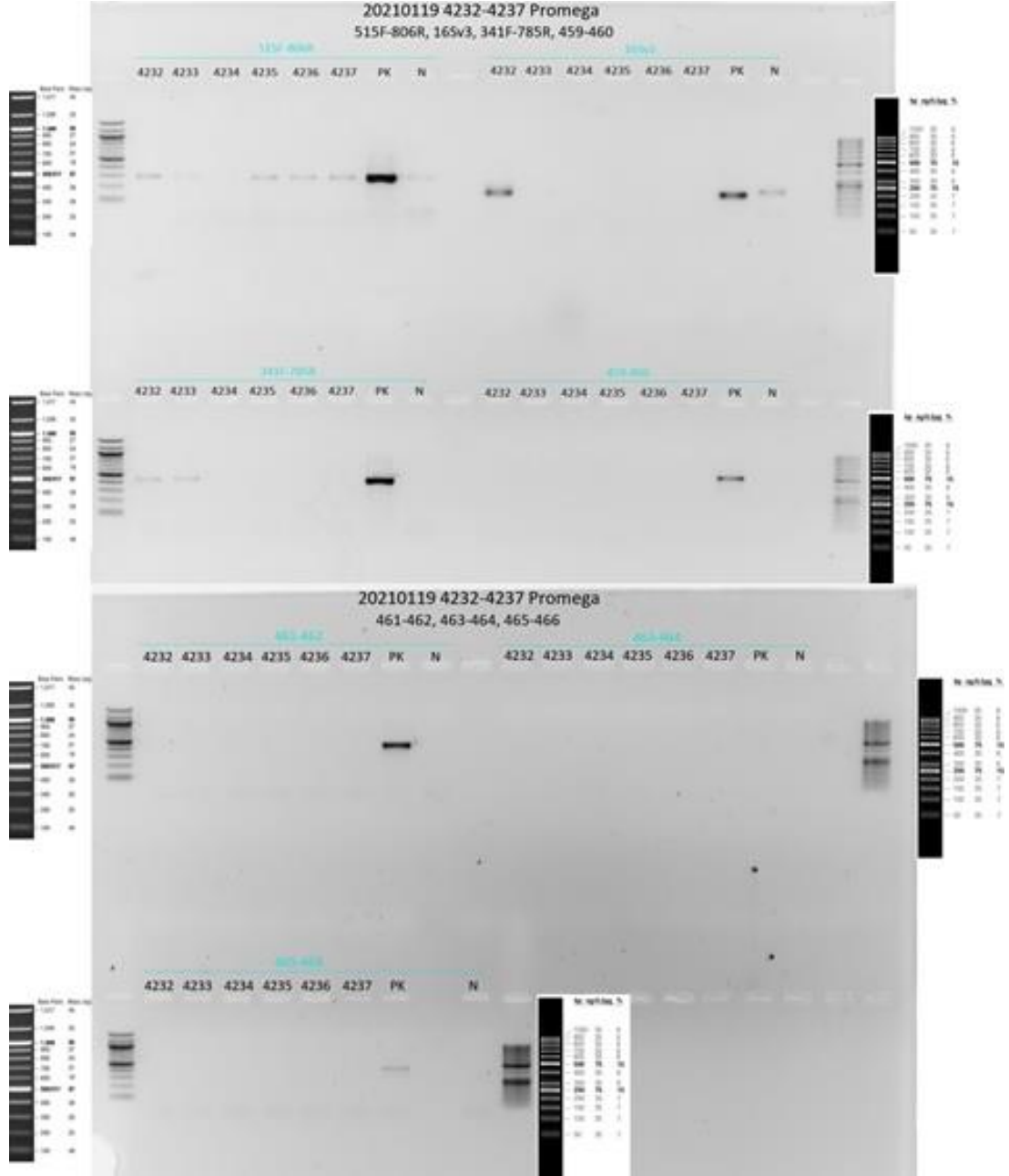
Şekil 5.5. ve 5.6.'da elde edilen sonuçlara göre 3670 numara örnek 1:10, 3671 numaralı örnek 1:100 dilüe edilerek diğer örneklerin ise dilüe edilmeden kullanılmasına karar verildi.

Şekil 5.1.'den Şekil 5.4.'e kadar gösterilmiş enzim optimizasyon sonuçlarına göre enzim olarak Promega GoTaq Flexi kullanılmasına karar verilmiştir. Jel görüntüleriyle tespit edilen uygun primer bağlanma sıcaklıkları Çizelge 5.20.'da gösterilmiş olup bu sıcaklıklar kullanılarak asıl örneklerle pcr kurulma aşamasına geçilmiştir.

Çizelge 5.20. Primer bağlanma sıcaklıkları

Primer çifti	Bağlanma sıcaklığı
SSU1ArF- SSU520R (459-460)	49°C
Pro341F- Pro805R (461-462)	53°C
S-D-Arch-0519-a-S-15- S-D-Arch-1041-a-A-18 (463-464)	59°C
S-D-Arch-0349-a-S-17- S-D-Arch-0786-a-A-20 (465-466)	53°C
515F-806R	53°C
16sV3F-R	53°C
341F-785R	48°C

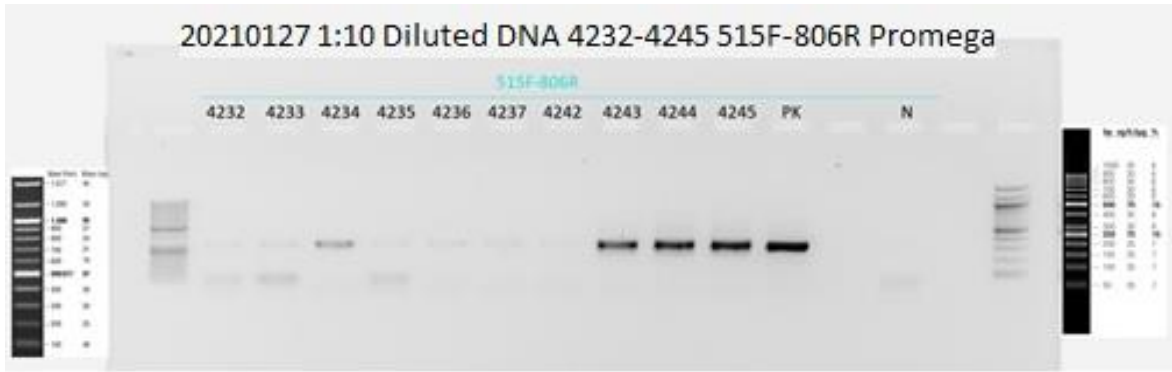
Uygun enzim ve bağlanma sıcaklıklarının seçilmesinin ardından Çizelge 5.18. ve Çizelge 5.19.'da belirtilen Promega GoTaq Flexi reaktif protokolü ve reaksiyon profiline göre 4232-4237 arası örneklerle polimeraz zincir reaksiyonu kurulmuştur. Elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde 120 voltta 45 dakika yürütülmüştür. Jel sonuçları Şekil 5.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.7. 4232-4237 numaralı örnekler ve Çizelge 5.16.'da belirtilen primerlerle kurulan pcr sonucu. PK: Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol

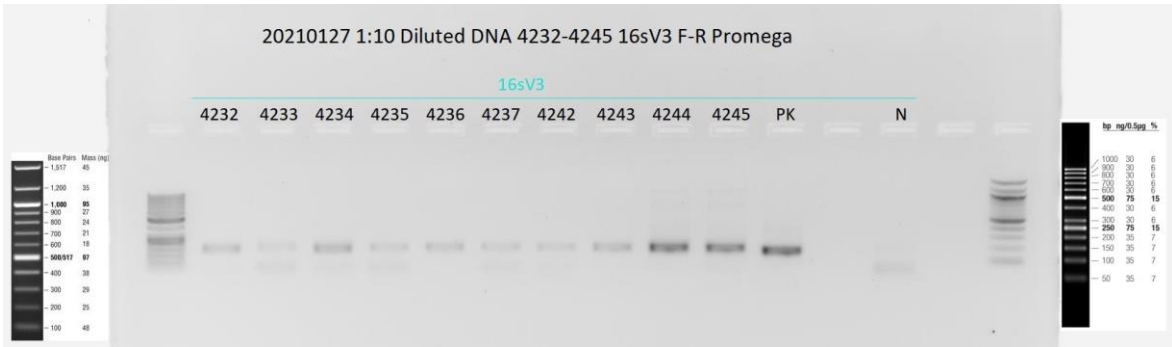
459-460, 461-462, 463-464 ve 465-466 numaralı primer çiftleri bant vermediği için; 341F-785R primer çifti ise yeni nesil dizileme için uzun ürün boyu oluşturduğundan dolayı çalışmadan çıkarıldı. Elde edilen bu sonuca göre çalışmanın devamında 515F-806R ve 16sV3 primerlerinin kullanılmasına karar verilmiş olup sonraki aşamada bantları güçlendirmek için örnek DNA'larında dilüsyona gidilmiştir.

1:10 dilüe edilmiş 4232-4237 ve izolasyon çalışması tamamlanan 4242-4245 numaralı Yozgat-Boğazlıyan arazisi örneklerinin 515F-806R primerleri ve Promega enzimi ile kurulan pcr sonucu Şekil 5.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.8. 1:10 dilüe edilmiş 4232-4237 ve 4242-4245 numaralı örneklerin 515F-806R primerleriyle kurulan pcr sonucu. PK: pozitif kontrol, N: negatif kontrol

1:10 dilüe edilmiş 4232-4237 ve 4242-4245 numaralı örneklerin 16sV3F-R primerleri ve Promega enzimi ile kurulan pcr sonucu Şekil 5.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 5.9. 1:10 dilüe edilmiş 4232-4237 ve 4242-4245 numaralı örneklerin 16sV3F-R primerleriyle kurulan pcr sonucu. PK: pozitif kontrol, N: negatif kontrol

Silik bantların güçlendirilmesi için 4232-4237 numaralı örnekler 1:100 dilüe edildi ve 16sV3F-R primerleri ve Promega enzimi ile pcr kuruldu. 1:10 dilüe edilmiş 4242-4245 numaralı örneklerin pcr'u tekrar edildi. Jel görüntüsü Şekil 5.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 5.10. 1:100 dilüe edilmiş 4232-4237 ve 1:10 dilüe edilmiş 4242-4245 numaralı örneklerin 16sV3F-R primerleriyle kurulan pcr sonucu. PK: pozitif kontrol, N: negatif kontrol

Elde edilen sonuçlara göre bundan sonraki aşamalarda 16sV3F-R primerleri için 4232-4237 numaralı örneklerin 1:100 dilüe DNA'larının; 4242-4245 numaralı örneklerin 1:10 dilüe DNA'larının kullanılmasına karar verildi.

4235-4237 numaralı örneklerinin asıl DNA ve 1:10 dilüe DNA'ları ile 515F-806R primerleri ve Promega enzimi kullanılarak tekrar pcr kuruldu. Şekil 5.8. ve Şekil 5.11'de elde edilen sonuçlara göre 515F-806R primerleri için 1:10 dilüe DNA'nın kullanılmasına karar verildi.



Şekil 5.11. Dilüe edilmemiş ve 1:10 dilüe edilmiş 4235-4237 numaralı örneklerin 515F-806R primerleriyle kurulan pcr sonucu. PK: pozitif kontrol, N: negatif kontrol

4297-4300 numaralı Dalaman arazisi örneklerinin 515F-806R ve 16sV3F-R primerleri ile Promega enzimi kullanılarak kurulan pcr sonucu Şekil 5.12.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.12. 4297-4300 numaralı örneklerinin 515F-806R ve 16sV3F-R primerleri ve Promega enzimi ile kurulan pcr sonucu. PK: pozitif kontrol, N: negatif kontrol

Elde edilen pcr sonuçlarına göre indeksli polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak olan DNA'ların uygun dilüsyonlarına karar verildi. Seçilen dilüsyonların listesi Çizelge 5.21.'de verilmiştir. Bu çizelgeye göre aynı arazi ve primere sahip örneklerin DNA'ları arazi negatifleri ayrı tutularak dilüsyondan sonra birleştirilmiştir.

Çizelge 5.21. Dilüsyon oranları

Örnek adı	515F-806R Dilüsyon oranı	16sV3 Dilüsyon oranı
3668	1	1
3669	1	1
3670	1:10	1
3671	1:100	1
3672	1	1
3673	1	1
4232	1	1:100
4233	1	1:100
4234	1	1:100
4235	1:10	1:100
4236	1:10	1:100
4237	1:10	1:100
4242	1:10	1:10
4243	1:10	1:10
4244	1:10	1:10
4245	1:10	1:10
4297	1	1
4298	1	1
4299	1	1
4300	1	1

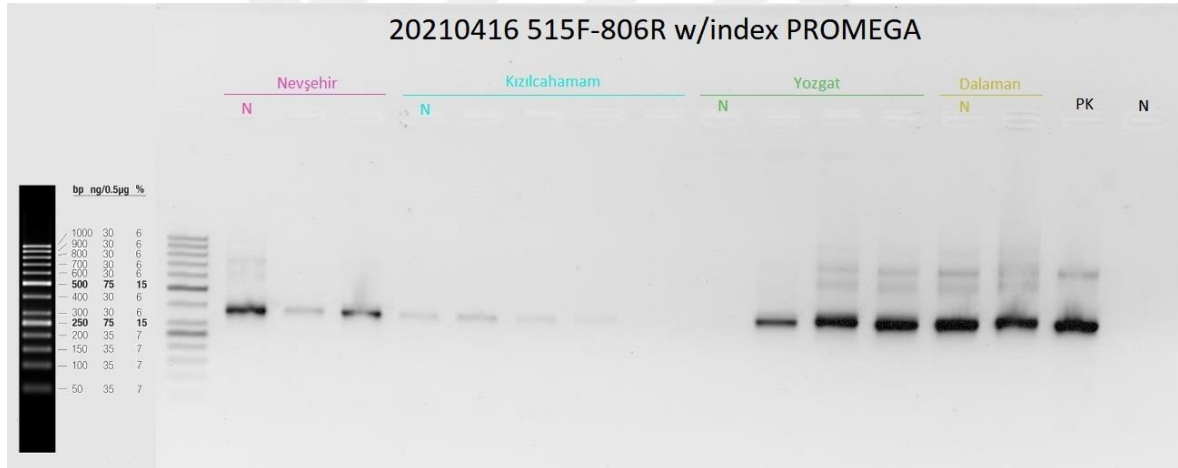
5.2.3. İNDEKSLİ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU SONUÇLARI

Elde edilen ürünlerin dizileme işleminin yapılabilmesi için 5.1.2.'de çalışmanın devamı için kullanılacak primerlerin önüne Illumina adaptörlerinin eklenmesiyle indeksli primerler oluşturuldu. İndeksli primerlerin dizileri ve ürün boyları Çizelge 5.22.'de gösterilmiştir.

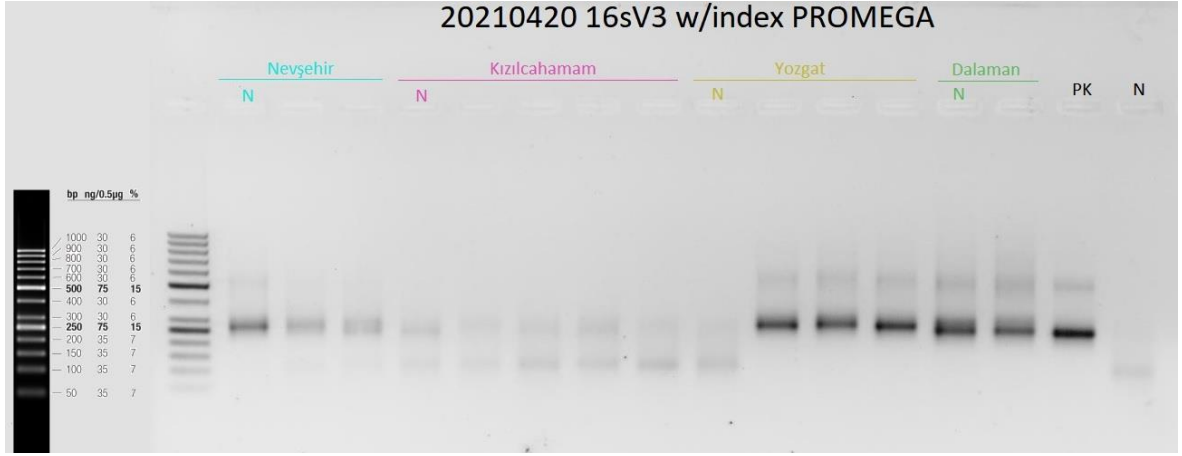
Çizelge 5.22. İndeksli primer listesi

Primer adı	Primer dizisi	Bağlanma sıcaklığı	Ürün boyu
515F_Index	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGA CAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA	53°C	350 bp
806R_Index	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAG ACAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT	53°C	350 bp
16sV3F_Index	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGA CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	53°C	200 bp
16sV3R_Index	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAG ACAGACCGCGGCTGCTGGCAC	53°C	200 bp

Çizelge 5.18. ve 5.19.'da belirtilen protokollere göre indeksli primerlerle 53°C'de polimeraz zincir reaksiyonu kuruldu. %2'lik agaroz jelde 120 volta 45 dakika yürütüldükten sonra elde edilen jel görüntüleri Şekil 5.13. ve Şekil 5.14.'te gösterilmiştir. Her bir arazi bölgesi altında bulunan N, o arazilerin negatif örneklerini temsil etmektedir.



Şekil 5.13. 515F_Index ve 806R_Index pır sonucu, PK:Pozitif kontrol, N:Negatif kontrol



Şekil 5.14. 16sV3F_Index ve 16sV3R_Index pzs sonucu, PK:Pozitif kontrol, N:Negatif kontrol

Her bir arazi için elde edilen pzs ürünleri birleştirildi. Her araziye ait negatif örnekler de birleştirilerek tez çalışmasının negatif kontrolü oluşturuldu. Kütüphane basamağına geçilmeden önce örneklerin kalite ve miktarları Qubit™ 3.0 Florometre ile ölçüldü.

Çizelge 5.23. Birleştirilen örneklerin kalite ve miktar değerleri

Örnek adı	Konsantrasyon (ng/mL)
16sV3 Negatif	114
16sV3 Nevşehir	151
16sV3 Kızılcahamam	648
16sV3 Yozgat	553
16sV3 Dalaman	145
515F-806R Negatif	109
515F-806R Nevşehir	223
515F-806R Kızılcahamam	421
515F-806R Yozgat	139
515F-806R Dalaman	186

5.3. BİYÖİNFORMATİK BULGULAR

4.2.3.'te elde edilen ve SILVAngs sistemine yüklenen dizilerin sayısı Çizelge 5.24.'ta gösterilmiştir. 515F-806R primerleri ile elde edilen dizilerin 'uniq.clean' aşamasının analizleri ileri ve geri okumalar tek dosyada birleştirildikten sonra yapılmıştır. Diğer aşamalarda ileri ve geri okumalar ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Çizelge 5.24. Dizilenen verilerin sayıları, * ile belirtilmiş uniq.clean verilerinde 515F-806R primerleri ile elde edilen ileri ve geri okumalar tek bir dosyada birleştirilmiştir.

	Ham veri	uniq	c10	uniq.clean*	c10.clean
16sV3 negatif	583.888	101.556	3.076	60.381	434
16sV3 Nevşehir	605.608	133.918	2.836	100.436	371
16sV3 Kızılcahamam	447.082	88.635	2.376	53.302	536
16sV3 Yozgat	534.612	95.848	2.147	62.367	453
16sV3 Dalaman	520.465	135.927	3.462	92.058	960
515-İleri negatif	292.293	47.431	1.757	203.530	328
515-İleri Nevşehir	290.537	32.613	1.496	223.855	135
515-İleri Kızılcahamam	350.295	58.716	2.007	280.199	486
515-İleri Yozgat	320.533	52.562	1.287	262.888	481
515-İleri Dalaman	336.626	81.386	2.047	252.385	808
515-Geri negatif	292.293	78.029	997	203.530	532
515-Geri Nevşehir	290.537	54.294	1.409	223.855	459
515-Geri Kızılcahamam	350.295	99.389	1.862	280.199	1527
515-Geri Yozgat	320.533	84.737	1.551	262.888	1154
515-Geri Dalaman	336.626	116.659	1.531	252.385	1262

SILVAngs sistemine yüklenen dizilerin dizi sayıları, operasyonel taksonomik birim (OTU) sayıları ve oranları, veri tabanı ile eşleşmeyen dizi sayıları ve oranları özetlenmiş ve Çizelge 5.25., 5.26. ve 5.27.’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.25. 16sV3 analiz özeti

	16sV3	16sV3-c10	16sV3-clean	16sV3-c10-clean
Dizi sayısı	555.884	13.897	368.544	2.754
OTU sayısı	141.564	1.347	143.174	1.380
OTU yüzdesi	%25.47	%9.69	%38.85	%50.11
Eşleşmeyen dizi sayısı	61.683	924	41.943	97
Eşleşmeyen dizi yüzdesi	%11.10	%6.65	%11.38	%3.52

Çizelge 5.26. 515-F analiz özeti, * ile belirtilmiş 515-F-clean verileri ileri ve geri okumaların tek bir dosyada birleştirilmesinden oluşturulmuştur.

	515-F	515-F-c10	515-F-clean*	515-F-c10-clean
Dizi sayısı	272708	8594	1.222.857	2238
OTU sayısı	56391	864	590.520	856
OTU yüzdesi	%20.68	%10.05	%47.83	%38.25
Eşleşmeyen dizi sayısı	28524	622	401.719	136
Eşleşmeyen dizi yüzdesi	%10.46	%7.24	%32.85	%6.08

Çizelge 5.27. 515-R analiz özeti, * ile belirtilmiş 515-R-clean verileri ileri ve geri okumaların tek bir dosyada birleştirilmesinden oluşturulmuştur.

	515-R	515-R-c10	515-R-clean*	515-R-c10-clean
Dizi sayısı	433108	7350	1.222.857	4934
OTU sayısı	80964	307	590.520	284
OTU yüzdesi	%18.69	%4.18	%47.83	%5.76
Eşleşmeyen dizi sayısı	5224	66	401.719	66
Eşleşmeyen dizi yüzdesi	%1.21	%0.90	%32.85	%1.34

SILVAngs sisteminden çıkan cins seviyesindeki eşleşmeler tablo haline getirilmiştir. Verilen cinsler pasta grafiğinde en çok yer kaplayan cinslerden oluşmaktadır. Arazi çalışmaları sonucu elde edilen cinsler yazılırken negatif örneklerden elde edilen sonuçlar çıkarılarak yalnızca belirtilen kaynakların mikrobiyom listesi oluşturulmuş oldu. Tablolar oluşturulurken aynı zamanda tespit edilen cinslerin belirgin özellikleri de not düşülmüştür.

Çizelge 5.28. Negatif örneklerin cins listesi

Negatif	Özellikleri
Methylobacterium	Yaygın cins (27)
Bacillus	Yaygın cins (28)
Rhizobium	Yaygın cins, filtrelenmiş atık suda bulunur (29)
Mesorhizobium	Yaygın cins, filtrelenmiş atık suda bulunur (29)
Ensifer	Toprak bakterisi (30)
Bradyrhizobium	Yaygın cins, filtrelenmiş atık suda bulunur (29)
Sphingomonas	Yaygın cins, filtrelenmiş atık suda bulunur (29)
Caulobacter	Yaygın cins, tatlı suda bulunur (31)
Reynanella	Tatlı suda bulunur (32)
Acinetobacter	Yaygın cins, filtrelenmiş atık suda bulunur (29)
Pseudomonas	Yaygın cins (33)
Aeromonas	Çoğu patojen, tatlı suda bulunur (34)
Sedimentibacterium	Sediment bakterisi (35)
Edaphobaculum	Toprak bakterisi (36)
Bacillus	Yaygın cins (37)
Legionella	Patojen, su hatlarında ve içme suyunda yaşayabilir (38)
Clostridium sensu stricto 1	Su ve sedimentte bulunur (39)

Çizelge 5.29. Nevşehir-Kozaklı örneklerinin cins listesi

Nevşehir-Kozaklı	Özellikleri
Caldimicrobium	Termofil (40)
Geothermobacterium	Hipertermofil (41)
Hydrogenobacter	Hipertermofil (42)
Sulfurihydrogenibium	Termofil (43)
Geobacillus	Termofil (44)
Thermus	Termofil (45)
Thermodesulfobacterium	Hipertermofil (46)
Deinococcus	Termofil (47)
Thiobacter	Termofil (48)
Hydrogenophilus	Termofil (49)

Çizelge 5.30. Ankara-Kızılcahamam örneklerinin cins listesi

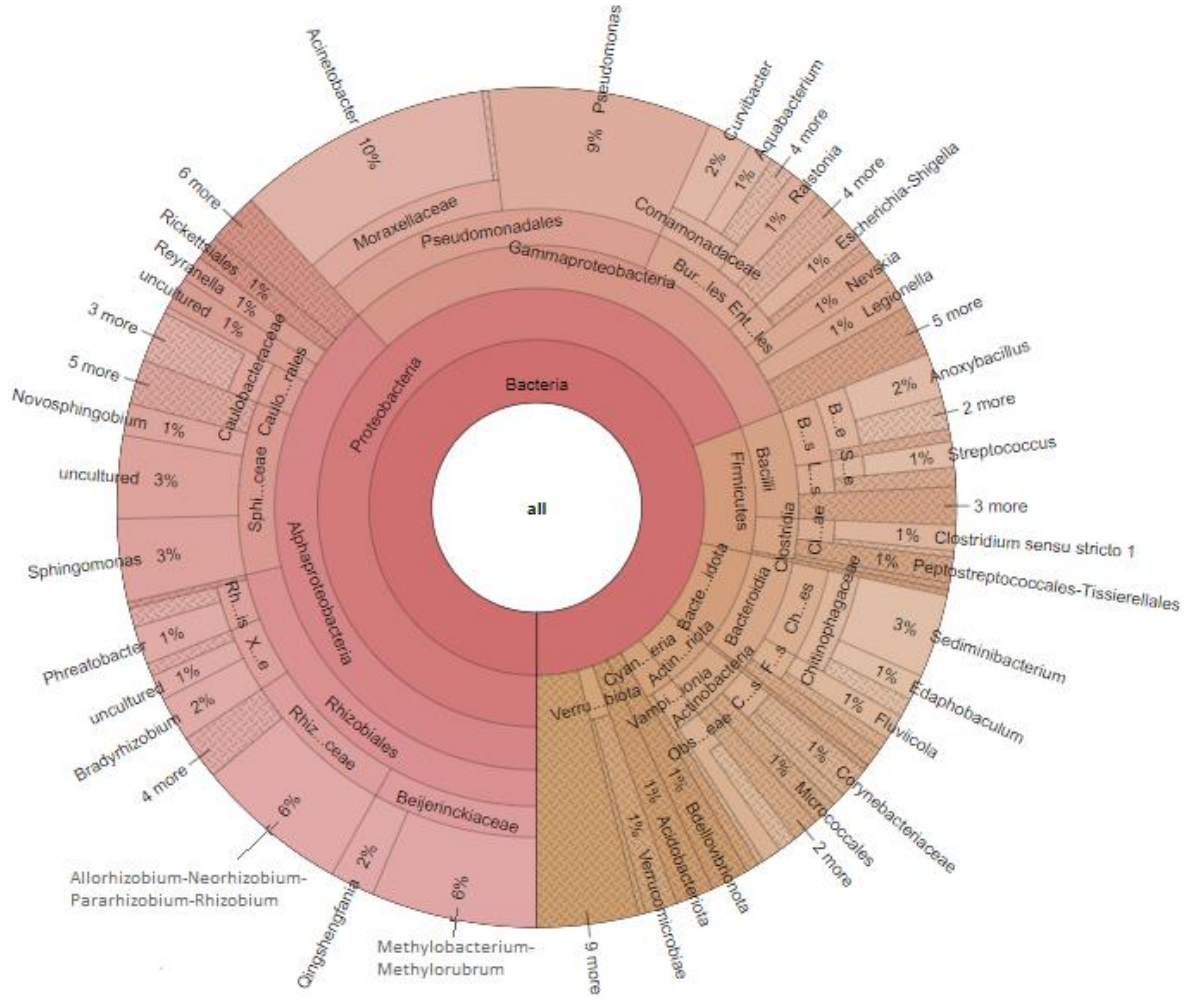
Ankara-Kızılcahamam	Özellikleri
Ignisphaera	Hipertermofil (50)
Nitrospira	Nitrit oksidasyonu (51)
Thermoflexus	Termofil (52)
Hydrothermae	Termofil, hidrotermal kaynaklı (53)
Pirellula	Genellikle atık sularda, yaygın cins (54)
Hydrogenobacter	Ekstremofil (42)
Thermus	Termofil (45)
Limisphaera	Termofil (55)
Algoriphagus	Ekstremofil (56)
Silanimonas	Ekstremofil (57)
Denitratisoma	Denitrifikasyon (58)
Hydrogenophilus	Termofil (49)
Vulcaniibacterium	Termofil (59)

Çizelge 5.31. Yozgat-Boğazlıyan örneklerinin cins listesi

Yozgat-Boğazlıyan	Özellikleri
Nitrospirota	Sülfat indirgeme (51)
Methylothermus	Kısmen termofil (60)
Ignavibacteriales	Kısmen termofil (61)
Desulfotomacula	Kısmen termofil (62)
Acetothermia	Termofil (63)
Thermoanaerobaculum	Hipertermofil (64)
Aminicenantales	Termofil (65)
Candidatus Nitrosotenuis	Amonyum oksidasyonu (66)
Micrarchaeales	Asidofilik, yaygın cins (67)

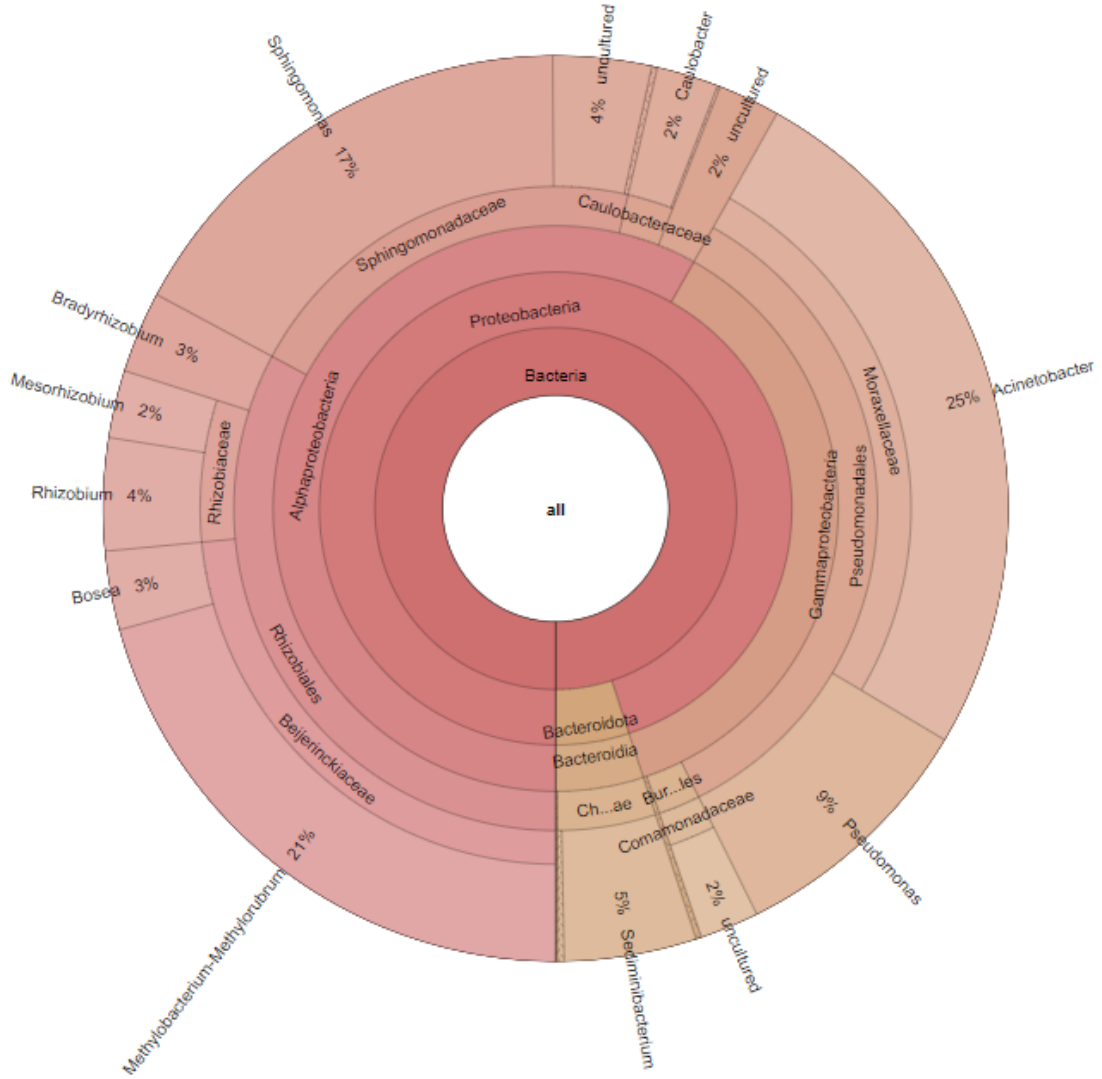
Çizelge 5.32. Muğla-Dalaman örneklerinin cins listesi

Muğla-Dalaman	Özellikleri
Arcobacter	Bazı türleri aerotolerant/halotolerant (68)
Malacobacter	Halofil (69)
Sulfurovum	Sülfür oksidasyonu (70)
Sulfurimonas	Sülfür oksidasyonu (71)
Thiovulum	Sülfür oksidasyonu (72)
Desulfocapsa	Sülfat indirgeme (73)
Planktothricoides SR001	Deniz suyu ve tatlı suyun karıştığı yerlerde (74)
Thioflexothrix	Sülfür bakterisi (75)
Hydrogenovibrio	Ekstremofil (76)
Thiomicrothrix	Sülfür oksidasyonu (77)
Annwoodia	Kısmen termofil (78)
Oceanospirillum	Halofil (79)
Halomonas	Tuz tolerasyon (80)
Motiliproteus	Nitrat indirgeme (81)
Hypnocyclicus	Termofil, kısmen halofil (82)
Sulfurospirillum	Toksik materyalde (arsenik gibi) büyüebilme (83)
Hydrogenimonas	Termofil (84)
Halarcobacter	Halofil (69)



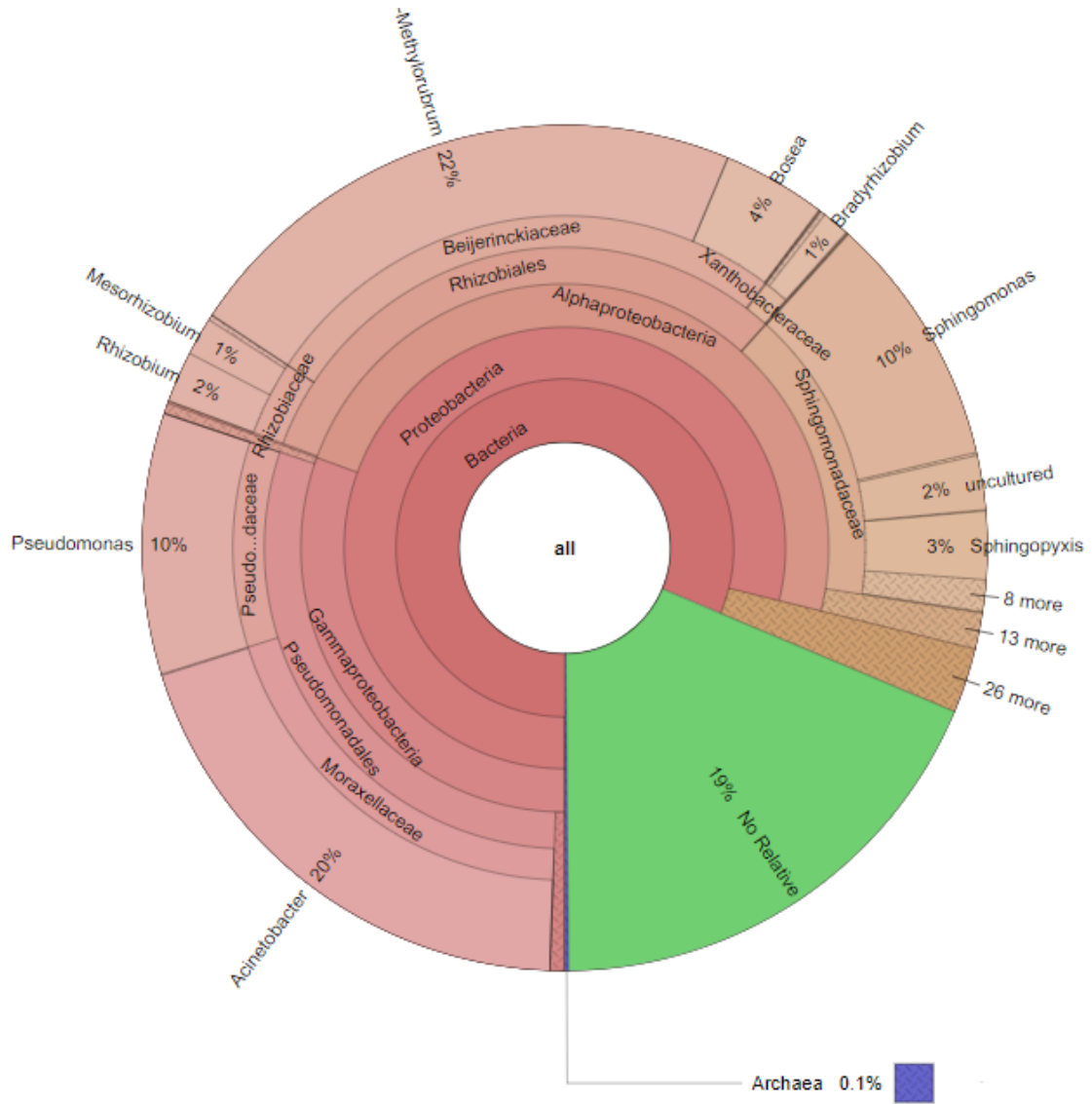
Şekil 6.4. 16sV3 Negatif 'c10.clean' örneğine ait Krona pasta grafiği

'c10' filtresi uygulanmış verilerin Krona grafiklerinde 'no relative' olarak ifade edilen; veri tabanında hiçbir diziyle eşleşmemiş dizilerin oranının azaldığı görülmektedir. Uygulanan filtrelerin sayısı arttıkça grafikteki dilim sayıları da artmıştır. Elde edilen eşleşmelerin su ve toprakta sıklıkla karşılaşılan cinslere ait olduğu ortaya konmuştur.



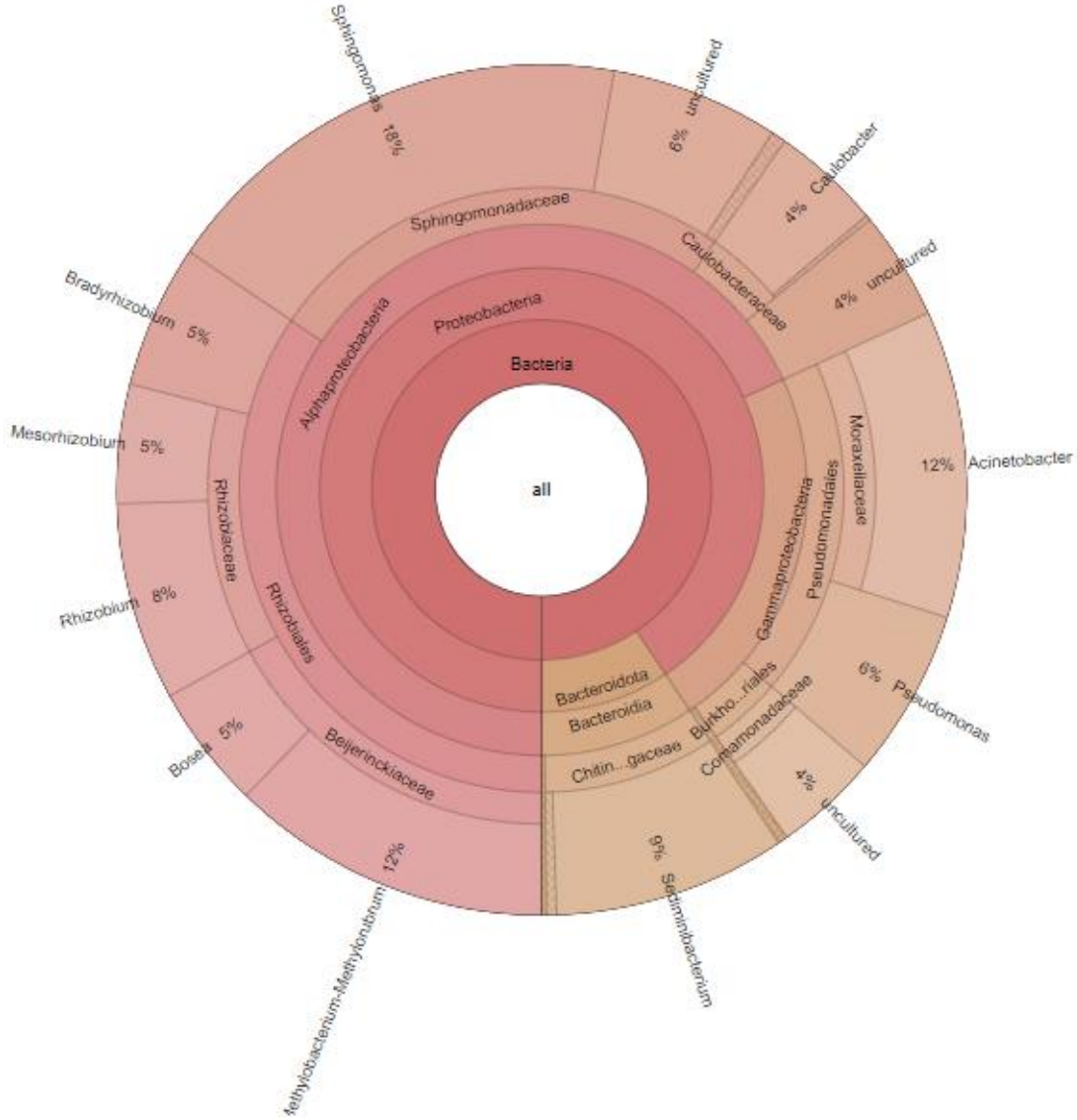
Şekil 6.8. 515 Negatif R 'c10' örneğine ait Krona pasta grafiği

Şekil 6.7. ve 6.8. incelendiğinde 'uniq' filtresine kıyasla 'no relative' eşleşmelerin neredeyse ortadan kalktığı gözlemlenmiştir. 'c10' filtresi ile singleton olarak adlandırılan veri setinde bir kez görülmüş ve muhtemel hatalardan oluşan dizilerin kendi veri setimizden çıkarılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Bundan dolayı 'no relative' oranının azalması beklenmektedir. Aynı zamanda arke eşleşmelerinin de olmadığı, bunun da sebebinin c10 filtresi ile hatalı pozitiflerin çıkarılması olduğu sonucuna varılmaktadır.



Şekil 6.9. 515 Negatif ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği

Şekil 6.9.’da gösterilen Krona grafiğinde 515 Negatif örneğine ait ‘uniq’ ve ‘c10’ filtrelerine kıyasla eşleşmedeki çeşitlilik sonuçlarında azalış ve ‘no relative’ oranında artış gözlemlenmiştir. ‘uniq.clean’ veri dosyası, eşleşen ileri ve geri okumalar ve eşleşmeyenler dizilerden oluşmaktadır. 515F-806R primer çifti yaklaşık 300 baz çifti çoğaltırken bu tez çalışmasında kullanılan NextSeq cihazı 2x150 baz çifti okumaktadır. Bundan dolayı ileri ve geri dizilerin sağlıklı bir şekilde birleştirilememesi beklenmektedir. Elde edilen çeşitlilik azalması ve ‘no relative’ oranının artması beklentiyi karşılamaktadır. Daha detaylı ve doğru bir sonuç için ileri ve geri dizilerin analizi ayrı ayrı yapılmalıdır.

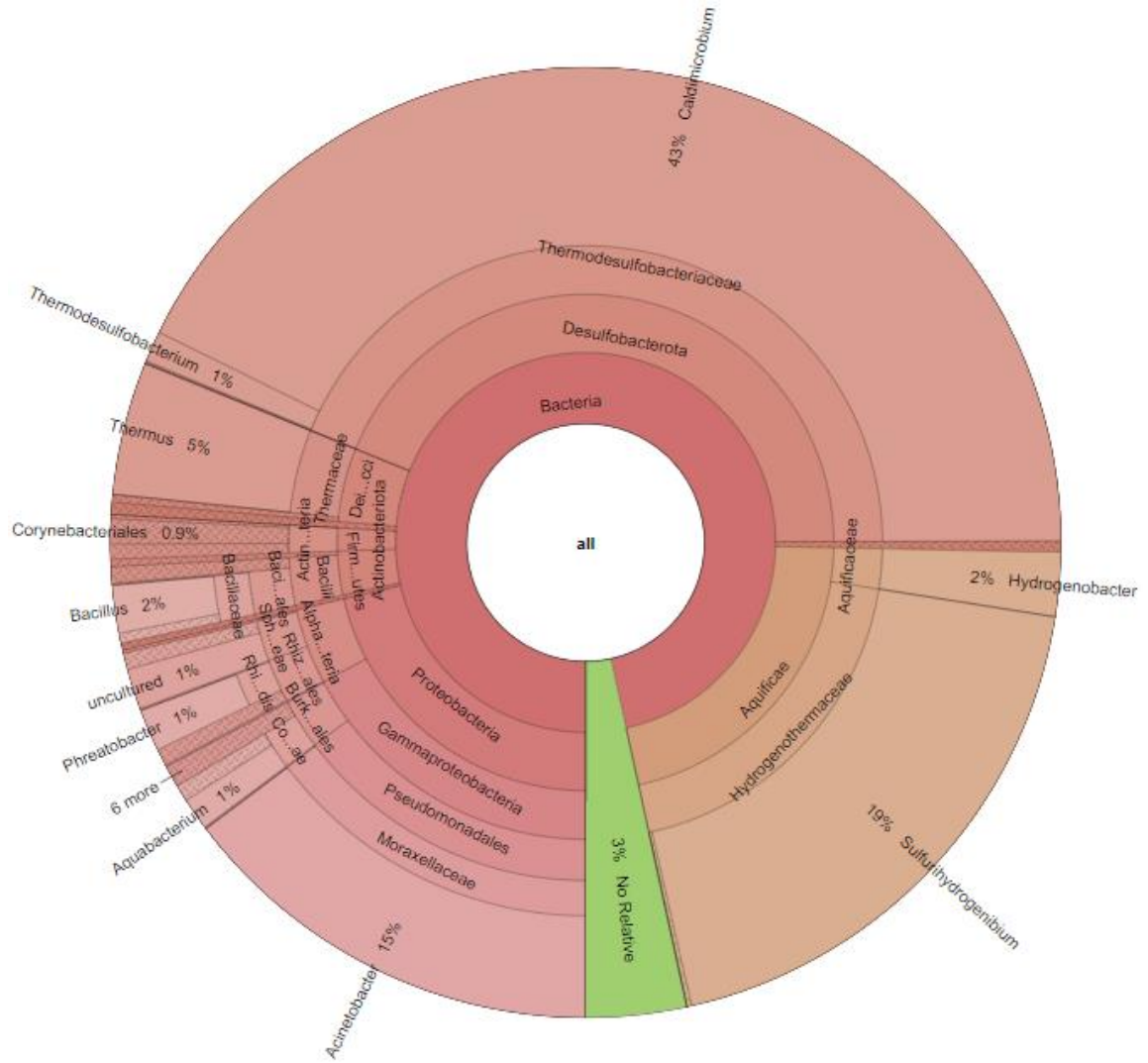


Şekil 6.11. 515 Negatif R 'c10.clean' örneğine ait Krona pasta grafiği

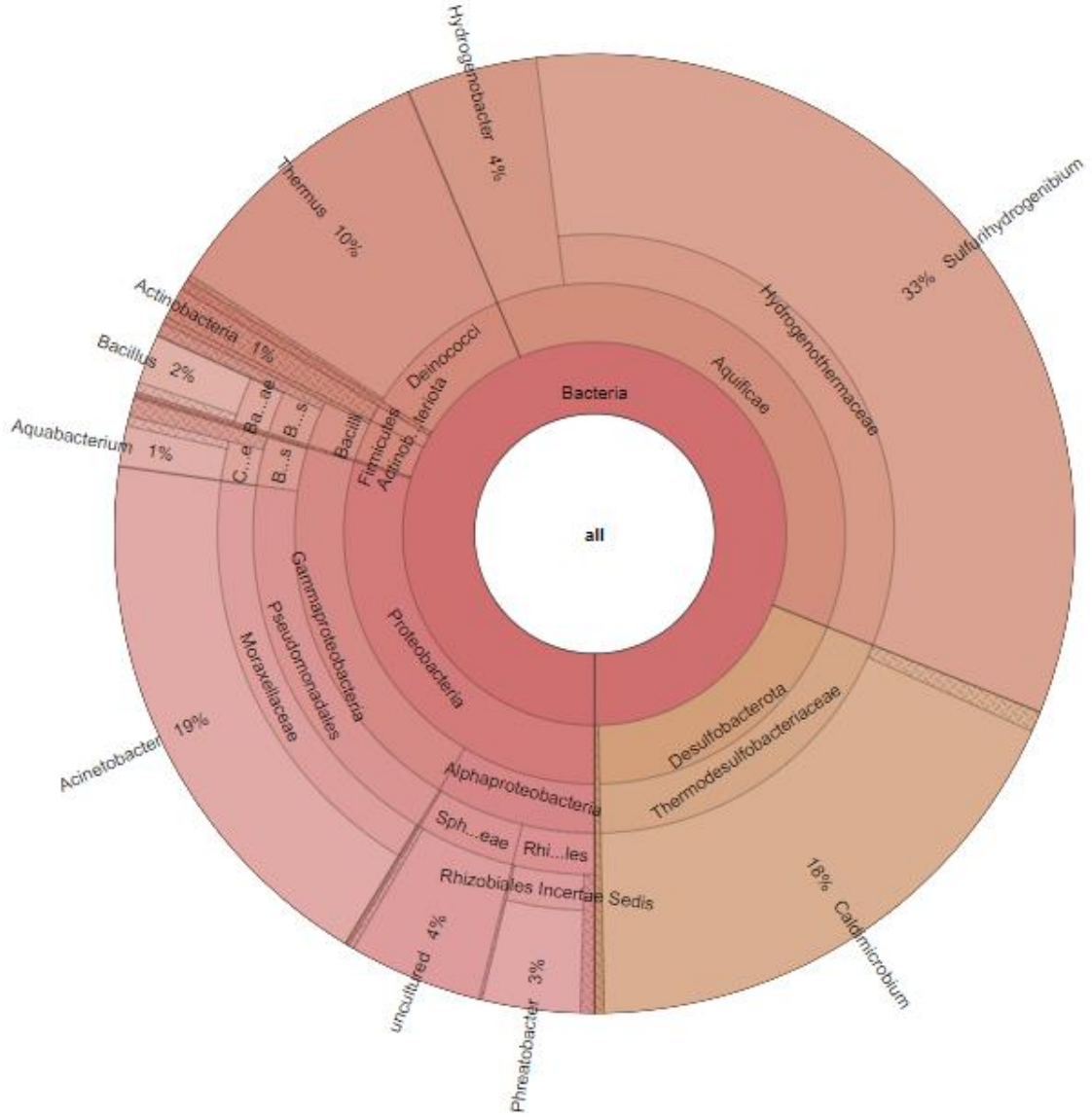
Şekil 6.10. ve 6.11.'de elde edilen 'c10.clean' grafikleri diğer 515 Negatif grafiklerine kıyasla 'no relative' bağlamında daha temiz sonuç vermiştir. İleri ve geri okumalar kıyaslandığında ise ileri okumanın daha fazla cins seviyesinde eşleşme verdiği gözlemlenmiştir.

Negatif örneklerin her iki primerle dizilenmesi sonucunda birçok cins seviyesinde eşleşme ile karşılaşmıştır. Eşleşen cinsler toprak ve su gibi çevresel örneklemelerde yoğunlukla bulunan cinslerdir. Bu sonuçlar UV'ye maruz bırakılan saf suda bile mikroorganizmalara rastlayabileceğimizi göstermektedir. Mikrobiyal çeşitliliğin kaynağı saf su cihazının filtresinden, kullanılan şişelerden, laboratuvar ekipmanından veya deneyde kullanılan

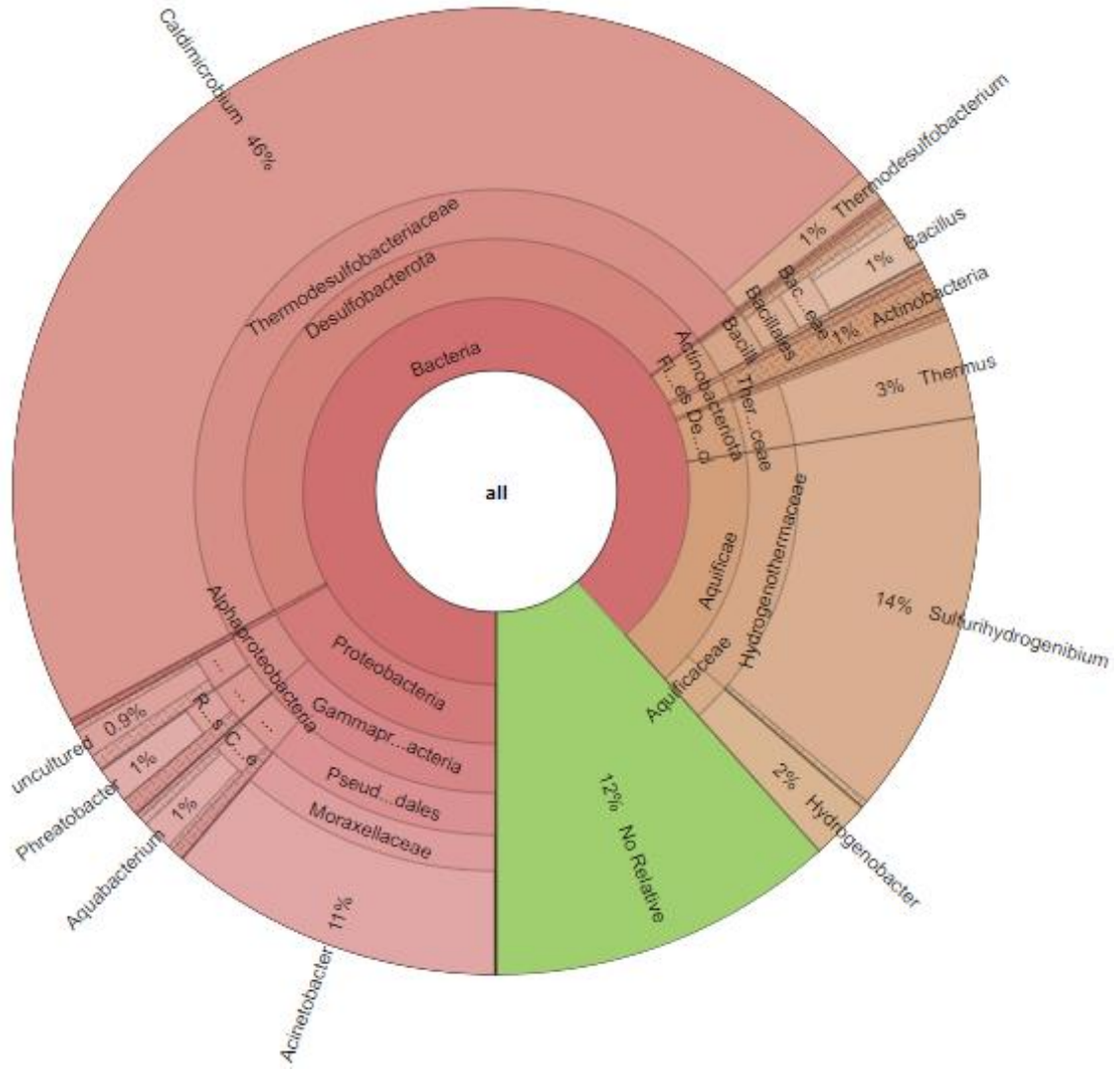
kimyasallar olabilir. Arazi örneklerine ait sonuçların daha iyi değerlendirilmesi için mutlaka negatif örneklerin de dizilenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.



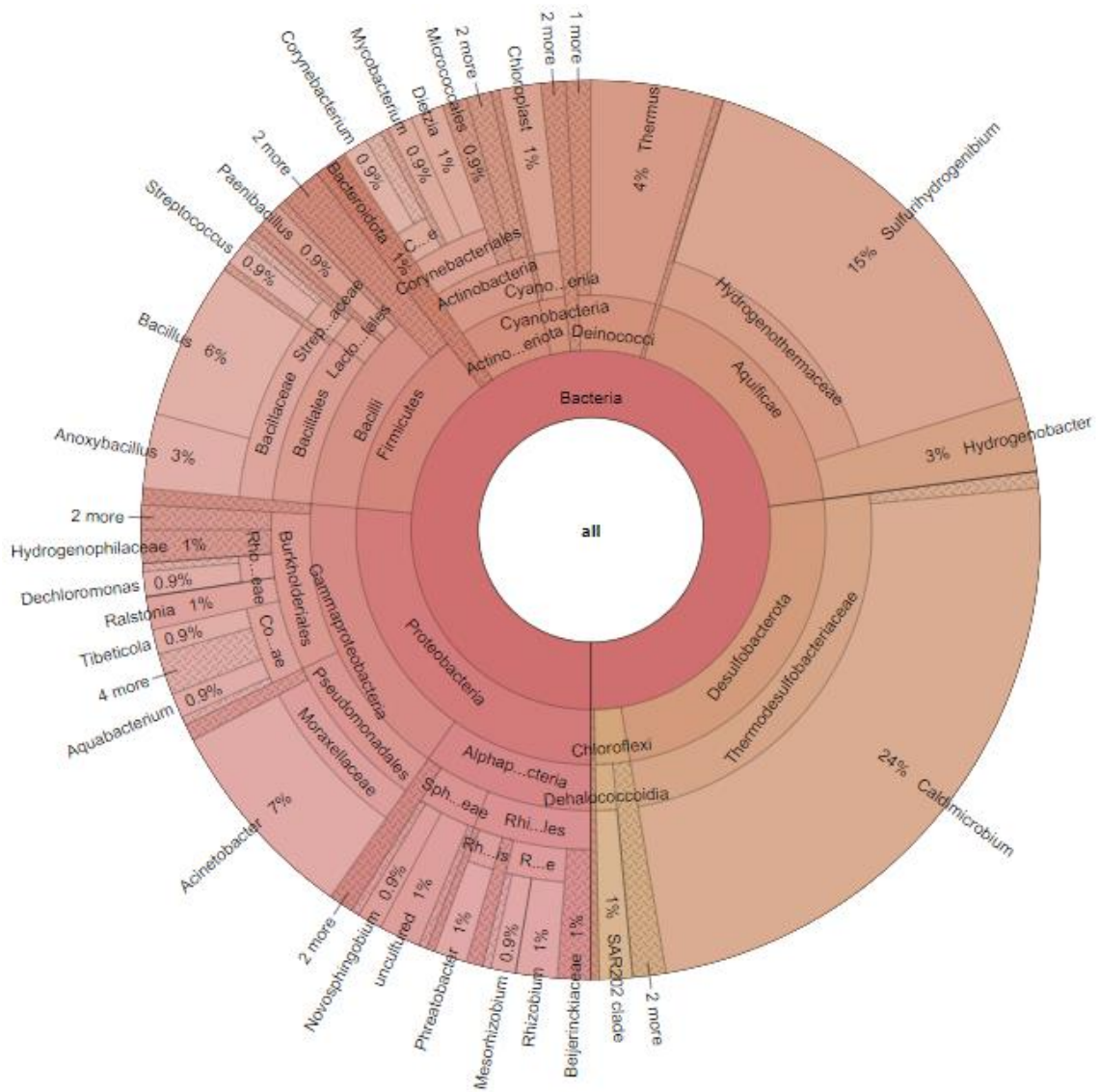
Şekil 6.12. 16sV3 Nevşehir 'uniq' örneğine ait Krona pasta grafiği



Şekil 6.13. 16sV3 Nevşehir ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği

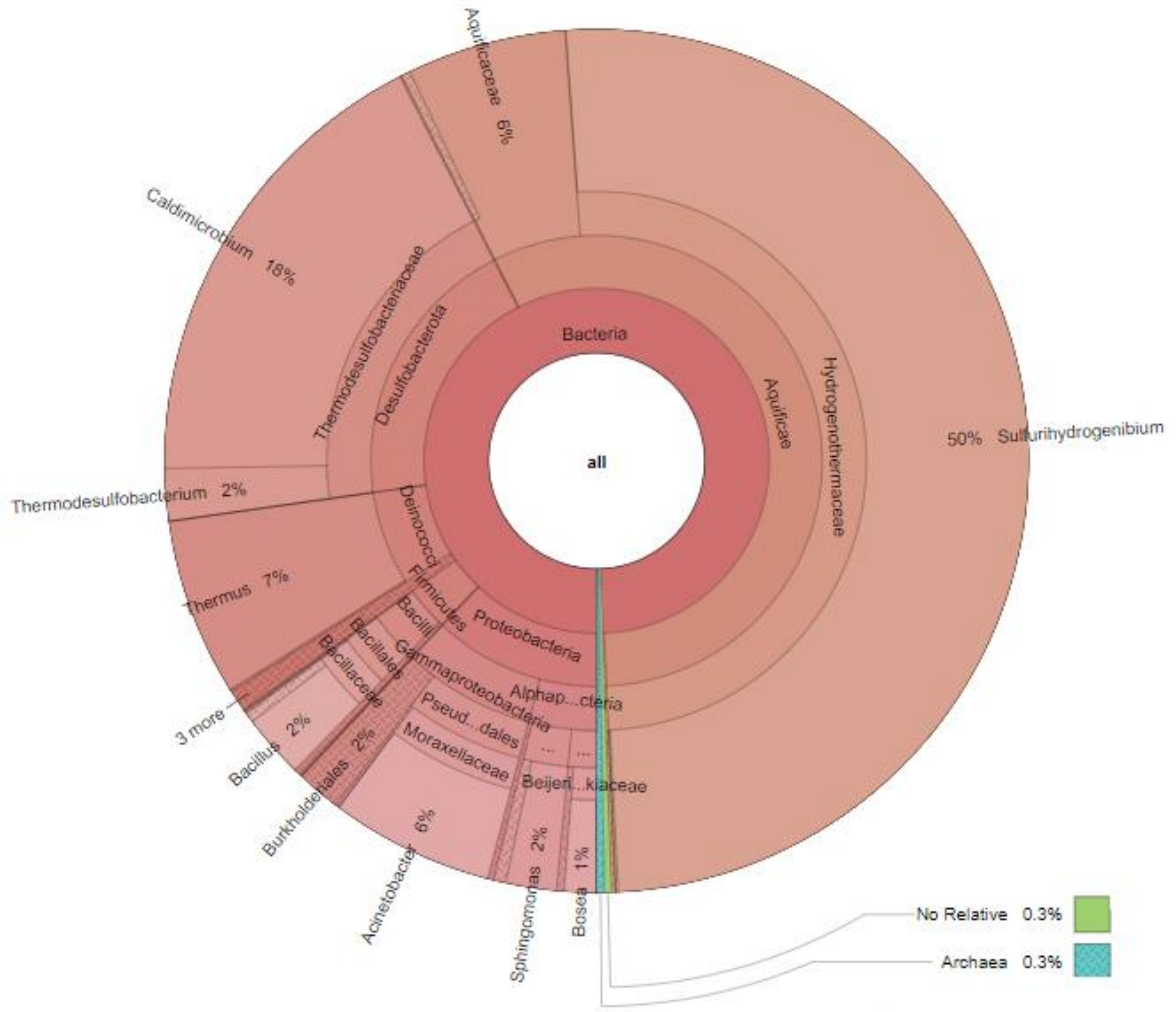


Şekil 6.14. 16sV3 Nevşehir 'uniq.clean' örneğine ait Krona pasta grafiği

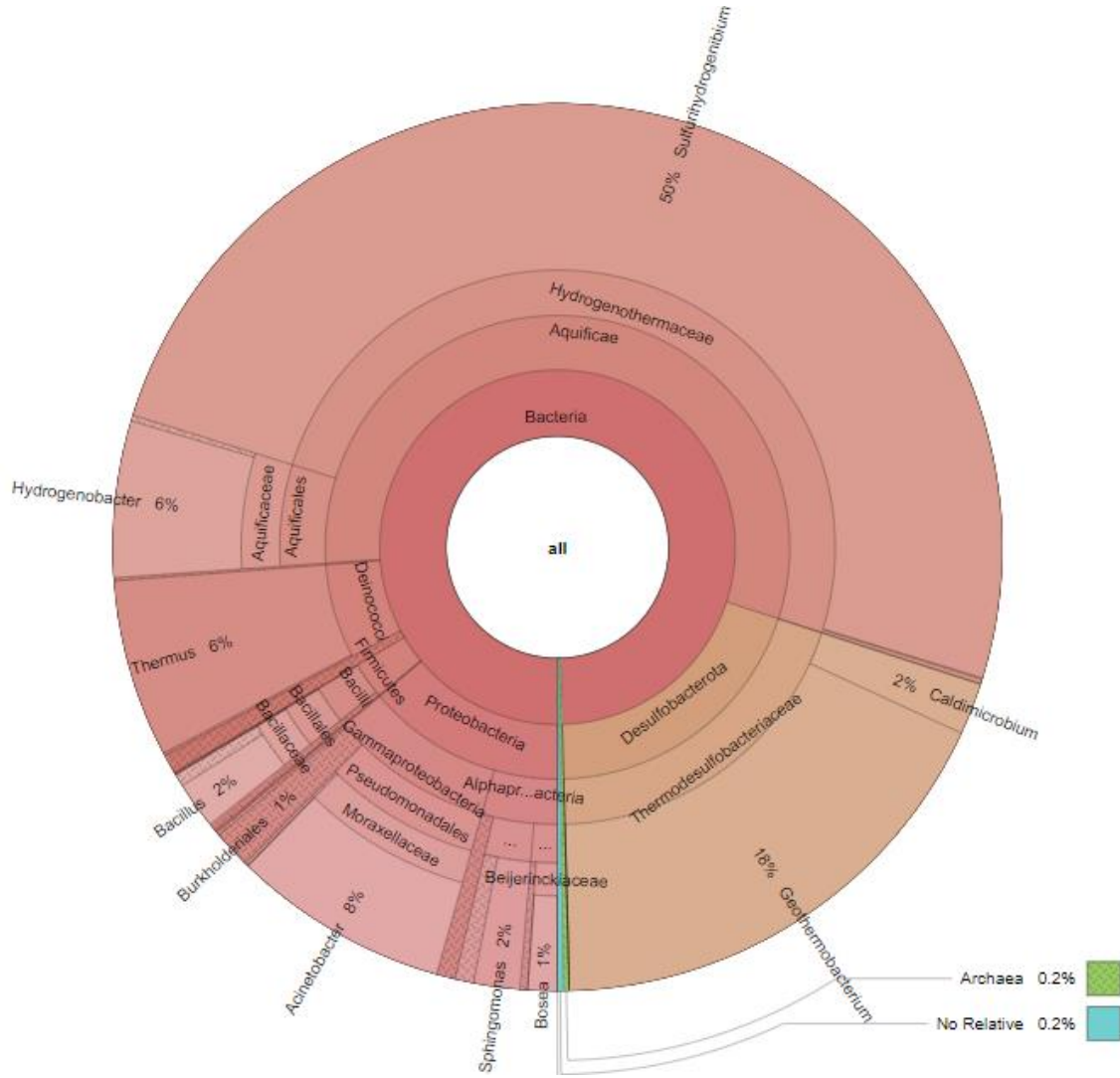


Şekil 6.15. 16sV3 Nevşehir 'c10.clean' örneğine ait Krona pasta grafiği

16sV3F-R primerleri ile çoğaltılmış Nevşehir örneklerinden elde edilen grafikler sonucunda 'c10' filtresi uygulanmış verilerde uygulanmayanlara kıyasla 'no relative' dizi oranlarının azaldığı görülmektedir. Uygulanan filtrelerin sayısı arttıkça grafikteki dilim sayıları da artmıştır. Caldimicrobium, Hydrogenobacter, Sulfurihydrogenibium, Thermus gibi habitatı yüksek sıcaklık olan ve bu kaynaktan çıkması beklenen cinslere rastlanmıştır.

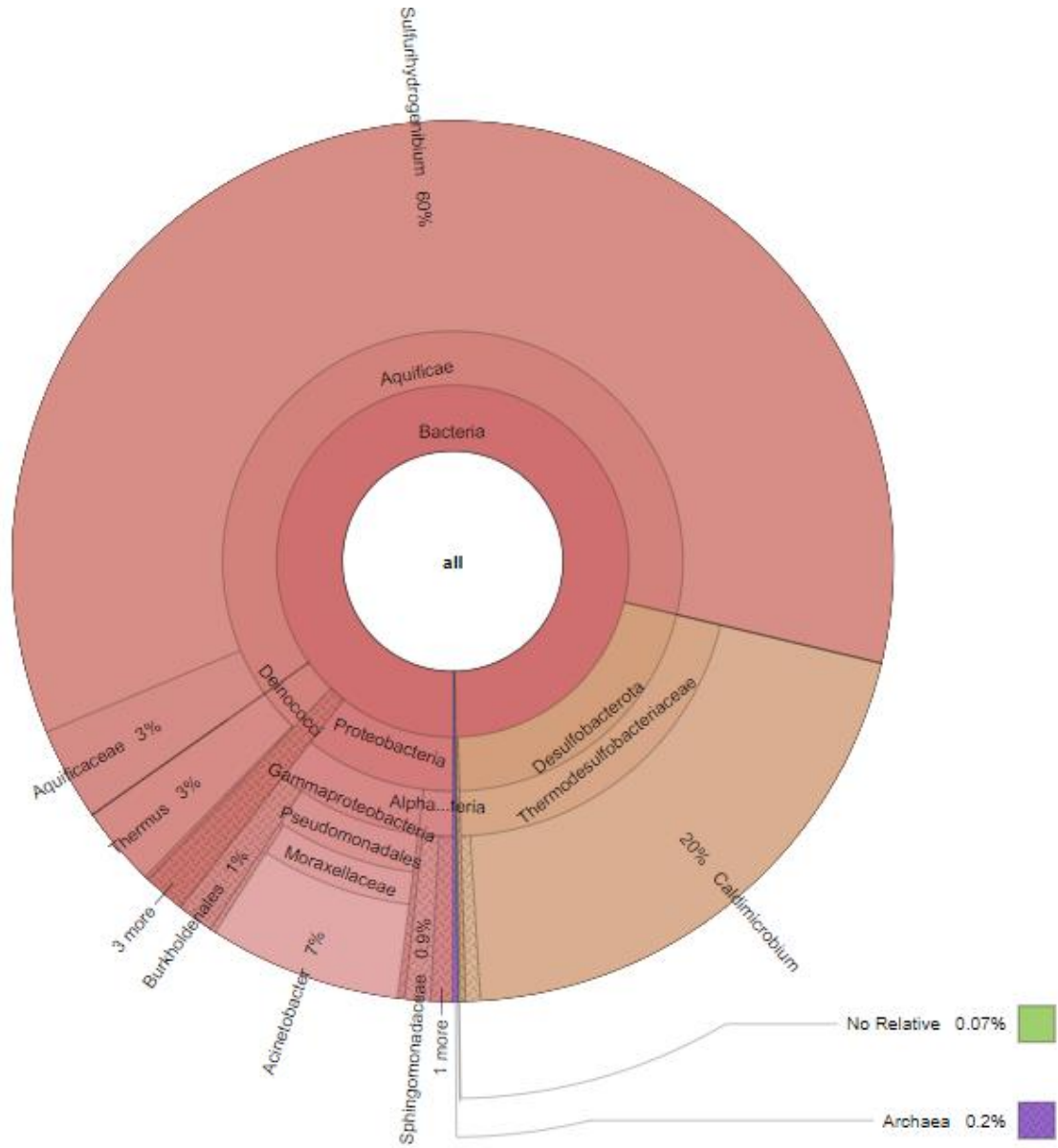


Şekil 6.16. 515 Nevşehir F ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği

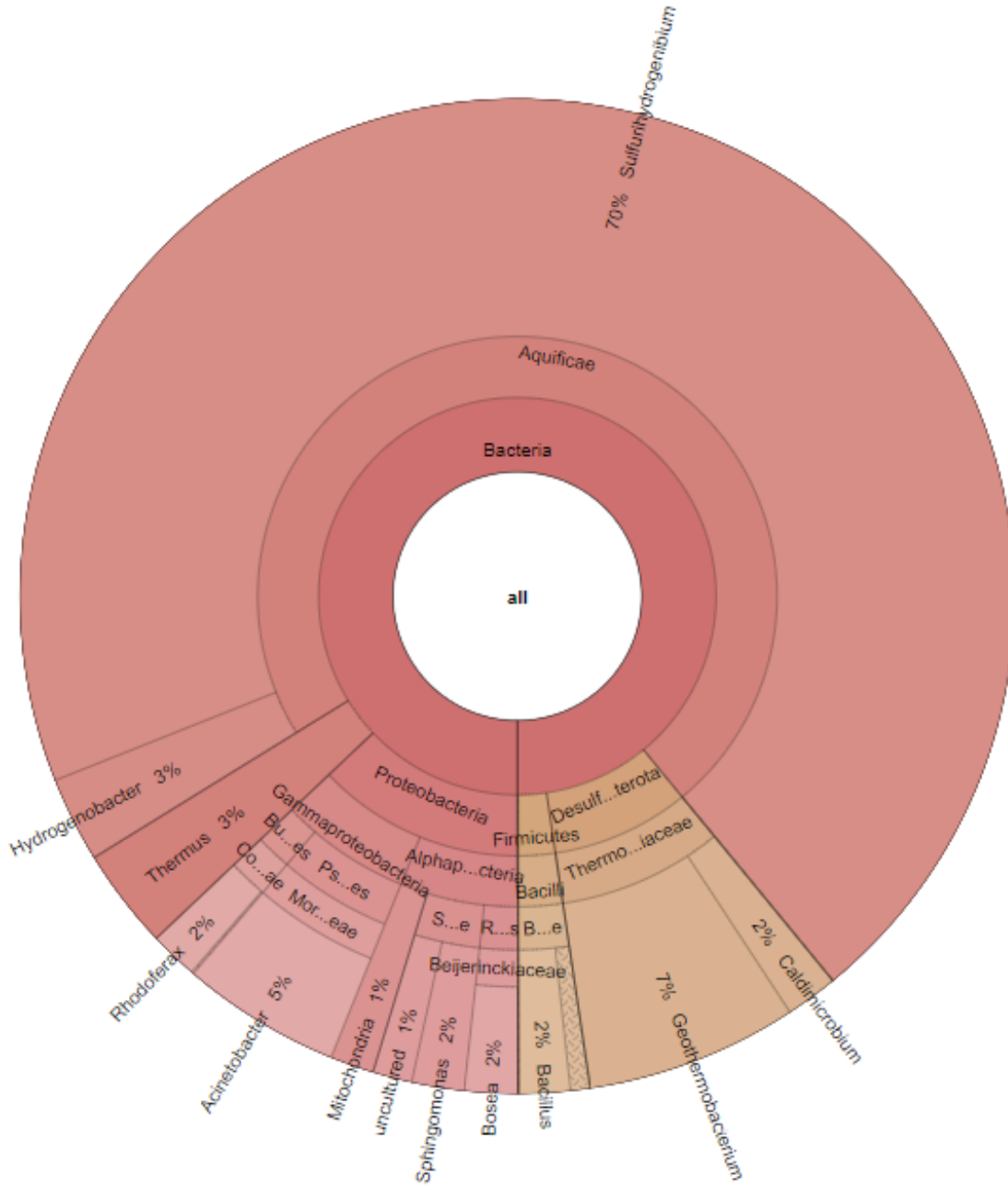


Şekil 6.17. 515 Nevşehir R ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği

Şekil 6.16. ve 6.17. kıyaslandığında elde edilen sonuçların neredeyse aynı olduğu gözlemlenmiştir. Caldivimicrobium, Hydrogenobacter, Sulfurihydrogenibium, Thermus gibi habitatı yüksek sıcaklık olan ve bu kaynaktan çıkması beklenen cinslere bu primerlerin analizi sonucunda da rastlanmıştır.

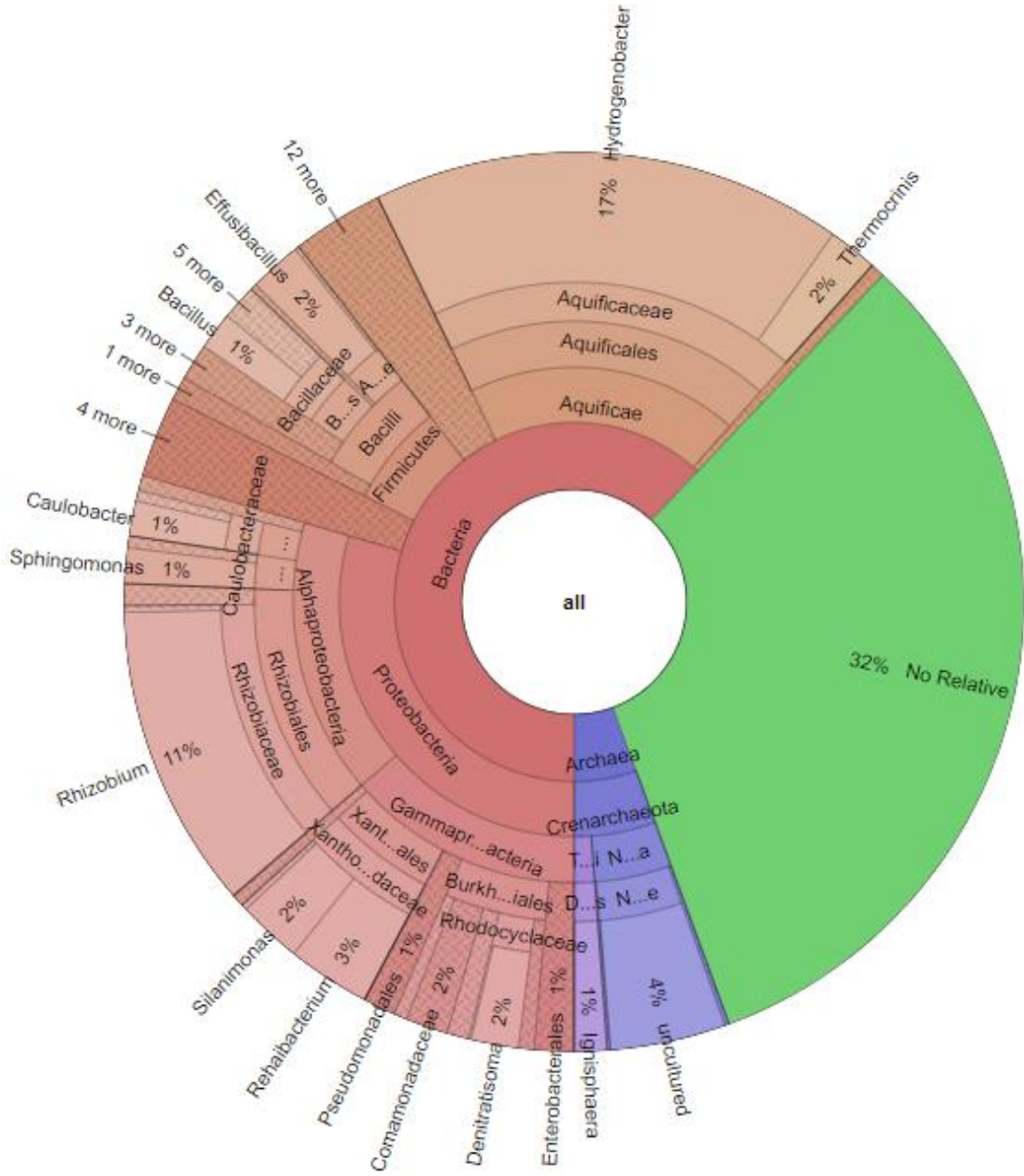


Şekil 6.18. 515 Nevşehir F 'c10' örneğine ait Krona pasta grafiği



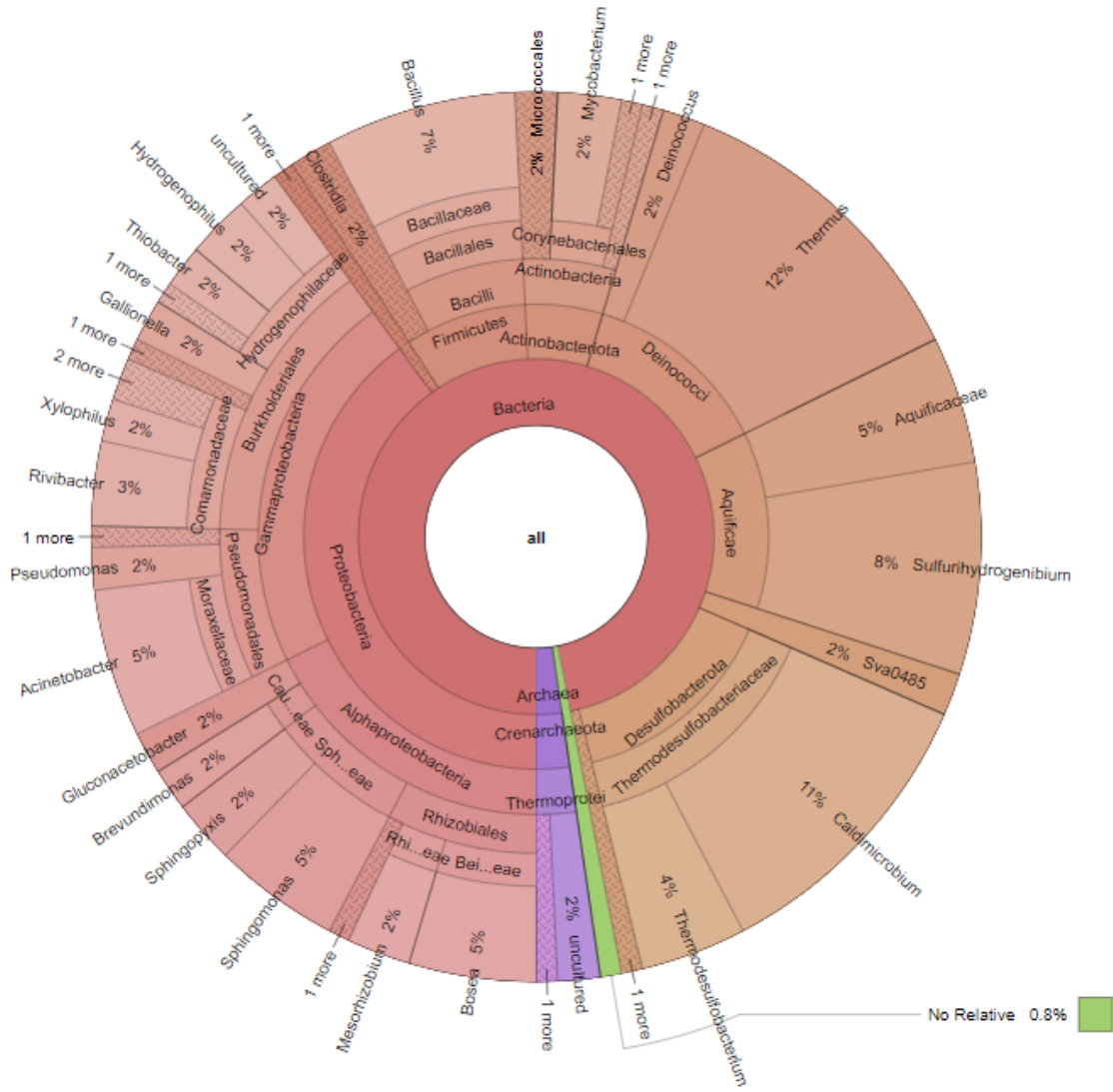
Şekil 6.19. 515 Nevşehir R ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği

‘c10’ filtresi uygulanmış 515 Nevşehir dizilerinin ileri ve geri okumaları kıyaslandığında geri yöndeki okumalarda ‘no relative’ oranının sıfırlandığı ve hipertermofilik ve termofilik grupların daha iyi ayrıldığı gözlemlenmektedir.

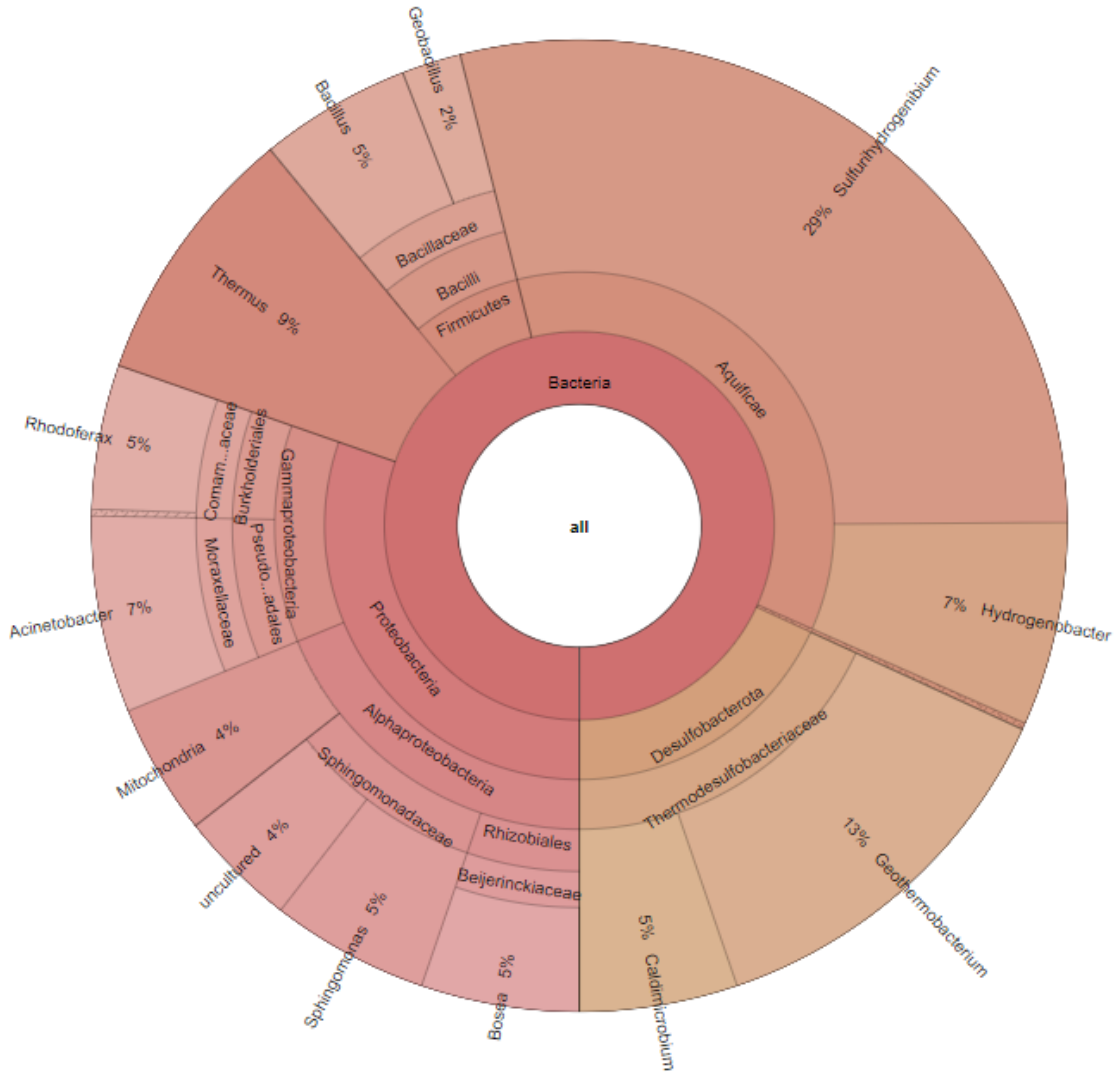


Şekil 6.20. 515 Nevşehir ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği

Şekil 6.20.’de gösterilen Krona grafiğinde 515 Nevşehir örneğine ait ‘uniq’ ve ‘c10’ filtrelerine kıyasla hipertermofilik grupların oranında azalış, ‘no relative’ ve arke oranında artış gözlemlenmiştir. ‘uniq.clean’ veri dosyası, eşleşen ileri ve geri okumalar ve eşleşmeyenler dizilerden oluştuğu için hipertermofilik gruptaki azalış ve ‘no relative’ oranındaki artış beklenen bir sonuç olmuştur. Daha detaylı ve doğru bir sonuç için ileri ve geri dizilerin analizi ayrı ayrı yapılmalıdır.

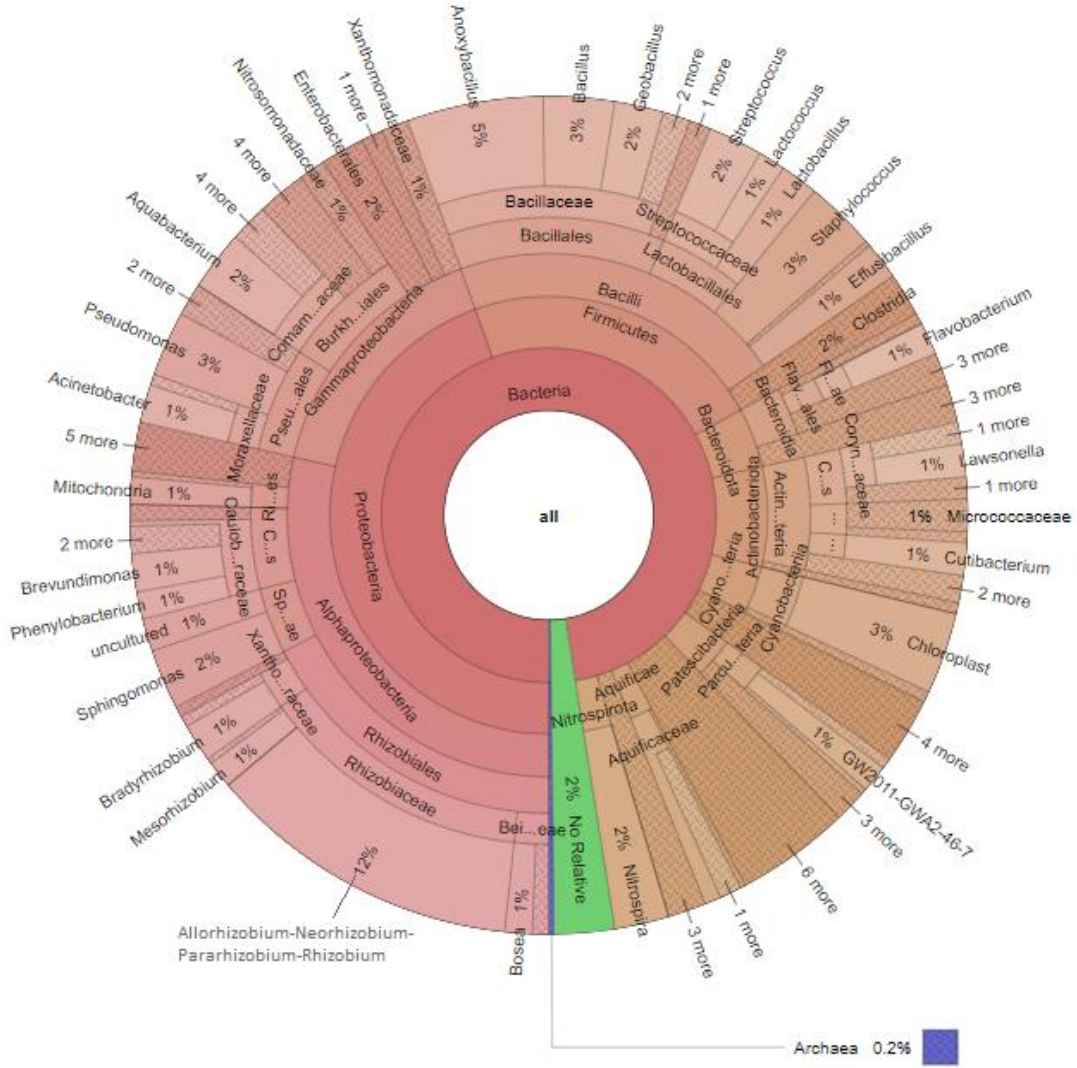


Şekil 6.21. 515 Nevşehir F 'c10.clean' örneğine ait Krona pasta grafiği



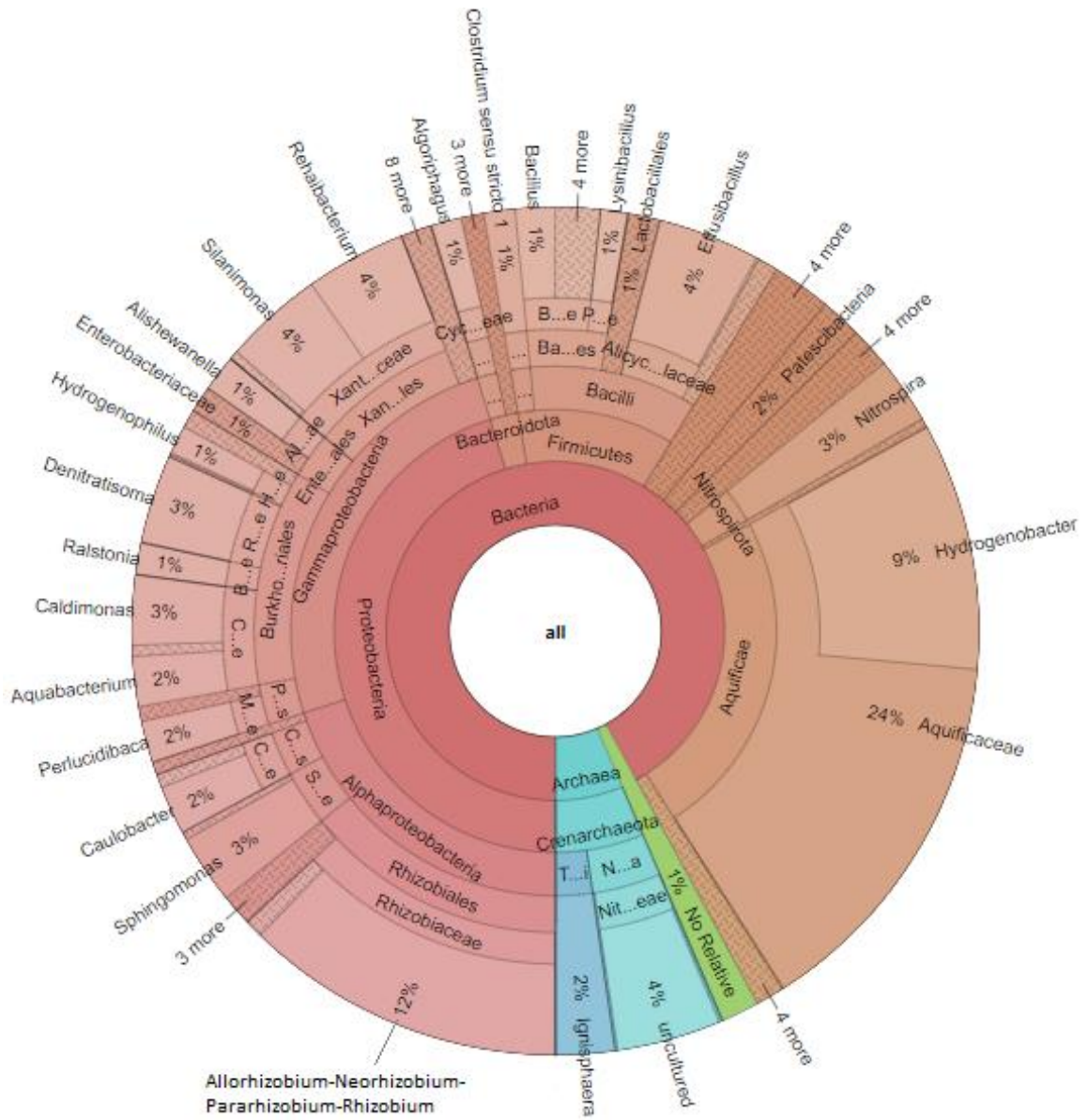
Şekil 6.22. 515 Nevşehir R ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği

Şekil 6.21. ve Şekil 6.22. incelendiğinde, uygulanan diğer filtrelere kıyasla, ‘c10.clean’ filtresinin beklenen gruplar üzerinde daha çeşitli ve net sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. İleri ve geri okumalar kıyaslandığına ise ileri yönlü dizi analizinde Thermoprotei gibi yine bu arazi çalışmasında beklenen bir eşleşme sonucu alınmıştır.

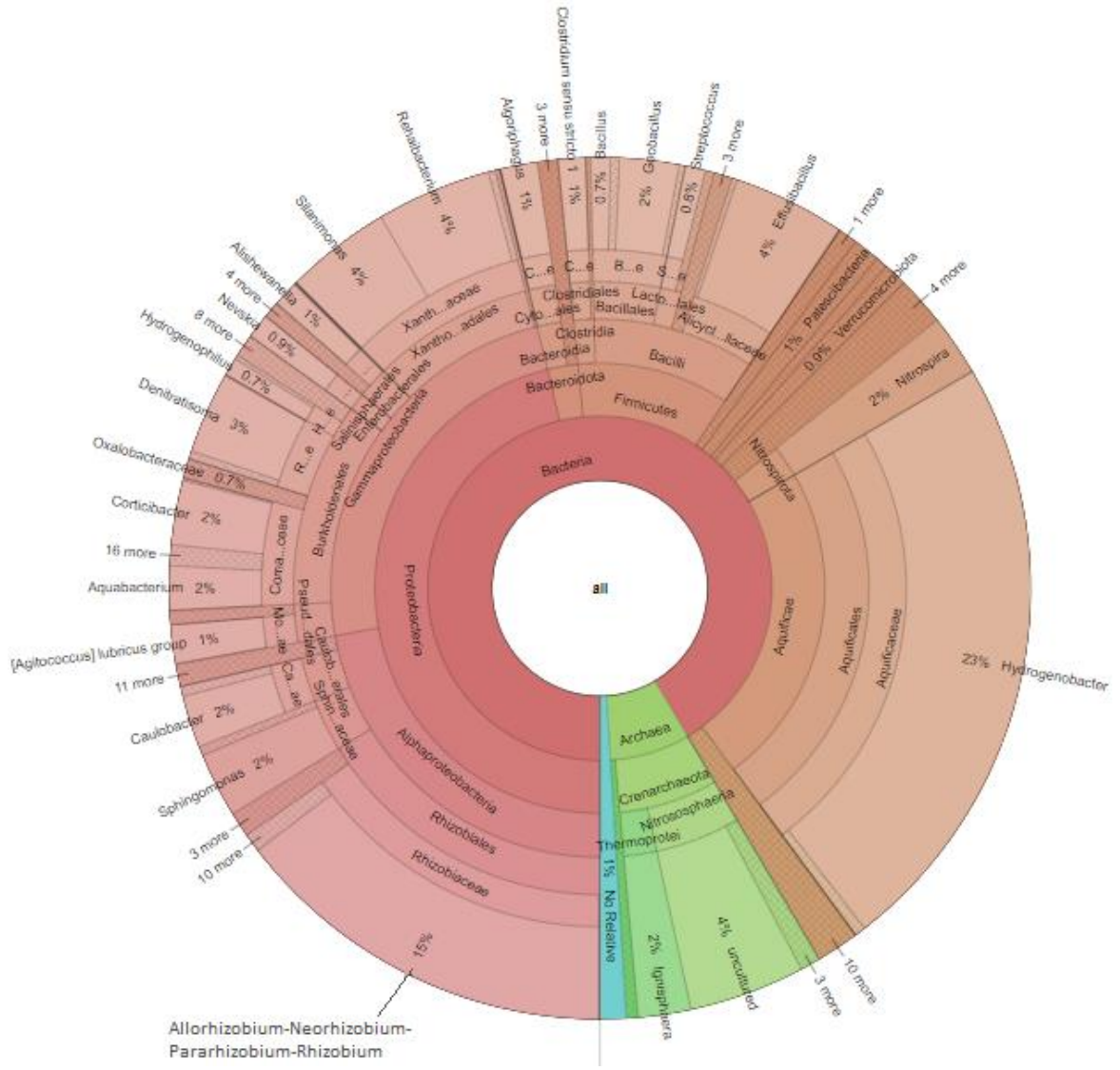


Şekil 6.26. 16sV3 Kızılcahamam 'c10.clean' örneğine ait Krona pasta grafiği

16sV3F-R primerleri ile çoğaltılmış Kızılcahamam örneklerinden elde edilen grafikler sonucunda, Nevşehir örneklerinde olduğu gibi, 'c10' filtresi uygulanmış verilerde uygulanmayanlara kıyasla 'no relative' dizi oranlarının azaldığı görülmektedir. Uygulanan filtrelerin sayısı arttıkça grafikteki dilim sayıları da artmıştır. Ancak yüksek sıcaklarda yaşadığı ve verilerde elde edilmesi beklenen hipertermofil ve termofil cinslerine düşük oranda rastlanmıştır.

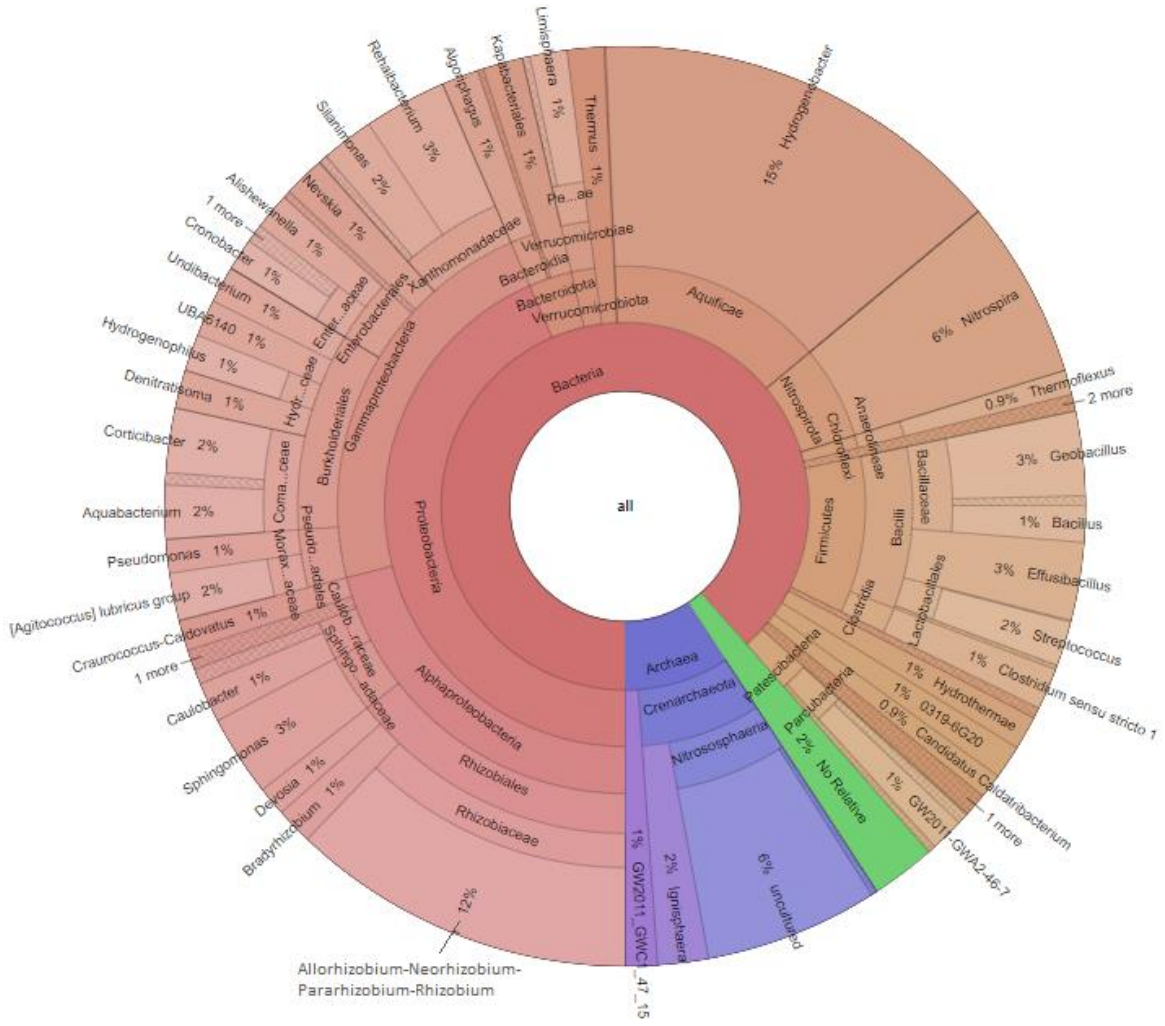


Şekil 6.27. 515 Kızılcahamam F 'uniq' örneğine ait Krona pasta grafiği



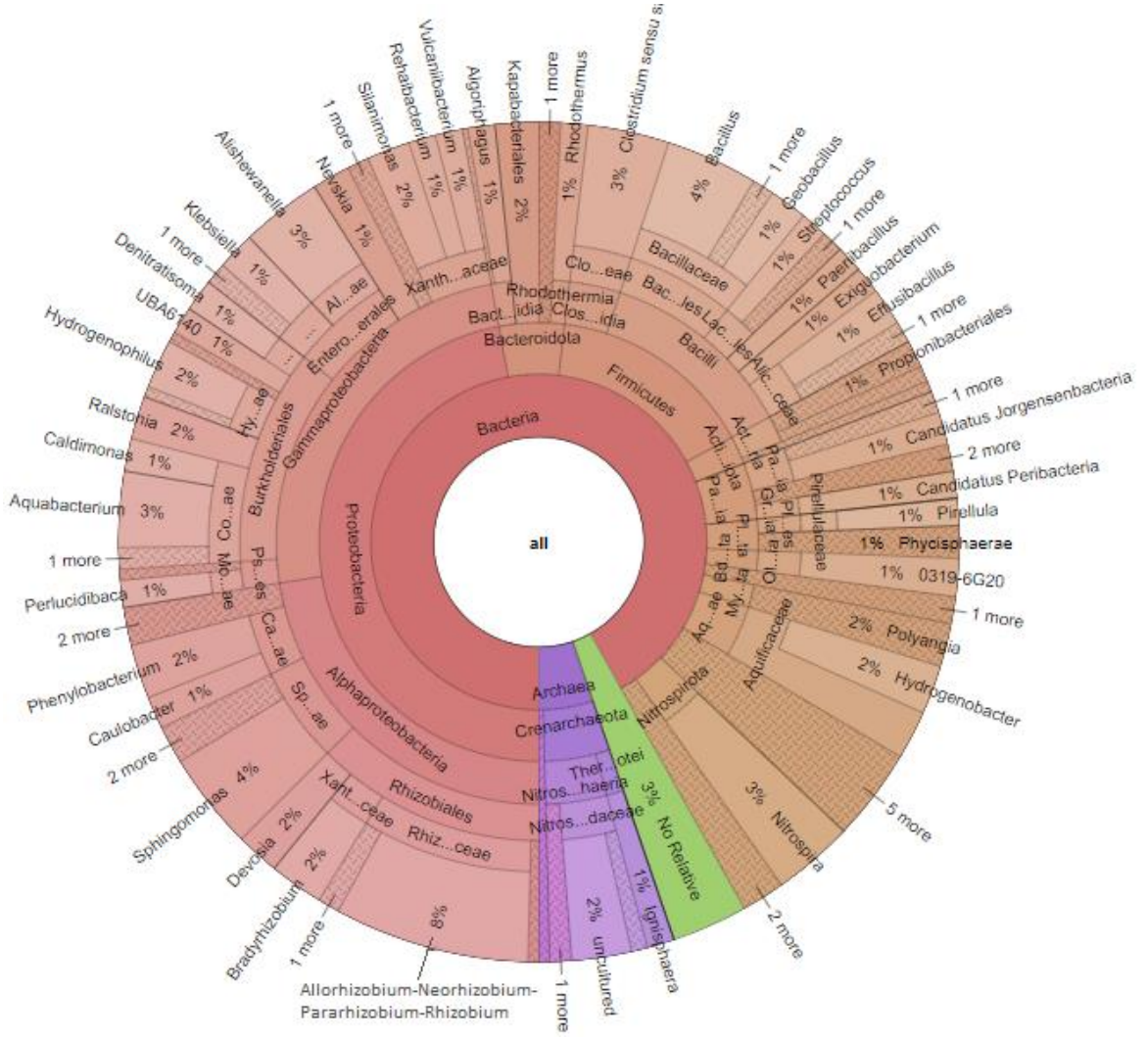
Şekil 6.28. 515 Kızılcahamam R ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği

Şekil 6.27. ve Şekil 6.28. incelendiğinde Hydrogenophilus, Hydrogenobacter, Geobacillus gibi termofil grupların tespit edildiği görülmüştür. İleri ve geri yönde okuma sonuçları arasında büyük bir fark olmamakla beraber geri yönde okuma grafiğinde daha detaylanmış bir sonuç elde edilmiştir.

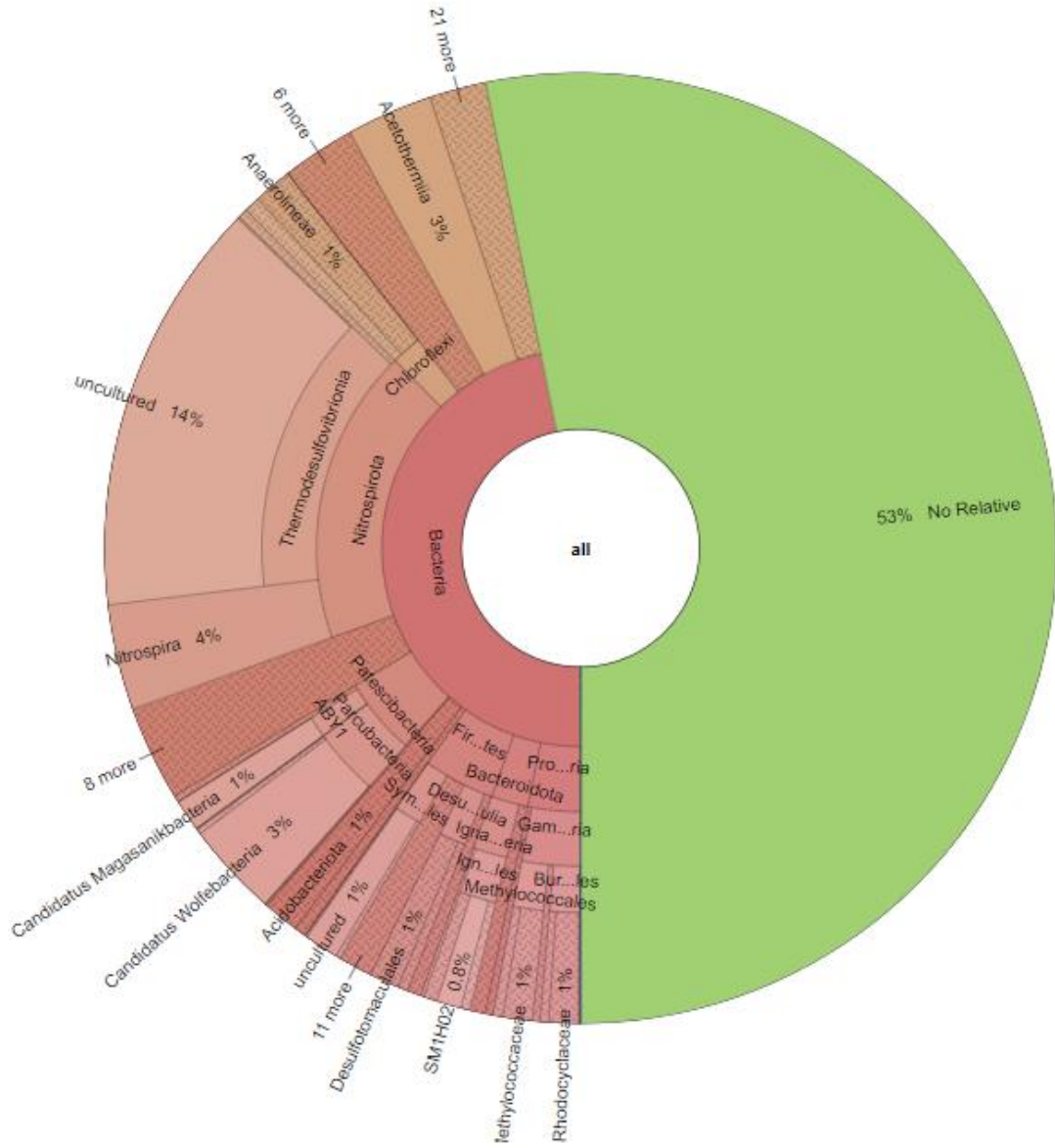


Şekil 6.30. 515 Kızılcahamam R ‘c10’ örneğine ait Krona pasta grafiği

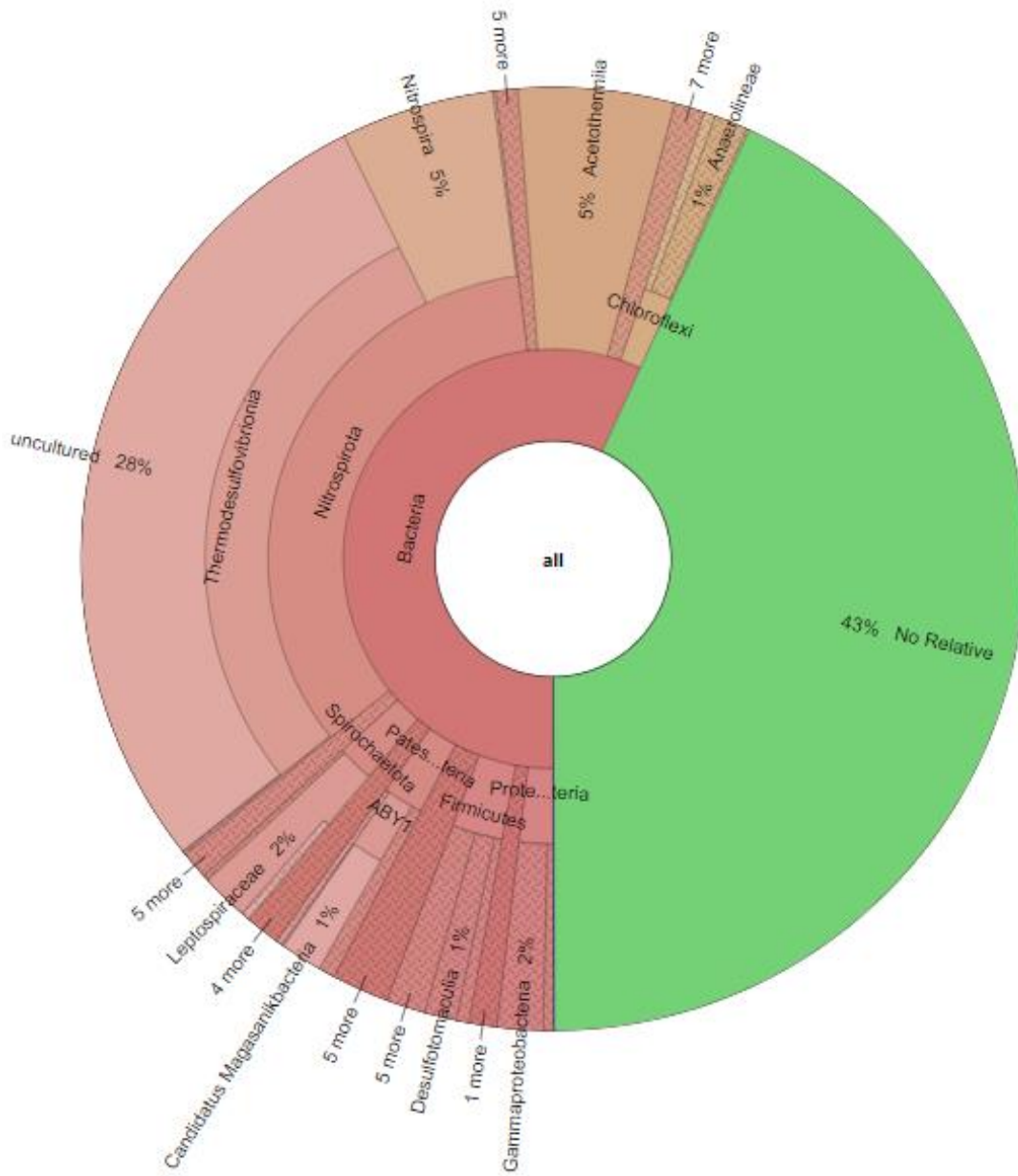
‘c10’ filtresinin uygulanmasıyla beraber daha çeşitli Krona grafikleri elde edilmiştir. İleri ve geri yönde okumaların grafiği kıyaslandığında ise Şekil 6.30.’da görüldüğü gibi arke eşleşmelerinde büyük oranda bir artış olmuştur. Bu sonuçla beraber geri yönde okuma verisi grafiğinde daha fazla dilime yani eşleşme çeşitliliğinde artışa rastlanmıştır.



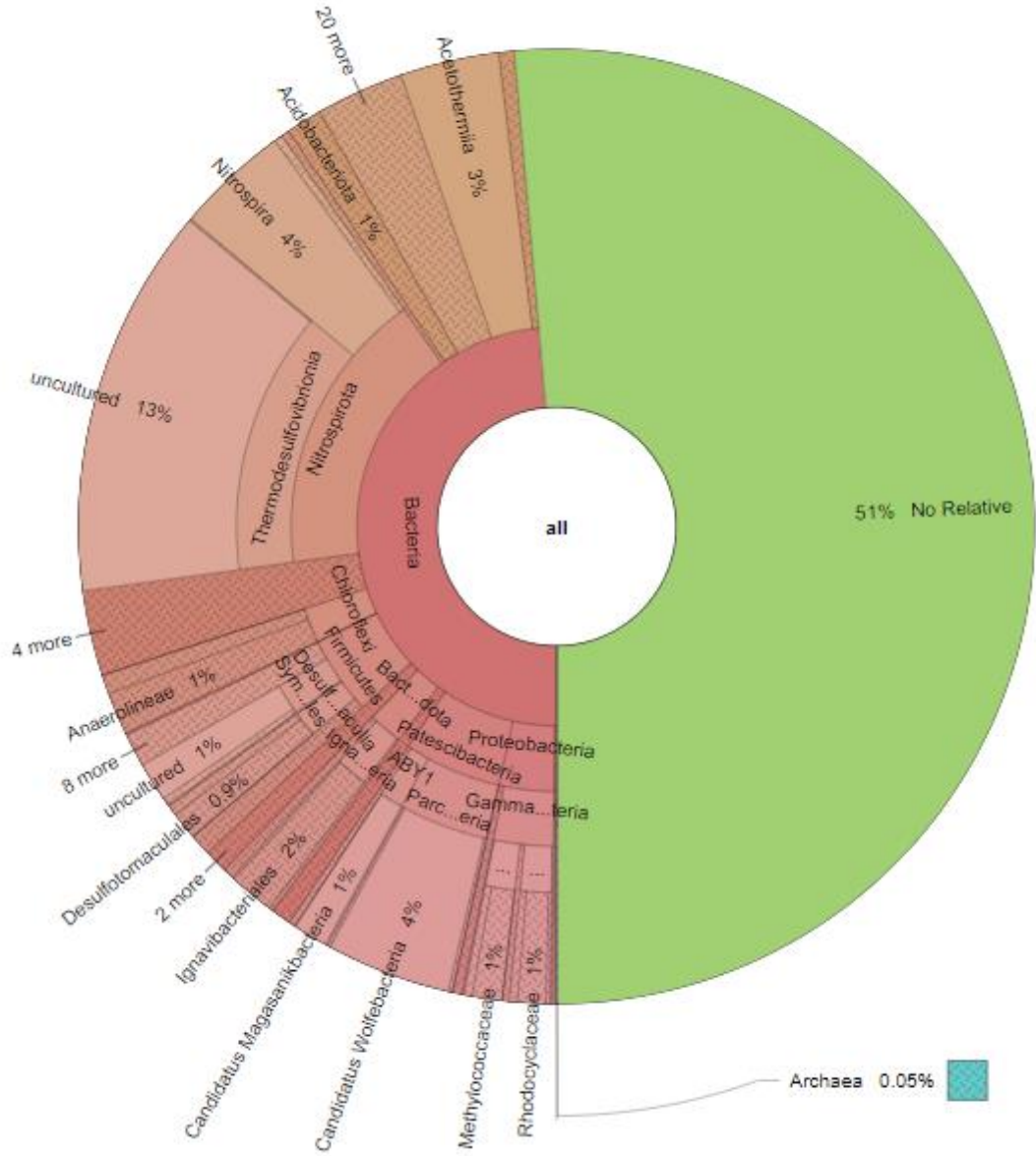
Şekil 6.32. 515 Kızılcahamam F 'c10.clean' örneğine ait Krona pasta grafiği



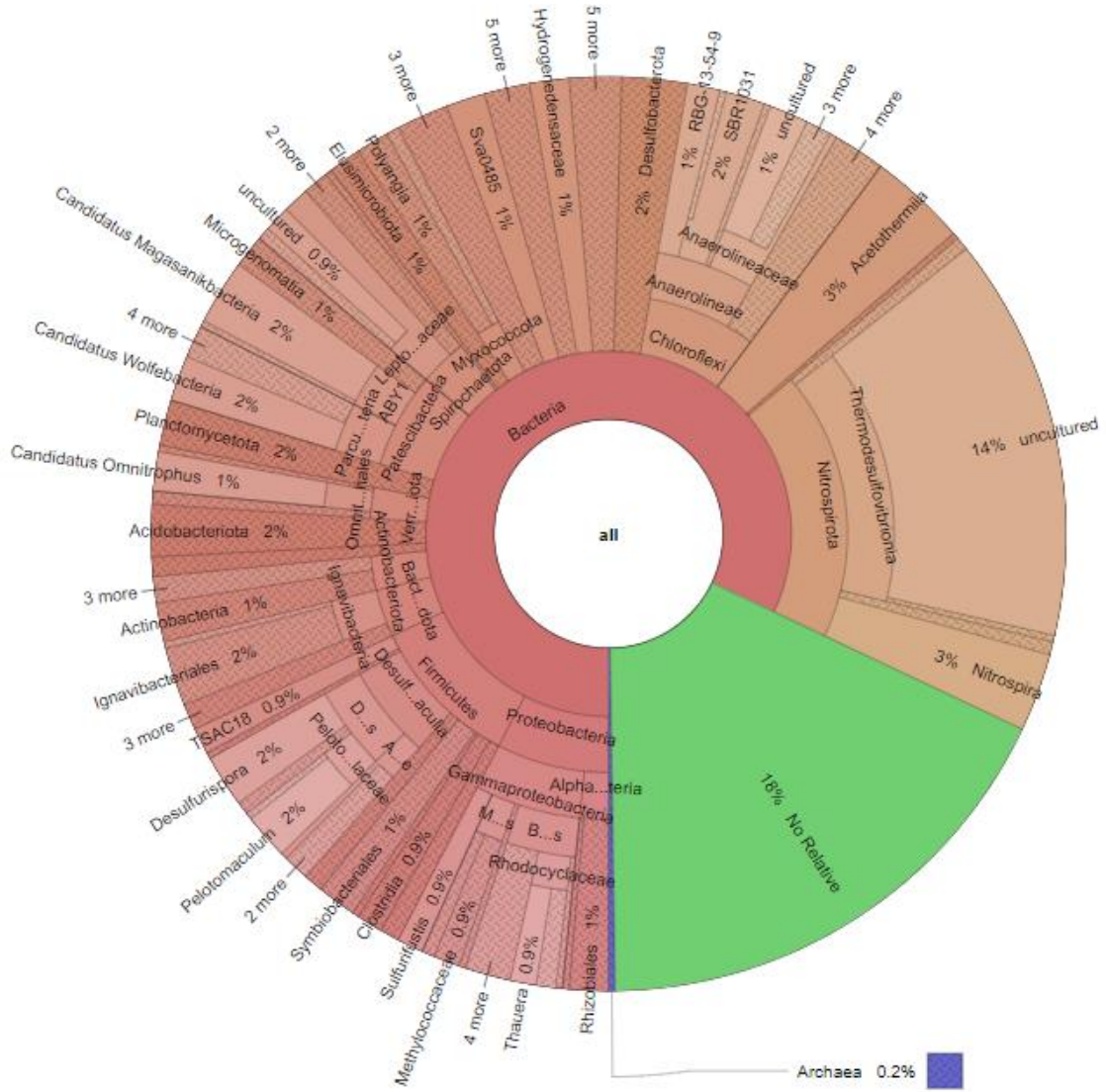
Şekil 6.34. 16sV3 Yozgat ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği



Şekil 6.35. 16sV3 Yozgat 'c10' örneğine ait Krona pasta grafiği

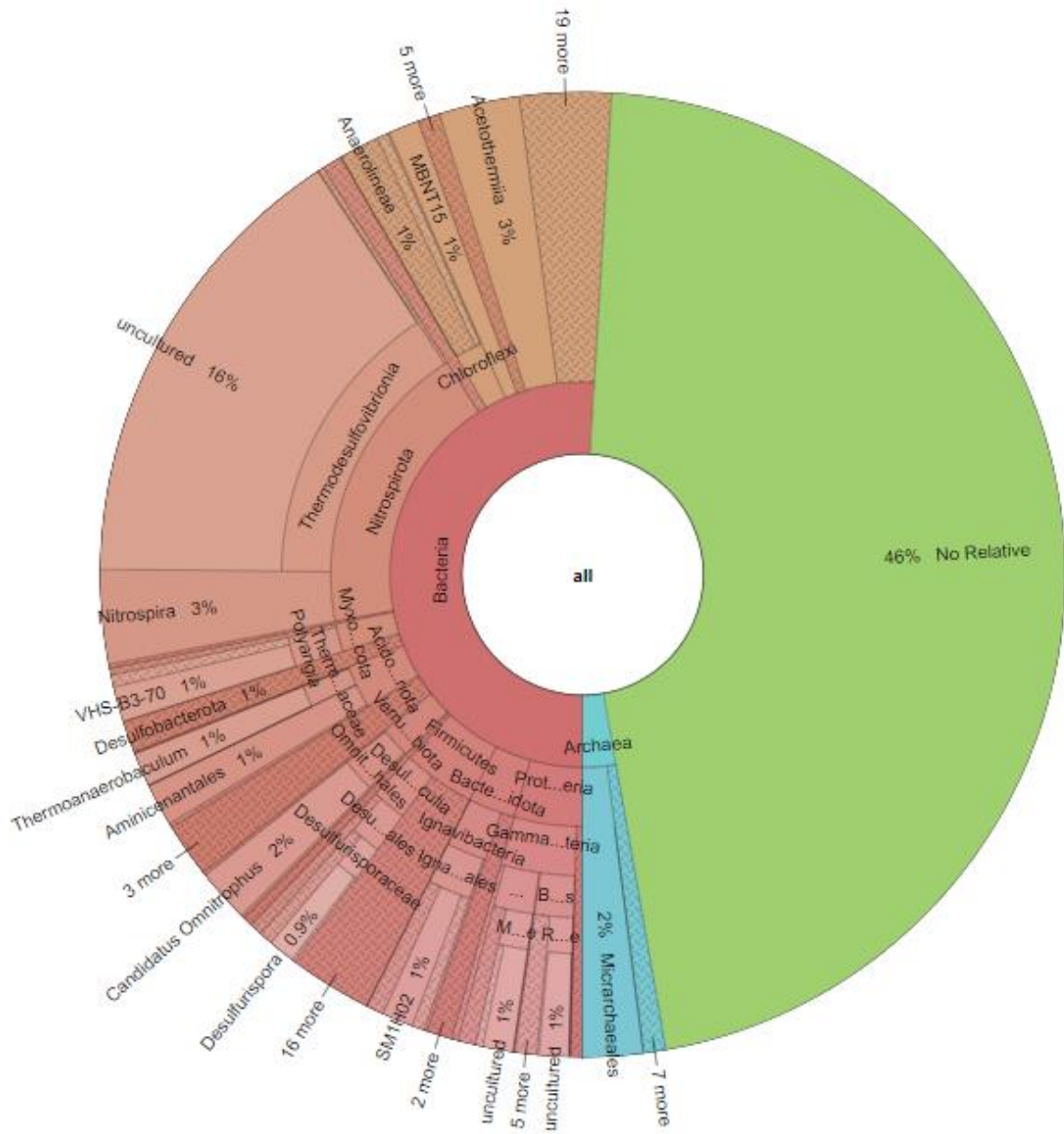


Şekil 6.36. 16sV3 Yozgat ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği

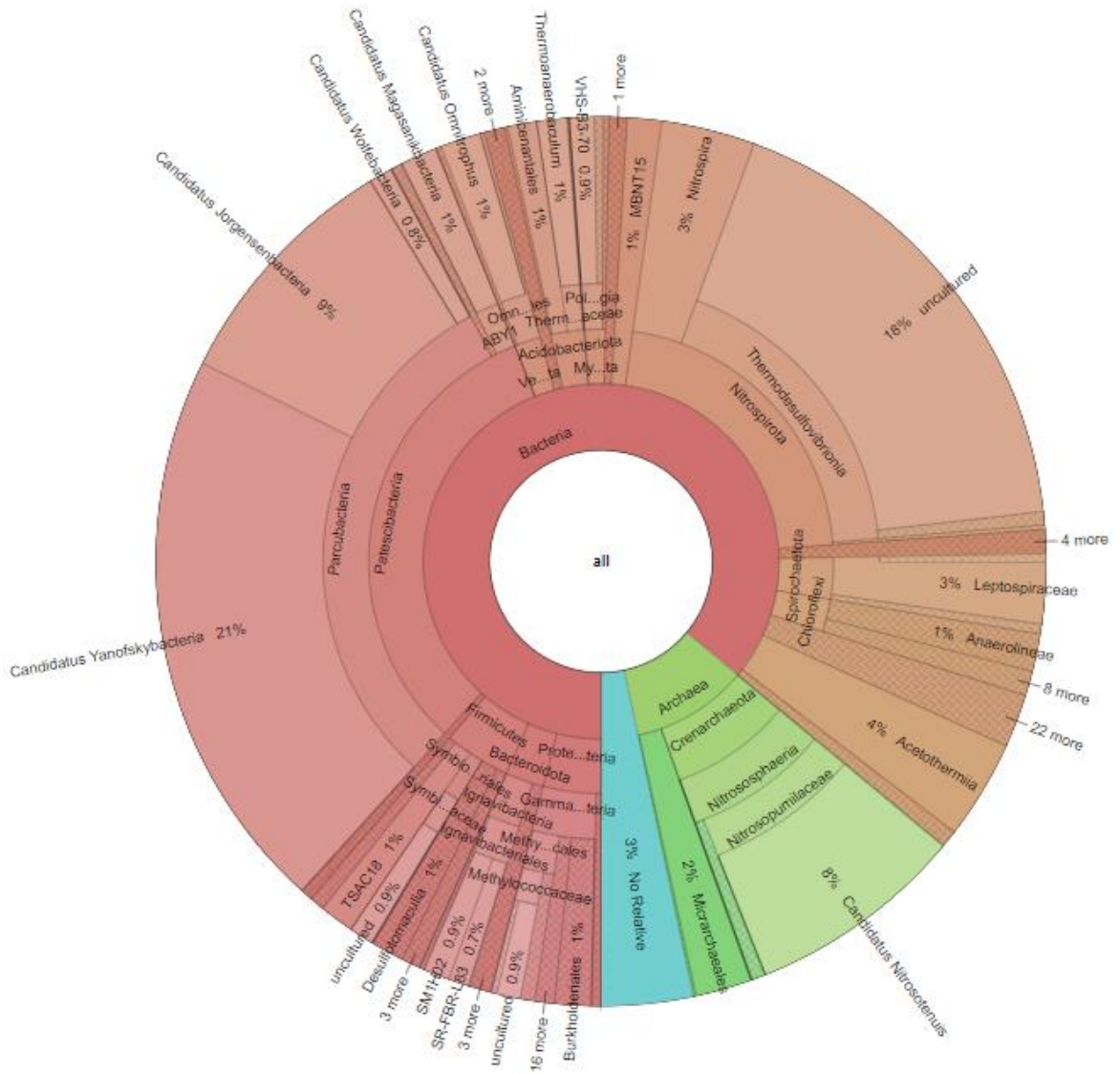


Şekil 6.37. 16sV3 Yozgat ‘c10.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği

16sV3F-R primerleri ile çoğaltılmış Yozgat örneklerinden elde edilen grafikler sonucunda, negatif, Nevşehir ve Kızılcahamam örneklerinde olduğu gibi, ‘c10’ filtresi uygulanmış verilerde uygulanmayanlara kıyasla ‘no relative’ dizi oranlarının azaldığı görülmektedir. Uygulanan filtrelerin sayısı arttıkça grafikteki dilim sayıları da artmıştır.

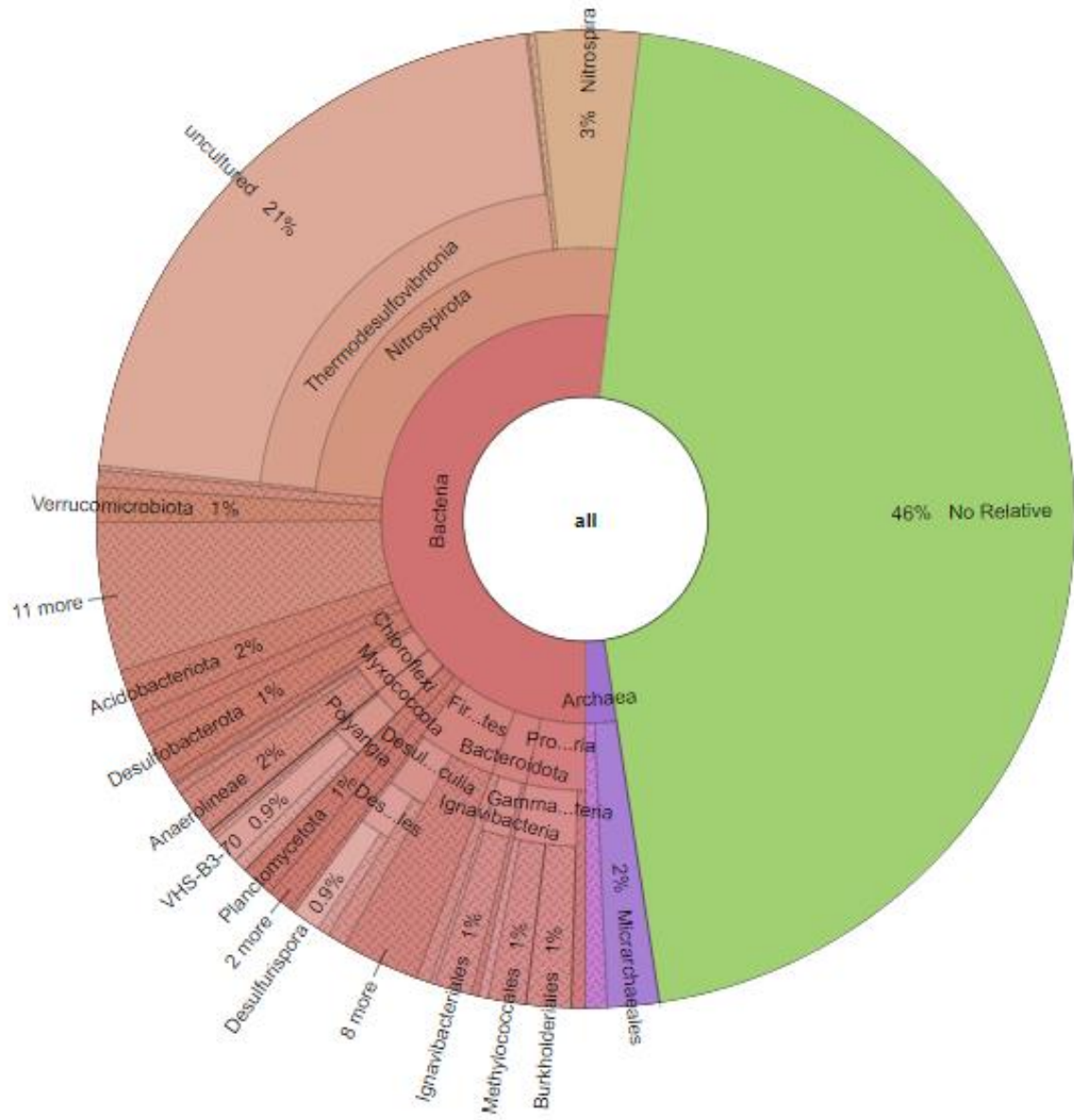


Şekil 6.38. 515 Yozgat F ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği

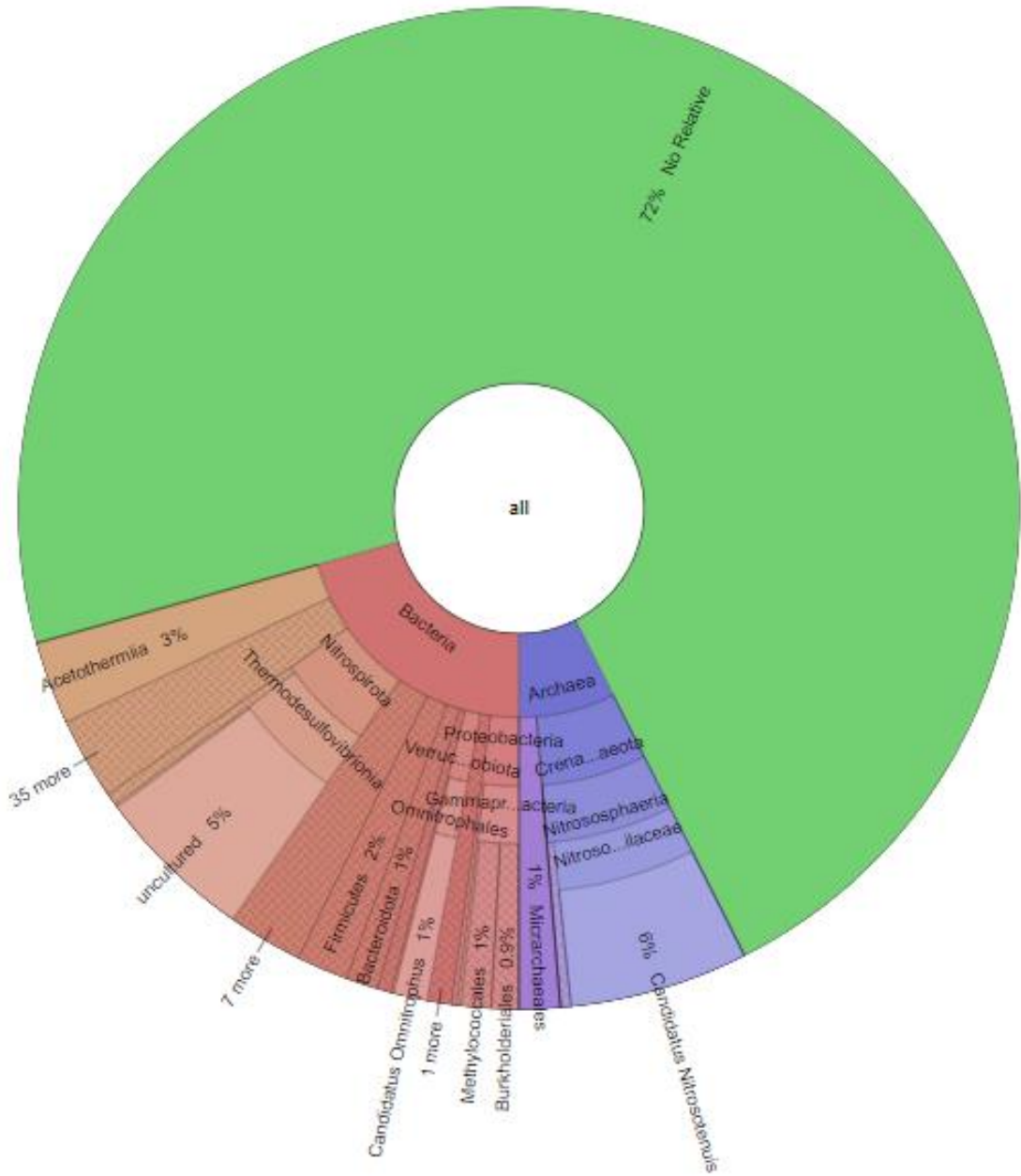


Şekil 6.39. 515 Yozgat R ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği

Şekil 6.38. ve Şekil 6.39. incelendiğinde geri yönde okuma verilerinin hem ‘no relative’ hem de tespit edilen arke yüzdesi bakımından ileri yönde okuma sonuçlarından oldukça farklı olduğu görülmektedir. Grafikler detaylı incelendiğinde geri yönde okumaların büyük bir yüzdesini Parcubacteria ailesine ait cinsler oluştururken, ileri yönde okuma grafiklerinde bu aileye rastlanmamıştır. Bu ailenin V4 bölgesinin eşleştirilen veri tabanında bulunması veya 806R primerinin bu aile bakımından daha seçici olmasının bu duruma yol açtığı sonucuna varılabilir.

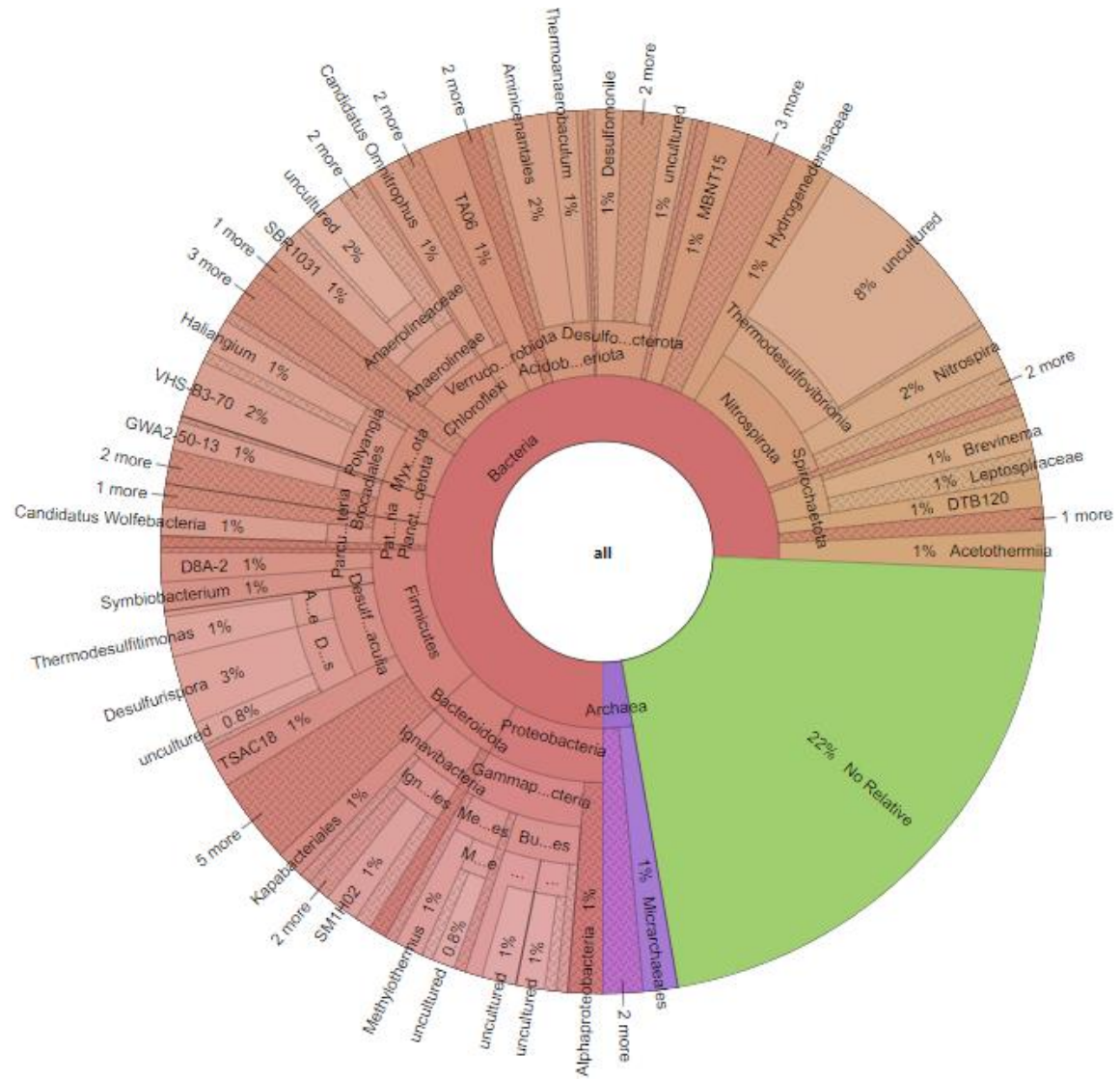


Şekil 6.40. 515 Yozgat F 'c10' örneğine ait Krona pasta grafiği

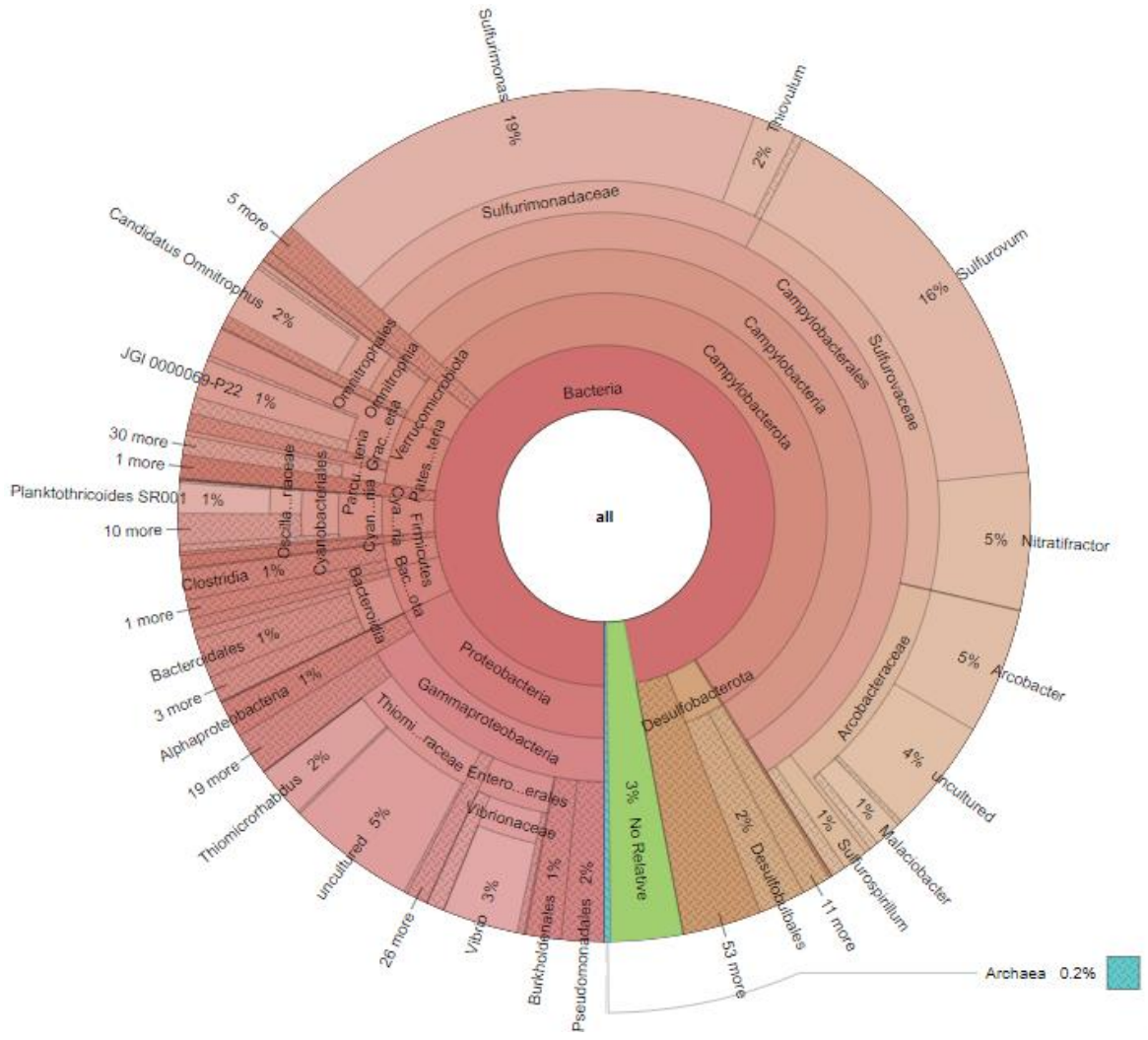


Şekil 6.42. 515 Yozgat ‘uniq.clean’ örneğine ait Krona pasta grafiği

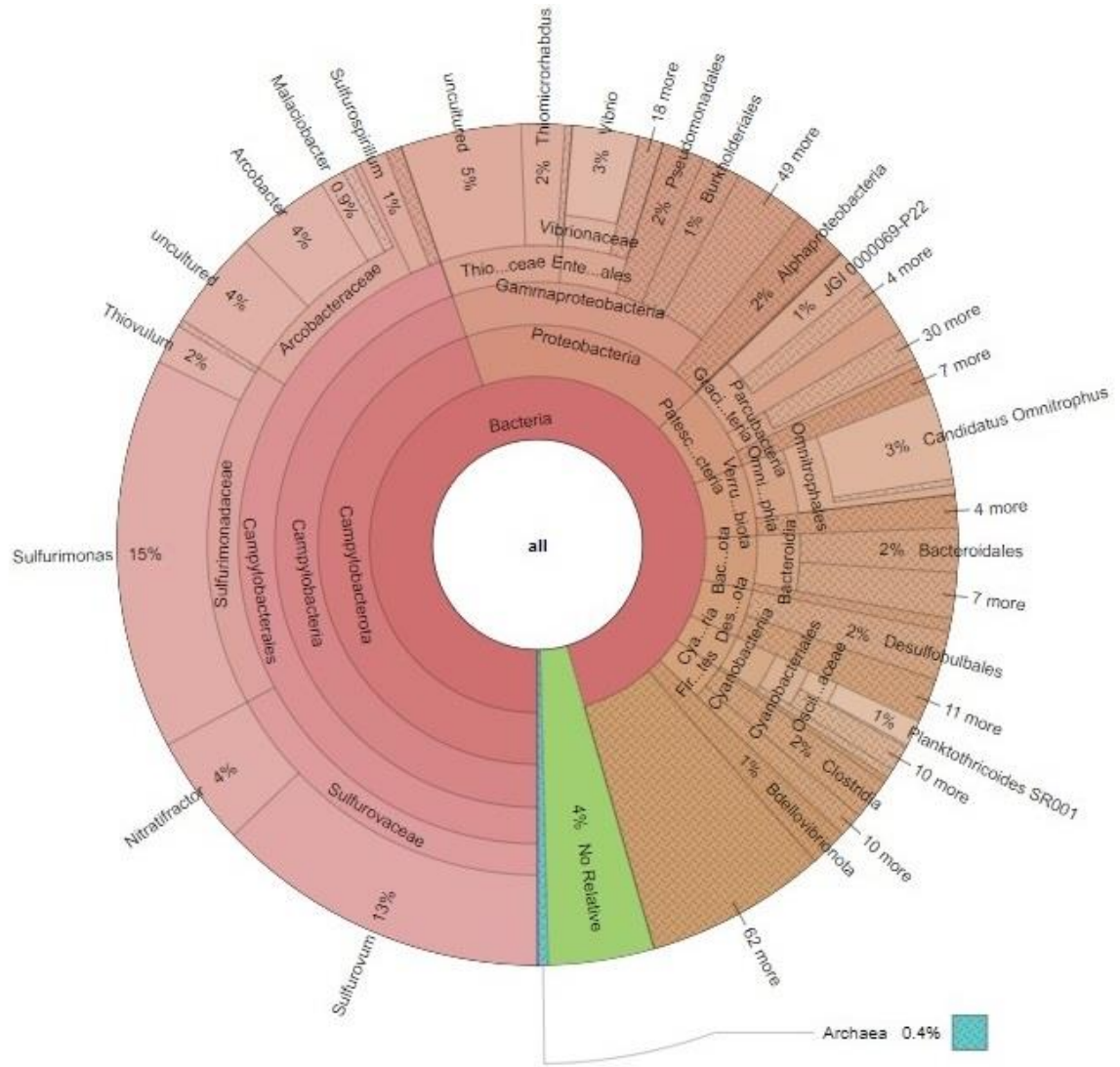
‘uniq.clean’ verisinden elde edilen sonuç önceki analizlerde olduğu gibi ‘no relative’ oranında artış, kalan grupların çeşitliliğinde azalış ile sonuçlanmıştır. İleri ve geri okumaların birleştirilmeden ayrı ayrı analiz edilmesi gerektiği bir kez daha görülmektedir.

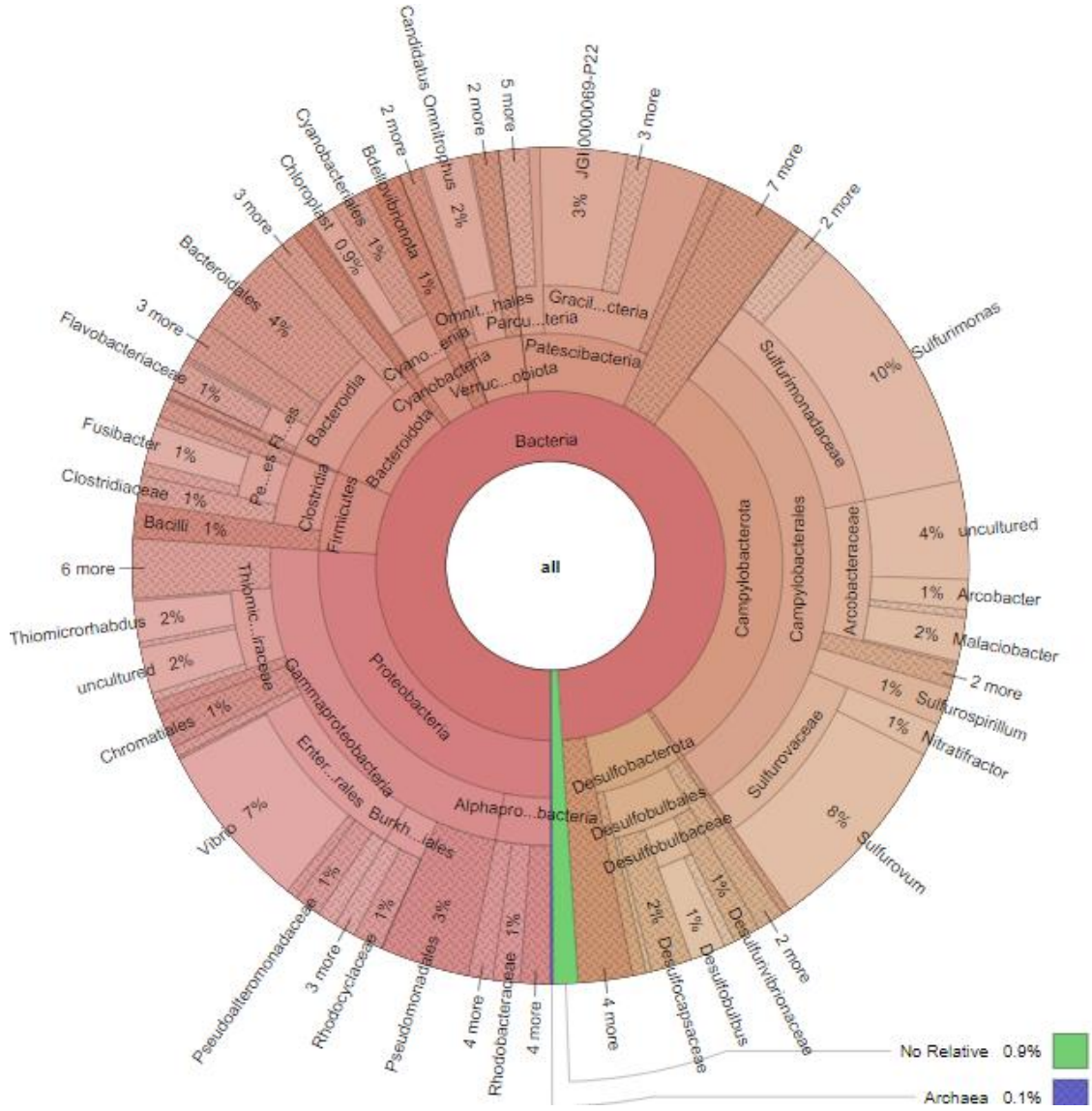


Şekil 6.43. 515 Yozgat F 'c10.clean' örneğine ait Krona pasta grafiği



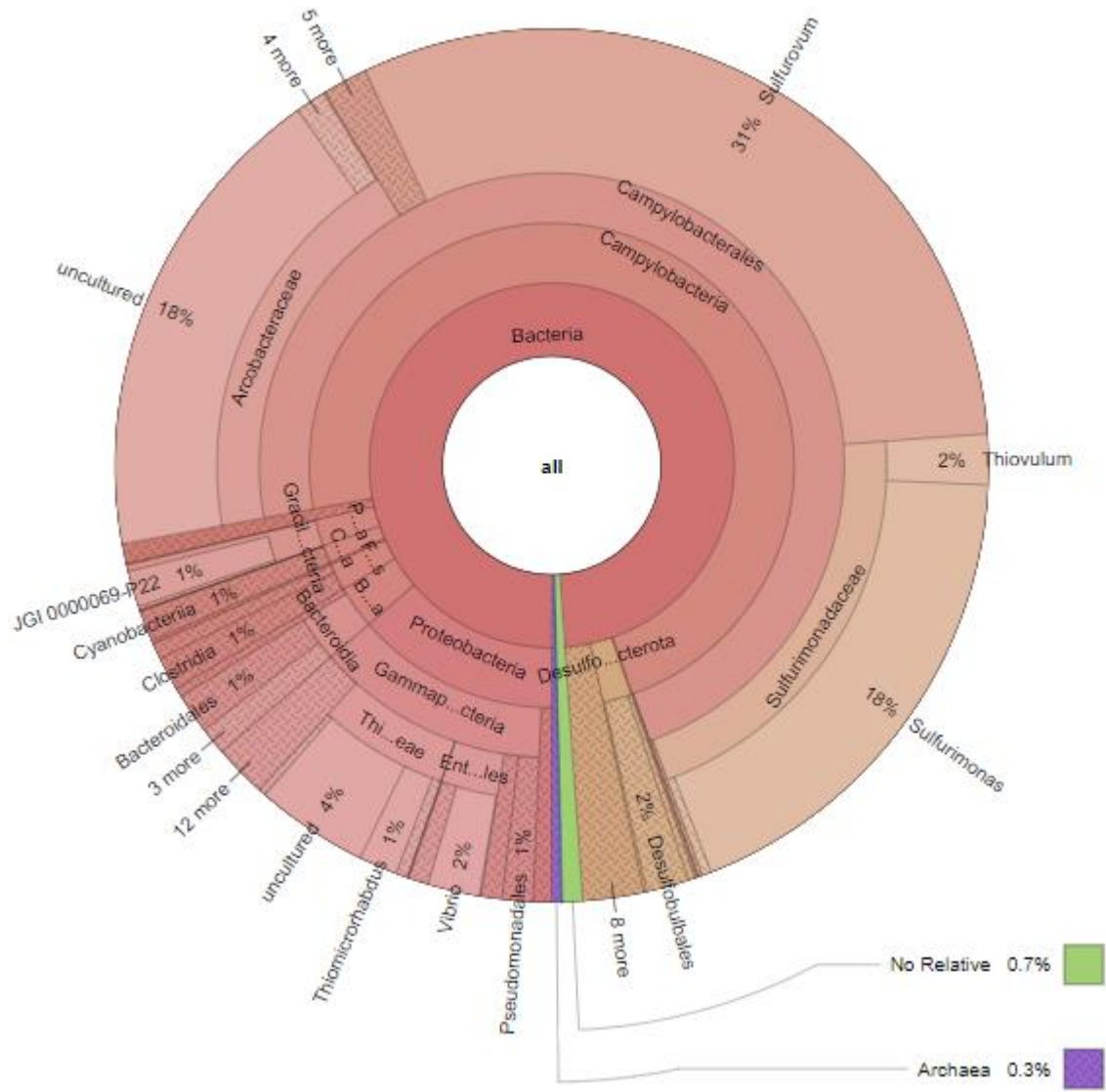
Şekil 6.45. 16sV3 Dalaman ‘uniq’ örneğine ait Krona pasta grafiği



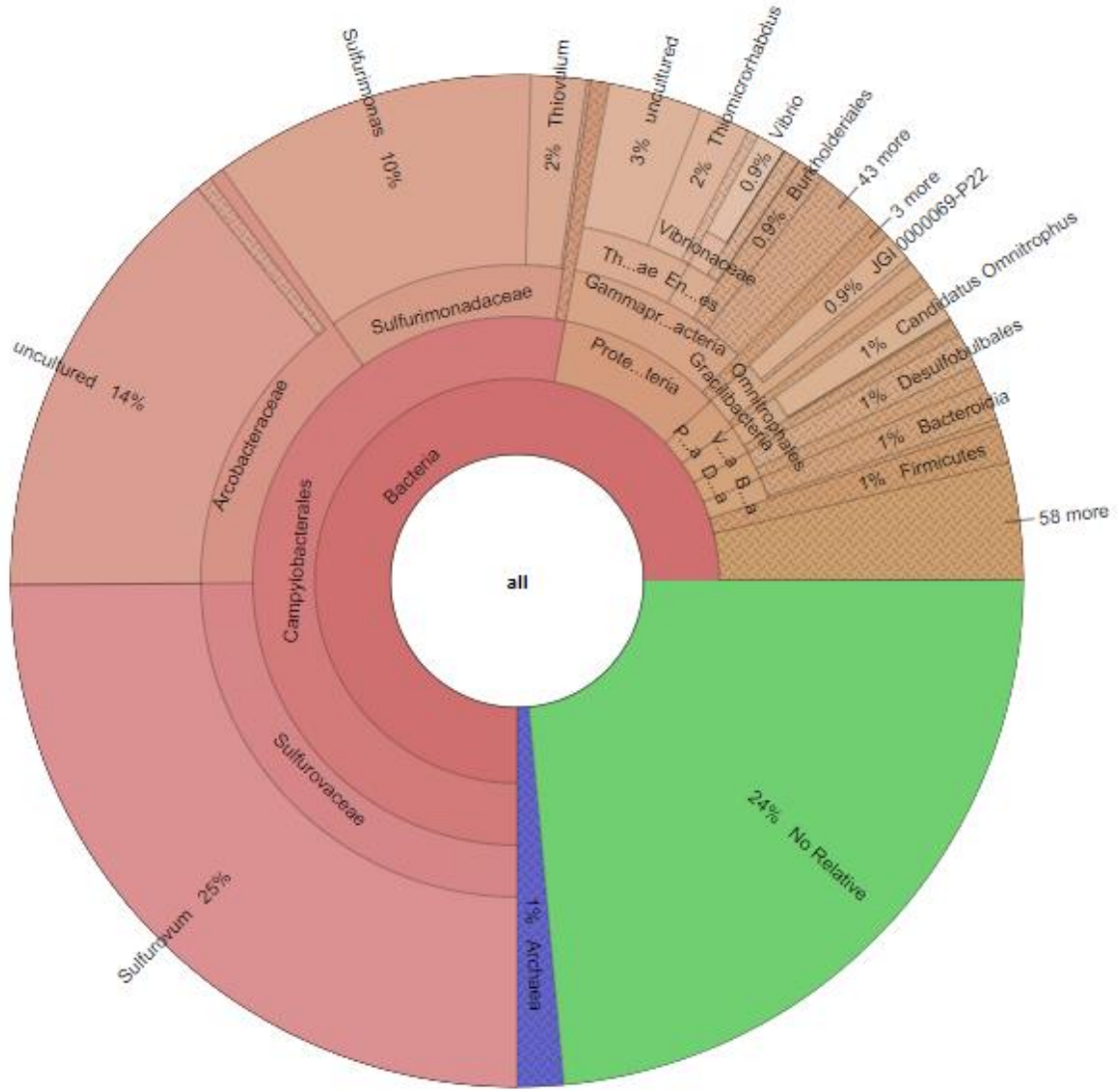


Şekil 6.48. 16sV3 Dalaman 'c10.clean' örneğine ait Krona pasta grafiği

16sV3F-R primerleri ile çoğaltılmış Dalaman örneklerinden elde edilen grafikler sonucunda, diğer örneklerde olduğu gibi, 'c10' filtresi uygulanmış verilerde uygulanmayanlara kıyasla 'no relative' dizi oranlarının azaldığı görülmektedir. Uygulanan filtrelerin sayısı arttıkça grafikteki dilim sayıları da artmıştır.



Şekil 6.51. 515 Dalaman F 'c10' örneğine ait Krona pasta grafiği



Şekil 6.53. 515 Dalaman 'uniq.clean' örneğine ait Krona pasta grafiği

Bu çalışmadaki tün 'uniq.clean' verileri gibi Dalaman'a ait bu veride de 'no relative' oranında büyük bir artış ve kalan grupların çeşitliliğinde de azalış gözlemlenmiştir. Bu veriyle birlikte 515F-806R okumaları için ileri ve geri dizilerinin ayrı olarak analiz edilmesinin gerekliliği net bir şekilde ortaya konmuştur.

6.1.1. ÇEVRESEL DNA METABARKODLAMA İLE TERMAL KAYNAK MİKROBİYOMUNUN ÇIKARILMASI

Bu tez çalışmasına 3 arke, 3 bakteri ve 1 prokaryot olmak üzere 7 çift primerle başlanmış olup 2 bakteri primeri ile analizler tamamlanmıştır. İzolasyon tekniğinin arkelere uygun olmaması, DNA kirliliğinin yüksek olmasından dolayı polimeraz zincir reaksiyonunun inhibe olması veya izole edilen arke DNA miktarının pcr'de çoğaltmak için yeterli olmaması gibi sebeplerden ötürü arke ve prokaryot primerleri ile kurulan reaksiyonlardan sonuç alınamamış olabilir. Mikrobiyom çalışmalarında sıklıkla kullanılan 16sV3F-R ve 515F-806R primerleri çoğalttıkları bölge bakımından (sırasıyla V3 ve V3-V4) çeşitliliği en iyi yansıtan primerlerdir ve bu tez çalışmasında en iyi sonucu vermişlerdir. 16sV3F-R primer çifti, bakteri eşleşmelerinde daha fazla cins ile eşleşme verirken 515F-806R primer çifti çoğu arazi örneklemeğinde 16sV3F-R'e yakın sayılabilecek bir oranda bakteri eşleşmesi vermesinin yanı sıra arkelerle de eşleşme sonucu vermiştir. 515F-806R primerleri ile elde edilen sonuçlar dikkatli incelendiğinde geri yönlü okumalar yani V4 bölgesine ait okumalar ileri yönlü okumalara kıyasla daha fazla eşleşme vermiştir. Ancak OTU sayısı bakımından incelendiğinde ileri yönlü okumaların oranları geri yönlü okumalardan daha fazladır. Arke bakımından incelendiğinde ise Kızılcahamam ve Yozgat arazilerinde geri yönlü okumalar daha iyi arke sonucu verirken Nevşehir arazisinde ileri yönlü okumada daha fazla arke eşleşme yüzdesine rastlanmıştır. Tüm bunlardan varılacak sonuç 16sV3F-R primer çifti kullanılmasına karar verilmesi halinde arkelere ulaşamayacağı ve 515F-806R primer çifti kullanılması halinde ileri ve geri yönlü okumaların ayrı ayrı analizinin yapıp yorumlanması gerektiğidir.

6.1.2. FİZİKOKİMYASAL FARKLILIKLARIN MİKROBİYOMA YANSIMASI

Bu tez çalışması kapsamında incelenen 4 araziye ait suların fizikokimyasal analiz sonuçları 5.1. basamağındaki çizelgelerde belirtilmiştir. Özetle; Nevşehir-Kozaklı ve Anakra-Kızılcahamam termal kaynaklarının hipertermofillere, Yozgat-Boğazlıyan termal kaynağının termofil ve sülfat/nitrat oksidasyonu yapan bakterilere ve Muğla-Dalaman termal kaynağının halofil ve ekstremofillere ev sahipliği yaptığı hipotezi kurulmuştur. SILVAngs çevrimiçi sistemi yardımıyla elde edilen eşleşmelere göre bu hipotez doğrulanmış olup sonuçların listesi 5.3. basamağındaki Çizelge 5.29.'dan Çizelge 5.32.'ye

kadar her bir arazi için özetlenmiştir. Nevşehir örneğinden elde edilen sonuçlar bu kaynaktaki mikrobiyal yaşamın *Caldimicrobium*, *Geothermobacterium*, *Geobacillus*, *Thermodesulfobacterium* ve *Deinococcus* gibi hipertermofil ve termofiller, Kızılcahamam'da *Ignisphaera*, *Nitrospira*, *Hydrothermae*, *Hydrogenobacter*, *Denitratisoma* gibi hipertermofil, termofil ve nitrat bakterileri, Yozgat'ta *Nitrospirota*, *Methylothermus*, *Desulfotomacula*, *Aminicenantales*, *Candidatus Nitrosotenuis* gibi termofil ve sülfür bakterileri ve Dalaman'da *Malaoiobacter*, *Sulfurovum*, *Arcobacter*, *Hyprocyclius*, *Halarcobacter* gibi halotolerant ve sülfür bakterilerince baskın olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlardan hareketle termal kaynak sularında meydana gelen sıcaklık veya kimyasal içerik farklılıklarının mikrobiyomu nasıl etkilediği gösterilmiştir.

6.1.3. BİYOİNFORMATİK İŞ AKIŞI

Elde edilen ham veriler kalite kontrolleri yapıp primerlerinden temizlendikten sonra birçok filtreleme parametresi kullanılmıştır; tekrar eden dizilerin çıkarılması (uniq), 10'dan daha az tekrarı olan dizilerin veri setinden çıkarılması (c10), tekrar eden dizilerden pqr ve sekanslanma hatalarının temizlenmesi (uniq.clean) ve 10'dan daha fazla tekrarı olan dizilerden pqr ve sekanslanma hatalarının temizlenmesi (c10.clean). Her bir arazi ve primer için ayrı ayrı uygulanan bu 4 filtrenin analizleri SILVAngs sistemi aracılığıyla tamamlanmıştır. Bu tez çalışmasının dizileme aşamasında Illumina NextSeq 550 cihazı ve 2x150 bp okuma boyu kullanılmasından ötürü yaklaşık 200 bp uzunluğunda ürün veren 16sV3F-R primerleri ile çoğaltılmış dizilerin ileri ve geri yönde okumaları birleştirilebilirken yaklaşık 300 bp uzunluğunda ürün veren 515F-806R primerleri ile çoğaltılmış dizilerin ileri ve geri yönde okumalarının düşük bir yüzdesi birleştirilebildiğinden dolayı uniq.clean dışındaki tüm filtrelerin analizleri ileri ve geri okumalar ayrı olacak şekilde tamamlanmıştır. Tüm arazi sonuçlarında görülmektedir ki 16sV3F-R primerine ait analizlerde 'c10.clean' filtresi daima daha temiz sonuçlar vermiştir. 515F-806R primerleri ile elde edilen analizlerde ise sonuçların arazilere göre farklılık gösterdiği görülmüştür. Genel bir çerçeveden bakıldığında OTU ve eşleşmeyen dizi sayısı bakımından 16sV3 sonuçlarında olduğu gibi 'c10.clean' filtresinin daha iyi sonuç verdiği düşünülebilir. Ancak her bir arazi çift yön olarak tek tek incelendiğinde ileri yönde okumalarda daha çeşitli bakteri sonucu alınırken geri yönde okumalarda 'no relative' olarak ifade edilen veri tabanı ile eşleşmeyen dizilerin oranında gözle görülür bir

düşüş gözlemlenmiştir. Kızılcahamam ve Yozgat örneklerinde geri yönlü okumalarda arke oranları artmış, Nevşehir örneğinde ise ileri yönlü okumalarda arke tespit edilmiştir. ‘c10’ filtresi her arazinin mikrobiyom çeşitliliği için daha genel bir tablo ortaya koyarken ‘c10.clean’ filtresi çok daha detaylı ve anlaşılması zorlaşan bir grafik oluşturmuştur. Elde edilen farklı arazi, farklı primer ve farklı biyoinformatik filtrasyonlar sonucunda oluşturulacak biyoinformatik iş akışının araştırma sorusuna bağlı olarak seçilmesi gerektiği düşünülmektedir. Bir ekosistemdeki mikrobiyom çeşitliliğini bakteri özelinde genel hatlarıyla ortaya çıkarmak isteyen araştırmacı 16sV3F-R primerleri ve ‘c10’ filtresini kullanabilecekken; prokaryotların detaylı listesini çıkarmak isteyen araştırmacı 515F-806R primerleri ve ‘c10.clean’ filtresini kullanarak yapacağı ileri ve geri yönlü okumalarının ayrı ayrı analizleri ile hedefine ulaşabilecektir.

6.2. SONUÇ

Yaşamın sınırlarını hem fiziksel ve coğrafik hem de değişime uyum sağlama kapasitesi açısından değerlendirebilmek için ekstrem ortamların incelenmesi büyük bir önem teşkil etmektedir. Dünya üzerindeki ekstrem yaşamın sınırlarını anlamak gezegenimizdeki yaşamın kökenlerini aydınlatmanın yanı sıra endüstriyel olarak fayda sağlayacak yeni türlerin keşfinde de belirgin bir rol oynamıştır (85). Doğaları gereği ekstrem ortamlar, içlerindeki biyolojik yaşamı incelemenin zor olduğu ortamlardır. Bu zorlukların sebebi ortamlara ulaşmadaki zorluklardan veya sahip oldukları jeokimyasal özelliklerden kaynaklanır (86). Termal kaynaklar dünya üzerindeki ekstrem ortamlardan biridir. Bu tez çalışması ile ekstrem ortam olarak nitelendirilen ve birbirinden fizikokimyasal yapıları itibarıyla farklı olan 4 termal kaynağın mikrobiyomları çıkarılmış olup her bir kaynaktan elde edilen sonuçlara göre bu ortamların birden fazla ekstremofil mikroorganizma cinsine ev sahipliği yaptığı ortaya çıkarılmıştır. Nevşehir ve Kızılcahamam termal kaynakları yaklaşık 90°C’ye sahip olup burada yaşayan mikroorganizmaların hipertermofil ve termofil cinslere ait olduğu gözlemlenmiştir. Yozgat termal kaynağı 52°C’ye sahip olup silikat asidi, bikarbonat gibi kimyasallar bakımından da zengindir. Burada tespit edilen cinsler termofil ve sülfat, nitrat, amonyum gibi bileşiklerin indirgenmesinde rol oynayan bakterileri kapsamaktadır. Dalaman termal kaynağı ise diğer kaynaklara kıyasla daha soğuk (yaklaşık 30°C) olup sodyum, klorür, sülfat ve arsenik bakımından zengin bir kaynaktır. Burada tespit edilen cinsler ise sülfür okside edebilme, tuza karşı tolerasyonu

yüksek olma ve toksik materyalde büyüebilme özelliklerine sahiptir. Bu kaynaklarda yapılacak kapsamlı çalışmalar ile gerek bilim dünyasına gerekse endüstriyel alanlara katkıda bulunabilecek birçok mikroorganizma tespit edilip faydalı araçlara dönüştürülebilir.

Mikrobiyal yaşam var olmak için birden fazla yolda evrilmiş ve bilinen hemen hemen her ortamda karşımıza çıkmıştır. Yapılan çalışmalar ile yalnızca çevrenin ekstrem ortamdaki yaşamı etkilemediğini, aynı zamanda mikrobiyal toplulukların da çevreyi manipüle ettiğini anladıkça ekstrem ekosistemlerin biyolojik aktiviteler ve çevresel faktörlerin geri bildirimiyle oluşmuş dinamik sistemler olduğu ortaya çıkmaktadır (87). Termal kaynak mikrobiyomları jeotermal ekosistemlerin şekillenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Termal kaynaklarda yaşayan mikrobiyal toplulukların yapıları ve işlevleri, toprak, deniz ve insan mikrobiyomu gibi jeotermal olmayan çevre mikrobiyomlarına kıyasla daha fazla benzersiz özelliklere sahiptir (88). Bu çalışma kapsamında tespit edilen ekstremofil mikroorganizmalar yalnızca o ortamlarda yaşamakla kalmayıp azot ve kükürt döngülerinde de önemli roller oynamaktadırlar.

Son 30-40 yıldır yapılan çalışmalar ekstrem ortamlardaki yaşam anlayışımızı şekillendirmekte ancak keşfedilmeyi bekleyen daha birçok şey bulunmakta. Termal kaynaklar gibi ekstrem ortamlarda yaşamaya uyum sağlamış canlıların fizyolojik ve metabolik adaptasyonlarının keşfi bir yana hâlâ bu ortamlardaki canlıların bir listesi bile çıkarılmış değil. Son yıllarda yeni nesil dizileme teknolojilerinin sağladığı destek sayesinde herhangi bir niş içerisinde yaşayan karışık mikrobiyal topluluklarının taksonomik bileşimleri kültür yöntemine başvurulmaksızın tespit edilmektedir. Bu yaklaşım ekstrem ortamlardan gıda sektörüne insanlar dahil olmak üzere ökaryotik organizmalar ile su ve toprak gibi habitatların analizi için başarıyla uygulanmaktadır (89).

DNA barkodlama türlerin tanınması için kısa ve standartlaştırılmış DNA dizilerinin kullanımını ifade eder. Araştırmacılar, DNA dizi bilgisinin ucuz ve kolay eldesini sağlayabildiği ve yeni nesil dizileme teknolojileri ile birlikte karmaşık morfolojik özelliklere aşina olmasını gerektirmeden organizmalara taksonomik isimlerini atayabildiği için DNA barkodlama tekniğini artan bir hızla birçok biyolojik alanda kullanmaktadır (90). Bireylerin örneklenmesinden (DNA barkodlama) toplulukların örneklenmesine (DNA

metabarkodlama) geçişte evresel DNA (eDNA)'nın hedeflendiği, kültür ve yakalama metotlarının kullanılmadığı yaklaşımların kullanılması gerekir. Mikrobiyal eşitliliği değerlendiren mevcut geleneksel yöntemler, doğru taksonomi tanımlaması ile yüksek verimli verileri belirleyemez. Örneğin, kültür yöntemleri, yalnızca kültüre edilebilir suşların izolasyonuna yöneliktir; denatüre edici gradyan jel elektroforez yöntemi, çok sayıda bulunan mikroorganizmaları tanımlamaya meyillidir ve terminal-kısıtlama fragman polimorfizmi, birçok operasyonel taksonomik birimi tespit eden ancak operasyonel taksonomik birimlerin taksonomilerini tam olarak tanımlamayan yüksek verimli bir yöntemdir (91). DNA metabarkodlama ve yeni nesil dizileme teknolojilerinin birlikte kullanılması ile elde edilen 16S rRNA klon kitaplıklarının dizilimi, yüksek verimli veriler üretir ve yeterli taksonomik bilgi sağlar (92). Bu teknolojilerin iş birliği sayesinde, geleneksel morfolojik yaklaşımlarla elde edilecek taksonomik verilerden çok daha hızlı veri elde ederek, çalışmaları çok daha büyük taksonomik gruplar ve daha geniş coğrafi bölgeler arasında ölçeklenebilir hale getirmiştir (93). Yapılan bu tez çalışması ekstrem ortamlardaki mikrobiyal çeşitlilik listelerinin çıkarılması için ön deneme niteliğinde olup evresel DNA metabarkodlama ve yeni nesil dizileme teknolojisinin bu alanda başarı gösterdiğini açıkça ortaya koymaktadır.

Mikrobiyom profili oluşturmada kullanılan metotlar numune toplama aşamasından başlayıp toplulukların hesaplamalı nicelleştirilmesine kadar süren iş akışındaki her adımda eşitlendiğinden dolayı uygulanan her bir protokolü optimize etmek ve uygun analizlere karar verip birleştirmek büyük bir önem taşımaktadır (94). Hem arazi hem deneysel hem de hesaplamalı protokollerdeki varyasyonlar, çalışma yapılacak ortam, canlı grupları ve teknolojik imkanlar ile şekillendiğinden ötürü 'mikrobiyom metabarkodlama' üzerine oluşturulmuş sabit bir iş akışı bulunmamaktadır. Yapılan bu tez çalışması ile mikrobiyom metabarkodlama üzerine çalışmak isteyen araştırmacılar için arazi seçimi ve örnekleme, primer seçimi, araştırma sorusuna uygun bir biçimde manipüle edilebilecek biyoinformatik iş akışı seçenekleri sunulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3:31. Epub 2015/08/01. doi: 10.1186/s40168-015-0094-5. PubMed PMID: 26229597; PubMed Central PMCID: PMC4520061.
2. Lewin A, Wentzel A, Valla S. Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(3):516-25. Epub 2012/11/14. doi: 10.1016/j.copbio.2012.10.012. PubMed PMID: 23146837.
3. Tighe S, Afshinnikoo E, Rock TM, McGrath K, Alexander N, McIntyre A, et al. Genomic Methods and Microbiological Technologies for Profiling Novel and Extreme Environments for the Extreme Microbiome Project (XMP). *J Biomol Tech*. 2017;28(1):31-9. Epub 2017/03/25. doi: 10.7171/jbt.17-2801-004. PubMed PMID: 28337070; PubMed Central PMCID: PMC5345951.
4. Lopez-Lopez O, Cerdan ME, Gonzalez-Siso MI. Hot spring metagenomics. *Life (Basel)*. 2013;3(2):308-20. Epub 2013/01/01. doi: 10.3390/life3020308. PubMed PMID: 25369743; PubMed Central PMCID: PMC4187134.
5. Rawat N, Joshi GK. Bacterial community structure analysis of a hot spring soil by next generation sequencing of ribosomal RNA. *Genomics*. 2019;111(5):1053-8. Epub 2019/09/20. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.06.008. PubMed PMID: 31533897.
6. Bukin YS, Galachyants YP, Morozov IV, Bukin SV, Zakharenko AS, Zemskaya TI. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci Data*. 2019;6:190007. Epub 2019/02/06. doi: 10.1038/sdata.2019.7. PubMed PMID: 30720800; PubMed Central PMCID: PMC6362892.
7. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(7):410-22. Epub 2018/05/26. doi: 10.1038/s41579-018-0029-9. PubMed PMID: 29795328.
8. Nygaard AB, Tunsjo HS, Meisal R, Charnock C. A preliminary study on the potential of Nanopore MinION and Illumina MiSeq 16S rRNA gene sequencing to characterize building-dust microbiomes. *Sci Rep*. 2020;10(1):3209. Epub 2020/02/23. doi: 10.1038/s41598-020-59771-0. PubMed PMID: 32081924; PubMed Central PMCID: PMC7035348.
9. Tsuji S, Iguchi Y, Shibata N, Teramura I, Kitagawa T, Yamanaka H. Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of multiple species from environmental DNA: an application on two Japanese medaka species. *Sci Rep*. 2018;8(1):9138. Epub 2018/06/16. doi: 10.1038/s41598-018-27434-w. PubMed PMID: 29904146; PubMed Central PMCID: PMC6002393.
10. Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg LH. Environmental DNA. *Mol Ecol*. 2012;21(8):1789-93. Epub 2012/04/11. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x. PubMed PMID: 22486819.

11. Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8):2761-2. Epub 2008/02/22. doi: 10.1073/pnas.0800476105. PubMed PMID: 18287050; PubMed Central PMCID: PMCPMC2268532.
12. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007;69(2):330-9. Epub 2007/03/30. doi: 10.1016/j.mimet.2007.02.005. PubMed PMID: 17391789; PubMed Central PMCID: PMCPMC2562909.
13. Sato H, Sogo Y, Doi H, Yamanaka H. Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities. *Sci Rep*. 2017;7(1):14860. Epub 2017/11/03. doi: 10.1038/s41598-017-14978-6. PubMed PMID: 29093520; PubMed Central PMCID: PMCPMC5665893.
14. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*. 2011;52(4):413-35. Epub 2011/06/24. doi: 10.1007/s13353-011-0057-x. PubMed PMID: 21698376; PubMed Central PMCID: PMCPMC3189340.
15. Staats M, Arulandhu AJ, Gravendeel B, Holst-Jensen A, Scholtens I, Peelen T, et al. Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408(17):4615-30. Epub 2016/05/15. doi: 10.1007/s00216-016-9595-8. PubMed PMID: 27178552; PubMed Central PMCID: PMCPMC4909793.
16. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):31-46. Epub 2009/12/10. doi: 10.1038/nrg2626. PubMed PMID: 19997069.
17. Perez V, Cortes J, Marchant F, Dorador C, Molina V, Cornejo-D'Ottone M, et al. Aquatic Thermal Reservoirs of Microbial Life in a Remote and Extreme High Andean Hydrothermal System. *Microorganisms*. 2020;8(2). Epub 2020/02/08. doi: 10.3390/microorganisms8020208. PubMed PMID: 32028722; PubMed Central PMCID: PMCPMC7074759.
18. Brock TD. Life at high temperatures. Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed. *Science*. 1967;158(3804):1012-9. Epub 1967/11/01. doi: 10.1126/science.158.3804.1012. PubMed PMID: 4861476.
19. Bourlat SJ, Haenel Q, Finnman J, Leray M. Preparation of Amplicon Libraries for Metabarcoding of Marine Eukaryotes Using Illumina MiSeq: The Dual-PCR Method. *Marine Genomics: Methods and Protocols*. 2016;1452:197-207. doi: 10.1007/978-1-4939-3774-5_13. PubMed PMID: WOS:000398042500014.
20. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-20. Epub 2014/04/04. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. PubMed PMID: 24695404; PubMed Central PMCID: PMCPMC4103590.

21. Bahram M, Anslan S, Hildebrand F, Bork P, Tedersoo L. Newly designed 16S rRNA metabarcoding primers amplify diverse and novel archaeal taxa from the environment. *Env Microbiol Rep*. 2019;11(4):487-94. doi: 10.1111/1758-2229.12684. PubMed PMID: WOS:000474226700002.
22. Beckers B, De Beeck MO, Thijs S, Truyens S, Weyens N, Boerjan W, et al. Performance of 16s rDNA Primer Pairs in the Study of Rhizosphere and Endosphere Bacterial Microbiomes in Metabarcoding Studies. *Front Microbiol*. 2016;7. doi: ARTN 650
10.3389/fmicb.2016.00650. PubMed PMID: WOS:000375998700001.
23. Fischer MA, Gullert S, Neulinger SC, Streit WR, Schmitz RA. Evaluation of 16S rRNA Gene Primer Pairs for Monitoring Microbial Community Structures Showed High Reproducibility within and Low Comparability between Datasets Generated with Multiple Archaeal and Bacterial Primer Pairs. *Front Microbiol*. 2016;7. doi: ARTN 1297
10.3389/fmicb.2016.01297. PubMed PMID: WOS:000381789100001.
24. Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol*. 2016;18(5):1403-14. doi: 10.1111/1462-2920.13023. PubMed PMID: WOS:000375481200011.
25. Apprill A, McNally S, Parsons R, Weber L. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol*. 2015;75(2):129-37. doi: 10.3354/ame01753. PubMed PMID: WOS:000357106200004.
26. Feng Y, Chen CL, Chen TH, Liang YH, Chen HL, Lin CY, et al. Application of next-generation sequencing to study ascitic microbiome in cirrhotic patients with or without spontaneous bacterial peritonitis. *J Microbiol Immunol*. 2015;48(5):504-9. doi: 10.1016/j.jmii.2014.07.005. PubMed PMID: WOS:000362278900006.
27. Green PN, Ardley JK. Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: a proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. *Int J Syst Evol Micr*. 2018;68(9):2727-48. doi: 10.1099/ijsem.0.002856. PubMed PMID: WOS:000444293900003.
28. Hordt A, Lopez MG, Meier-Kolthoff JP, Schleuning M, Weinhold LM, Tindall BJ, et al. Analysis of 1,000+Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. *Front Microbiol*. 2020;11. doi: ARTN 468
10.3389/fmicb.2020.00468. PubMed PMID: WOS:000529046900001.
29. Kantor RS, Miller SE, Nelson KL. The Water Microbiome Through a Pilot Scale Advanced Treatment Facility for Direct Potable Reuse (vol 10, 993, 2019). *Front Microbiol*. 2019;10. doi: ARTN 2636
10.3389/fmicb.2019.02636. PubMed PMID: WOS:000499173800001.

30. Casida LE. *Ensifer-Adhaerens* Gen-Nov, Sp-Nov - a Bacterial Predator of Bacteria in Soil. *Int J Syst Bacteriol.* 1982;32(3):339-45. doi: Doi 10.1099/00207713-32-3-339. PubMed PMID: WOS:A1982NX93800009.
31. Poindexter JS. Biological Properties and Classification of the *Caulobacter* Group. *Bacteriol Rev.* 1964;28:231-95. Epub 1964/09/01. doi: 10.1128/br.28.3.231-295.1964. PubMed PMID: 14220656; PubMed Central PMCID: PMC41226.
32. Pagnier I, Raoult D, La Scola B. Isolation and characterization of *Reyranella massiliensis* gen. nov., sp nov from freshwater samples by using an amoeba co-culture procedure. *Int J Syst Evol Micr.* 2011;61:2151-4. doi: 10.1099/ij.s.0.025775-0. PubMed PMID: WOS:000295432300022.
33. Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Micr.* 2000;50:1563-89. doi: Doi 10.1099/00207713-50-4-1563. PubMed PMID: WOS:000088405900021.
34. Leon IG, Fernandez-Vizcaya O, Mena-Castell M, Chavez-Espana C, Moctezuma-Baltazar V, Robles-Contreras A, et al. Molecular Detection of etiologic agents of infectious blepharitis and its association with systemic diseases. *Invest Ophth Vis Sci.* 2013;54(15). PubMed PMID: WOS:000436232702108.
35. Qu JH, Yuan HL. *Sediminibacterium salmoneum* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment of a eutrophic reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58(Pt 9):2191-4. Epub 2008/09/05. doi: 10.1099/ij.s.0.65514-0. PubMed PMID: 18768628.
36. Cao M, Huang J, Li J, Qiao Z, Wang G. *Edaphobaculum flavum* gen. nov., sp. nov., a member of family Chitinophagaceae, isolated from grassland soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(11):4475-81. Epub 2017/09/19. doi: 10.1099/ijsem.0.002316. PubMed PMID: 28920838.
37. Alina SO, Constantinescu F, Petruta CC. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Rom Biotech Lett.* 2015;20(5):10737-50. PubMed PMID: WOS:000365405800001.
38. Beer KD, Gargano JW, Roberts VA, Hill VR, Garrison LE, Kutty PK, et al. Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water - United States, 2011-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64(31):842-8. Epub 2015/08/14. doi: 10.15585/mmwr.mm6431a2. PubMed PMID: 26270059; PubMed Central PMCID: PMC4584589.
39. Zhao D, Cao X, Huang R, Zeng J, Wu QL. Variation of bacterial communities in water and sediments during the decomposition of *Microcystis* biomass. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176397. Epub 2017/04/25. doi: 10.1371/journal.pone.0176397. PubMed PMID: 28437480; PubMed Central PMCID: PMC5402945.
40. Miroshnichenko ML, Lebedinsky AV, Chernyh NA, Tourova TP, Kolganova TV, Spring S, et al. *Caldimicrobium rimae* gen. nov., sp nov., an extremely thermophilic,

facultatively lithoautotrophic, anaerobic bacterium from the Uzon Caldera, Kamchatka. *Int J Syst Evol Microb.* 2009;59:1040-4. doi: 10.1099/ij.s.0.006072-0. PubMed PMID: WOS:000266426400020.

41. Kashefi K, Holmes DE, Reysenbach AL, Lovley DR. Use of Fe(III) as an electron acceptor to recover previously uncultured hyperthermophiles: Isolation and characterization of *Geothermobacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microb.* 2002;68(4):1735-42. doi: 10.1128/Aem.68.4.1735-1742.2002. PubMed PMID: WOS:000174842200033.

42. Kawasumi T, Igarashi Y, Kodama T, Minoda Y. *Hydrogenobacter-Thermophilus* Gen-Nov, Sp-Nov, an Extremely Thermophilic, Aerobic, Hydrogen-Oxidizing Bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 1984;34(1):5-10. doi: Doi 10.1099/00207713-34-1-5. PubMed PMID: WOS:A1984RZ06700002.

43. O'Neill AH, Liu Y, Ferrera I, Beveridge TJ, Reysenbach AL. *Sulfurihydrogenibium rodmanii* sp. nov., a sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from the Uzon Caldera, Kamchatka Peninsula, Russia, and emended description of the genus *Sulfurihydrogenibium*. *Int J Syst Evol Microb.* 2008;58:1147-52. doi: 10.1099/ij.s.0.65431-0. PubMed PMID: WOS:000256129500017.

44. Studholme DJ. Some (bacilli) like it hot: genomics of *Geobacillus* species. *Microb Biotechnol.* 2015;8(1):40-8. doi: 10.1111/1751-7915.12161. PubMed PMID: WOS:000349032300017.

45. Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol.* 1969;98(1):289-97. Epub 1969/04/01. doi: 10.1128/jb.98.1.289-297.1969. PubMed PMID: 5781580; PubMed Central PMCID: PMCPMC249935.

46. Vick TJ, Dodsworth JA, Costa KC, Shock EL, Hedlund BP. Microbiology and geochemistry of Little Hot Creek, a hot spring environment in the Long Valley Caldera. *Geobiology.* 2010;8(2):140-54. doi: 10.1111/j.1472-4669.2009.00228.x. PubMed PMID: WOS:000274388900004.

47. Makarova KS, Omelchenko MV, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, et al. *Deinococcus geothermalis*: The Pool of Extreme Radiation Resistance Genes Shrinks. *Plos One.* 2007;2(9). doi: ARTN e955

10.1371/journal.pone.0000955. PubMed PMID: WOS:000207455800033.

48. Hirayama H, Takai K, Inagaki F, Nealson KH, Horikoshi K. *Thiobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic, thermophilic, sulfur-oxidizing bacterium from a subsurface hot aquifer. *Int J Syst Evol Microb.* 2005;55:467-72. doi: 10.1099/ij.s.0.63389-0. PubMed PMID: WOS:000226629100075.

49. Hayashi NR, Ishida T, Yokota A, Kodama T, Igarashi Y. *Hydrogenophilus thermoluteolus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic,

hydrogen-oxidizing bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:783-6. doi: Doi 10.1099/00207713-49-2-783. PubMed PMID: WOS:000080024500054.

50. Niederberger TD, Gotz DK, McDonald IR, Ronimus RS, Morgan HW. *Ignisphaera aggregans* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic crenarchaeote isolated from hot springs in Rotorua and Tokaanu, New Zealand. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(Pt 5):965-71. Epub 2006/04/22. doi: 10.1099/ijs.0.63899-0. PubMed PMID: 16627639.

51. Daims H, Wagner M. *Nitrospira*. *Trends Microbiol.* 2018;26(5):462-3. doi: 10.1016/j.tim.2018.02.001. PubMed PMID: WOS:000430327400009.

52. Dodsworth JA, Gevorkian J, Despujos F, Cole JK, Murugapiran SK, Ming H, et al. *Thermoflexus hugenholtzii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, microaerophilic, filamentous bacterium representing a novel class in the Chloroflexi, *Thermoflexia* classis nov., and description of *Thermoflexaceae* fam. nov. and *Thermoflexales* ord. nov. (vol 64, pg 2119, 2014). *Int J Syst Evol Micr.* 2014;64:3331-. PubMed PMID: WOS:000344912300062.

53. Jungbluth SP, Amend JP, Rappe MS. Metagenome sequencing and 98 microbial genomes from Juan de Fuca Ridge flank subsurface fluids. *Sci Data.* 2017;4:170037. Epub 2017/03/30. doi: 10.1038/sdata.2017.37. PubMed PMID: 28350381; PubMed Central PMCID: PMC5369317.

54. Chouari R, Le Paslier D, Daegelen P, Ginestet P, Weissenbach J, Sghir A. Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(12):7354-63. Epub 2003/12/09. doi: 10.1128/AEM.69.12.7354-7363.2003. PubMed PMID: 14660385; PubMed Central PMCID: PMC5309898.

55. Anders H, Power JF, MacKenzie AD, Lagutin K, Vyssotski M, Hanssen E, et al. *Limisphaera ngatamarikiensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, pink-pigmented coccus isolated from subaqueous mud of a geothermal hot spring. *Int J Syst Evol Micr.* 2015;65:1114-21. doi: 10.1099/ijs.0.000063. PubMed PMID: WOS:000356841900001.

56. Alegado RA, Grabenstatter JD, Zuzow R, Morris A, Huang SY, Summons RE, et al. *Algoriphagus machipongonensis* sp. nov., co-isolated with a colonial choanoflagellate. *Int J Syst Evol Micr.* 2013;63:163-8. doi: 10.1099/ijs.0.038646-0. PubMed PMID: WOS:000315829700026.

57. Lee EM, Jeon CO, Choi I, Chang KS, Kim CJ. *Silanimonas lenta* gen. nov., sp. nov., a slightly thermophilic and alkaliphilic gammaproteobacterium isolated from a hot spring. *Int J Syst Evol Micr.* 2005;55:385-9. doi: 10.1099/ijs.0.63328-0. PubMed PMID: WOS:000226629100060.

58. Fahrbach M, Kuever J, Meinke R, Kampf P, Hollender J. *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17 beta-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *Int J Syst Evol Micr.* 2006;56:1547-52. doi: 10.1099/ijs.0.63672-0. PubMed PMID: WOS:000239366200015.

59. Yu TT, Zhou EM, Yin YR, Yao JC, Ming H, Dong L, et al. *Vulcaniibacterium tengchongense* gen. nov., sp nov isolated from a geothermally heated soil sample, and reclassification of *Lysobacter thermophilus* Wei et al. 2012 as *Vulcaniibacterium thermophilum* comb. nov. *Anton Leeuw Int J G.* 2013;104(3):369-76. doi: 10.1007/s10482-013-9959-4. PubMed PMID: WOS:000322871600009.
60. Hirayama H, Abe M, Miyazaki M, Nunoura T, Furushima Y, Yamamoto H, et al. *Methylomarinovum caldicuralii* gen. nov., sp nov., a moderately thermophilic methanotroph isolated from a shallow submarine hydrothermal system, and proposal of the family *Methylothermaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Micr.* 2014;64:989-99. doi: 10.1099/ijs.0.058172-0. PubMed PMID: WOS:000337930900048.
61. Iino T, Mori K, Uchino Y, Nakagawa T, Harayama S, Suzuki K. *Ignavibacterium album* gen. nov., sp nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of *Ignavibacteria classis* nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria. *Int J Syst Evol Micr.* 2010;60:1376-82. doi: 10.1099/ijs.0.012484-0. PubMed PMID: WOS:000279369100022.
62. Rabus R, Venceslau SS, Wohlbrand L, Voordouw G, Wall JD, Pereira IAC. A Post-Genomic View of the Ecophysiology, Catabolism and Biotechnological Relevance of Sulphate-Reducing Prokaryotes. *Adv Microb Physiol.* 2015;66:55-321. doi: 10.1016/bs.ampbs.2015.05.002. PubMed PMID: WOS:000363328100002.
63. Korzhenkov AA, Teplyuk AV, Lebedinsky AV, Khvashchevskaya AA, Kopylova YG, Arakchaa KD, et al. Members of the Uncultured Taxon OP1 ("Acetothermia") Predominate in the Microbial Community of an Alkaline Hot Spring at East-Tuvian Upland. *Microbiology+.* 2018;87(6):783-95. doi: 10.1134/S0026261718060115. PubMed PMID: WOS:000452317300005.
64. Wiegel J, Ljungdahl LG. *Thermoanaerobacter-Ethanolicus* Gen-Nov, Spec-Nov, a New, Extreme Thermophilic, Anaerobic Bacterium. *Arch Microbiol.* 1981;128(4):343-8. doi: Doi 10.1007/Bf00405910. PubMed PMID: WOS:A1981LE85300001.
65. Kadnikov VV, Mardanov AV, Beletsky AV, Karnachuk OV, Ravin NV. Genome of the candidate phylum Aminicenantes bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle. *Extremophiles.* 2019;23(2):189-200. doi: 10.1007/s00792-018-01073-5. PubMed PMID: WOS:000458509900002.
66. Sauder LA, Engel K, Lo CC, Chain P, Neufeld JD. "Candidatus Nitrosotenuis aquarius," an Ammonia-Oxidizing Archaeon from a Freshwater Aquarium Biofilter. *Appl Environ Microb.* 2018;84(19). doi: ARTN e01430-18
10.1128/AEM.01430-18. PubMed PMID: WOS:000446204500020.
67. Kadnikov VV, Savvichev AS, Mardanoy AV, Beletsky AV, Chupakov AV, Kokryatskaya NM, et al. Metabolic Diversity and Evolutionary History of the Archaeal Phylum "Candidatus Micrarchaeota" Uncovered from a Freshwater Lake Metagenome. *Appl Environ Microb.* 2020;86(23). doi: ARTN e02199-20

10.1128/AEM.02199-20. PubMed PMID: WOS:000596593600025.

68. Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B, Mels L, Hoste B, Dewettinck D, et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42(3):344-56. Epub 1992/07/01. doi: 10.1099/00207713-42-3-344. PubMed PMID: 1503968.

69. Perez-Cataluna A, Salas-Masso N, Dieguez AL, Balboa S, Lema A, Romalde JL, et al. Revisiting the Taxonomy of the Genus *Arcobacter*: Getting Order From the Chaos. *Front Microbiol.* 2018;9:2077. Epub 2018/09/21. doi: 10.3389/fmicb.2018.02077. PubMed PMID: 30233547; PubMed Central PMCID: PMC6131481.

70. Inagaki F, Takai K, Nealson KH, Horikoshi K. *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the epsilon-Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54(Pt 5):1477-82. Epub 2004/09/25. doi: 10.1099/ijs.0.03042-0. PubMed PMID: 15388698.

71. Inagaki F, Takai K, Hideki KI, Nealson KH, Horikishi K. *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing epsilon-proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53:1801-5. doi: 10.1099/ijs.0.02682-0. PubMed PMID: WOS:000186918500011.

72. Waite DW, Vanwonterghem I, Rinke C, Parks DH, Zhang Y, Takai K, et al. Comparative Genomic Analysis of the Class Epsilonproteobacteria and Proposed Reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.). *Front Microbiol.* 2017;8:682. Epub 2017/05/10. doi: 10.3389/fmicb.2017.00682. PubMed PMID: 28484436; PubMed Central PMCID: PMC5401914.

73. Finster KW, Kjeldsen KU, Kube M, Reinhardt R, Mussmann M, Amann R, et al. Complete genome sequence of *Desulfocapsa sulfexigens*, a marine deltaproteobacterium specialized in disproportionating inorganic sulfur compounds. *Stand Genomic Sci.* 2013;8(1):58-68. doi: 10.4056/sigs.3777412. PubMed PMID: WOS:000323325500006.

74. Te SH, Tan BF, Boo CY, Thompson JR, Gin KYH. Genomics insights into production of 2-methylisoborneol and a putative cyanobactin by *Planktothricoides* sp SR001. *Stand Genomic Sci.* 2017;12. doi: ARTN 35

10.1186/s40793-017-0247-1. PubMed PMID: WOS:000403265700002.

75. Gureeva MV, Belousova EV, Dubinina GA, Novikov AA, Kopitsyn DS, Grabovich MY. *Thioflexithrix psekiensis* gen. nov., sp. nov., a filamentous gliding sulfur bacterium from the family Beggiatoaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019;69(3):798-804. doi: 10.1099/ijsem.0.003240. PubMed PMID: WOS:000460157300030.

76. Jiang LJ, Lyu J, Shao ZZ. Sulfur Metabolism of *Hydrogenovibrio thermophilus* Strain S5 and Its Adaptations to Deep-Sea Hydrothermal Vent Environment. *Front Microbiol.* 2017;8. doi: ARTN 2513

10.3389/fmicb.2017.02513. PubMed PMID: WOS:000417793700001.

77. Boden R, Scott KM, Williams J, Russel S, Antonen K, Rae AW, et al. An evaluation of *Thiomicrospira*, *Hydrogenovibrio* and *Thioalkalimicrobium*: reclassification of four species of *Thiomicrospira* to each *Thiomicrobacter* gen. nov. and *Hydrogenovibrio*, and reclassification of all four species of *Thioalkalimicrobium* to *Thiomicrospira*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017;67(5):1140-51. doi: 10.1099/ijsem.0.001855. PubMed PMID: WOS:000403696100007.

78. Boden R, Hutt LP, Rae AW. Reclassification of *Thiobacillus aquaesulis* (Wood & Kelly, 1995) as *Annwoodia aquaesulis* gen. nov., comb. nov., transfer of *Thiobacillus* (Beijerinck, 1904) from the Hydrogenophilales to the Nitrosomonadales, proposal of *Hydrogenophilalia* class. nov. within the 'Proteobacteria', and four new families within the orders Nitrosomonadales and Rhodocyclales. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017;67(5):1191-205. doi: 10.1099/ijsem.0.001927. PubMed PMID: WOS:000403696100014.

79. Pot B, Gillis M, Hoste B, Vandeveld A, Bekaert F, Kersters K, et al. Intrageneric and Intergeneric Relationships of the Genus *Oceanospirillum*. *Int J Syst Bacteriol*. 1989;39(1):23-34. doi: 10.1099/00207713-39-1-23. PubMed PMID: WOS:A1989R740400005.

80. Abbamondi GR, Kambourova M, Poli A, Finore I, Nicolaus B. Quorum Sensing in Extremophiles. *Quorum Sensing: Molecular Mechanism and Biotechnological Application*. 2019:97-123. doi: 10.1016/B978-0-12-814905-8.00004-6. PubMed PMID: WOS:000483630300005.

81. Wang ZJ, Xie ZH, Wang C, Du ZJ, Chen GJ. *Motiliproteus sediminis* gen. nov., sp. nov., isolated from coastal sediment. *Anton Leeuw Int J G*. 2014;106(4):615-21. doi: 10.1007/s10482-014-0232-2. PubMed PMID: WOS:000341859100003.

82. Roalkvam I, Bredy F, Baumberg T, Pedersen RB, Steen IH. *Hypnocyclicus thermotrophus* gen. nov., sp. nov. isolated from a microbial mat in a hydrothermal vent field. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65:4521-5. doi: 10.1099/ijsem.0.000606. PubMed PMID: WOS:000370460600034.

83. Stolz JF, Ellis DJ, Blum JS, Ahmann D, Lovley DR, Oremland RS. *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the *Sulfurospirillum* clade of the epsilon Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49:1177-80. doi: 10.1099/00207713-49-3-1177. PubMed PMID: WOS:000081448000029.

84. Takai K, Nealson KH, Horikoshi K. *Hydrogenimonas thermophila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the epsilon-Proteobacteria, isolated from a black smoker in a Central Indian Ridge hydrothermal field. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:25-32. doi: 10.1099/ijs.0.02787-0. PubMed PMID: WOS:000189154700003.

85. Podar M, Reysenbach AL. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Curr Opin Biotech.* 2006;17(3):250-5. doi: 10.1016/j.copbio.2006.05.002. PubMed PMID: WOS:000238846300005.
86. Rothschild LJ, Mancinelli RL. Life in extreme environments. *Nature.* 2001;409(6823):1092-101. Epub 2001/03/10. doi: 10.1038/35059215. PubMed PMID: 11234023.
87. Pikuta EV, Hoover RB, Tang J. Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit Rev Microbiol.* 2007;33(3):183-209. doi: 10.1080/10408410701451948. PubMed PMID: WOS:000248415800004.
88. Li LW, Ma ZS. Global Microbiome Diversity Scaling in Hot Springs With DAR (Diversity-Area Relationship) Profiles. *Front Microbiol.* 2019;10. doi: ARTN 118 10.3389/fmicb.2019.00118. PubMed PMID: WOS:000459371100001.
89. Bruno F, Marinella M, Santamaria M. e-DNA Meta-Barcoding: From NGS Raw Data to Taxonomic Profiling. *Rna Bioinformatics.* 2015;1269:257-78. doi: 10.1007/978-1-4939-2291-8_16. PubMed PMID: WOS:000357692900017.
90. Wilson JJ, Sing KW, Floyd RM, Hebert PDN. DNA Barcodes and Insect Biodiversity. *Insect Biodiversity: Science and Society, Vol I, 2nd Edition.* 2017:575-92. doi: Book_Doi 10.1002/9781118945568. PubMed PMID: WOS:000544813400020.
91. Schutte UME, Abdo Z, Bent SJ, Shyu C, Williams CJ, Pierson JD, et al. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biot.* 2008;80(3):365-80. doi: 10.1007/s00253-008-1565-4. PubMed PMID: WOS:000258600300001.
92. Zhou HW, Li DF, Tam NFY, Jiang XT, Zhang H, Sheng HF, et al. BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity. *Isme J.* 2011;5(4):741-9. doi: 10.1038/ismej.2010.160. PubMed PMID: WOS:000290021900018.
93. Porter TM, Hajibabaei M. Putting COI Metabarcoding in Context: The Utility of Exact Sequence Variants (ESVs) in Biodiversity Analysis. *Front Ecol Evol.* 2020;8. doi: ARTN 248 10.3389/fevo.2020.00248. PubMed PMID: WOS:000565570200001.
94. Sinha R, Abnet CC, White O, Knight R, Huttenhower C. The microbiome quality control project: baseline study design and future directions. *Genome Biol.* 2015;16. doi: ARTN 276 10.1186/s13059-015-0841-8. PubMed PMID: WOS:000366105000002.

ÖZGEÇMİŞ

EĞİTİM VE ÖĞRETİM

09/2018 – Devam Ediyor – Ankara, Türkiye

Yüksek Lisans

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü

2013 – 2018 – İstanbul, Türkiye

Lisans

İstanbul Teknik Üniversitesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

2009 – 2013 – Mersin, Türkiye

Ortaöğretim

İçel Anadolu Lisesi

İŞ DENEYİMLERİ

09/2018 – Devam Ediyor – Ankara, Türkiye

Yüksek Lisans Öğrencisi

Evrimsel Genetik Laboratuvarı

Ankara, Türkiye

03/2018 – 06/2018 – İstanbul, Türkiye

Öğrenci Laboratuvarı Asistanı

İstanbul Teknik Üniversitesi

İstanbul, Türkiye

07/2017 – 09/2017 Staj

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri Enstitüsü

Yrd. Doç. Dr. Korhan Özkan tarafından yönetilen Ekolojik Kampüs Projesinde Stajyer

Mersin, Türkiye

06/2017 – 07/2017 Staj

Boğaziçi Üniversitesi Çevre Bilimleri Enstitüsü

Doç. Dr. Raşit Bilgin danışmanlığında, Çevre Bilimleri Enstitüsünde stajyer

İstanbul, Türkiye

06/2016 – 07/2016 Staj

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Hrisi Bahar Tokman danışmanlığında, Moleküler Biyoloji Laboratuvarında stajyer

İstanbul, Türkiye

06/2015 – 07/2015 Staj

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Kansu Büyükaşar danışmanlığında, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalında Stajyer

Mersin, Türkiye

DİL BİLGİSİ

Ana Dil: Türkçe

Diğer Diller: İngilizce

Dinleme	Okuma	Konuşma	Yazma
B2	B2	B2	B2

YAYINLAR VE BİLDİRİLER

Ünal EM, Çelik I, Tarkan AS, Çiftçi O, Er A. Kaynar S, Atar HH, Keskin E. 2019. Establishing National Early Warning and Monitoring System for Available and Potential Non-native Freshwater Fish Species in Turkey. VI. Ecology and Evolutionary Biology Symposium, 10-12 July, Ankara, Turkey.

ORGANİZASYON YETENEKLERİ

- 6. Ekoloji ve Evrimsel Biyoloji Sempozyumu organizasyon ekibi üyesi
- Uluslararası İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi 2015, 2016 ve 2017 organizasyon ekibi üyesi
- 2015-2017 yılları arasında İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kulübü Saymanlığı

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Establishing National Early Warning and Monitoring System for Available and Potential Non-native Freshwater Fish Species in Turkey

Esra Mine Ünal^{1, 2*}, Işıl Çelik^{1, 2}, Ali Serhan Tarkan³, Ozan Çiftçi⁴, Ayşegül Er^{2, 5}, Sevgi Kaynar¹, Hasan Hüseyin Atar⁶, Emre Keskin²

¹Biotechnology Institute of Ankara University, Ankara, Turkey

²Evolutionary Genetics Laboratory (eGL), Ankara University, Agricultural Faculty, Department of Fisheries and Aquaculture, Ankara, Turkey

³Ecology & Invasion Unit (EcoVasion), Faculty of Fisheries, Muğla Sıtkı Koçman University, Muğla, Turkey

⁴Institute of Environmental Sciences, Leiden University, Leiden, Nederland

⁵Ankara University, Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Fisheries and Aquaculture, Ankara, Turkey

⁶Ankara University, Agricultural Faculty, Department of Fisheries and Aquaculture, Ankara, Turkey

*unalesramine@gmail.com

The damage caused by non-native and invasive species to the local fauna, flora, ecosystem and socio-economic structure has been well known for many years and the studies conducted on this subject have increased significantly in recent years. In this sense, it is essential to identify potential non-native species that may pose a threat, to continuously monitor, to carry out risk analyses and to keep them under control.

The aim of the study is to determine native, non-native and invasive fish species located in Turkey's inland waters using traditional and molecular tools, assess their risks and develop a real-time web-based database and monitoring map to maintain proper control and management of these species. For this purpose, water samples were taken from 54 different points of 10 rivers using peristaltic pump and disposable sterile filters with a pore size of 0.22/0.45 µm. The PCR amplifications of the eDNA extracted from the filters were performed with tagged MiFish-U F/R (12S rRNA) primers, indexed via adaptor ligation and aligned with reference sequences from NCBI GenBank and European Freshwater Fish Local Database using the processed pair-ended reads obtained from 500K read per sample high throughput sequencing. The risk analysis of the identified species was performed with the AS-ISK (Aquatic Species Invasiveness Species Risk) software.

As a result, a total of 232 species detected in this study to determine invasiveness levels of non-native and invasive species were successfully analysed using AS-ISK program for Turkey inland waters. eDNA metabarcoding of the species, especially the ones that has not been reported before using traditional sampling is one of the most important outcomes of this project. In this regard, it is necessary to create and implement emergency management plans for some species which are not reported previously.

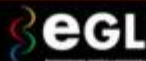
Keywords: AS-ISK, Environmental DNA, Freshwater Fish, Invasive Species.

EEBST 2019

Ecology and Evolutionary Biology Symposium

10-12 July 2019

ABSTRACT BOOK



info@eebst.org



<https://twitter.com/eebstsymposium>



<https://www.facebook.com/eebst>



www.eebst.org

