

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

AYDIN İLİ VE ÇEVRESİNDEKİ SICAK SU
KAYNAKLARINDA ARKE ÇEŞİTLİLİĞİNİN
BELİRLENMESİ

Rümeysa Gülsu ÖZKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEF-19023 proje numarası ile desteklenmiştir ve Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein (REDPROM) Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Rümeyza Gülsu ÖZKAN tarafından hazırlanan “Aydın İli ve Çevresindeki Sıcak Su Kaynaklarında Arke Çeşitliliğinin Belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/08/2020

Üye (T.D.)	: Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL	Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN	Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN	Akdeniz Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen sevgili danışmanım Prof Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL'e çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN ve Dr. Öğr. Gör. Erman ORYAŞIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Değerli görüş ve önerileri için jüri üyeleri Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN ve Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a, ayrıca FEF-19023 proje numarasıyla tez çalışmamı destekleyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince özveri ve desteklerini esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Abdulkerim KARAYNİR, Demet YALÇIN BİNGÜL, Hanife SALİH, Saad ALI, Mehmet AYTAR ve Rabia TOZLU 'ya ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca maddi, manevi yanımda ve arkamda duran sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Termofilik Mikroorganizmalar.....	2
2.2. Termofillerin Tarihi.....	2
2.3. 16S Ribozomal RNA ve Sistematikteki Önemi	3
2.4. Arkelerin Tarihi	4
2.5. Arkelerin Taksonomisi	6
2.6. Termofilik Habitatlar	8
2.7. Termofilik Arkelerde Adaptasyon Mekanizmaları.....	12
2.8. Arkelerin Biyoteknoloji Alanında Kullanımları.....	13
2.9. 16S rDNA Analizi	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Gereç.....	18
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Su, Çamur ve Birikinti Örnekleri.....	18
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	21
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler.....	22
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Primerler	23
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Su, Çamur, Toprak ve Birikinti Örneklerinin Alınması	23
3.2.2. Örneklerden DNA İzolasyonu	23
3.2.3. 16 rRNA Genlerinin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Amplifikasyonu	24

3.2.4. Amplikon ve Plazmid'in Restriksiyonu	25
3.2.5. Elektrokimyasal Kompetan Hücre Hazırlama Yöntemi	27
3.2.6. Transformantların Seçilmesi, M13 PCR ve Sekans Analizi.....	27
4. BULGULAR	29
4.1. Sıcak Su Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	29
4.2. 16S <i>rDNA</i> Genlerinin PCR ile Çoğaltılması	29
4.3. Amplikon ve Plazmit Restriksiyonu.....	30
4.4. TA klonlama vektörü.....	31
4.5. Transformantların Seçilmesi ve M13 PCR.....	31
4.6. Sekans Analizi ve Homolojilerin Belirlenmesi	35
5. TARTIŞMA.....	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Sıcaklık birimi
A°	: Amper birimi
ATP	: Adenozin trifosfat
CH4	: Metan
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E.coli	: Escherichia coli
Hsps	: Isı şok proteinleri
KOD1	: Kod DNA polimeraz 1
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Pfu	: Pyrococcus
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
SSU	: Küçük altbirim
Taq	: Thermusaquaticus

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Psikrofilik, mezofilik, termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalar için sıcaklık ve büyüme oranlarının ilişkisi	3
Şekil 2. 16S rRNA gen bölgesindeki değişken bölgeler (V1-V9)	3
Şekil 3. Yaşamın 3 temel domaini.....	5
Şekil 4. Arke filumları.....	6
Şekil 5. Türkiye 1000 m yeraltı sıcaklık haritası.....	9
Şekil 6. Türkiye’de termal su kaynaklarının dağılışı haritası.....	10
Şekil 7. Denizli ili jeotermal alanları haritası.....	11
Şekil 8. Aydın ili jeotermal alanları haritası.....	11
Şekil 9. Kültürden bağımsız moleküler bazlı metodlar	14
Şekil 10. Kültürden bağımsız (PCR-bazlı) yöntem.....	15
Şekil 11. PCR koşulları	24
Şekil 12. Termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalar filogenetik ağaç (stetter, 2006)	41
Şekil 13. 751F/1406R primer çifti ile saptanan domainlerin oranı	43
Şekil 14. 25F/1492R primer çifti ile saptanan domainlerin oranı	43
Şekil 15. 1F/1000R primer çifti ile saptanan domainlerin oranı	44
Şekil 16. 1F/1000R toplam klonlar yüzdeler dağılımı	45
Şekil 17. 25F/1492R toplam klonlar yüzdeler dağılımı	45
Şekil 18. 751F/1406R toplam klonlar yüzdeler dağılımı	46
Şekil 19. Kaba ağaç-1 klon yüzde dağılımları	48
Şekil 20. Kaba ağaç-2 klon yüzde dağılımları	49
Şekil 21. Kaba ağaç-3 klon yüzde dağılımları	49
Şekil 22. Seferihisar klon yüzde dağılımları	50
Şekil 23. Umut termal klon yüzde dağılımları	50
Şekil 24. Alangüllü klon yüzde dağılımları.....	51
Şekil 25. Hasköy-2 klon yüzde dağılımları	52
Şekil 26. Hasköy-1 klon yüzde dağılımları	52
Şekil 27. Ortakçı klon yüzde dağılımları.....	53
Şekil 28. Toplam klon dağılımları.....	54

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Alangüllü örneklem alanı (55 °c).....	18
Resim 2. Hasköy İnaltı (1) örneklem alanı (86 °C)	19
Resim 3. Hasköy İnaltı (2) örneklem alanı (92 °C)	19
Resim 4. Kabağaç örneklem alanı (57 °C).....	20
Resim 5. Ortakçı örneklem alanı (46 °C).....	20
Resim 6. Umut termal örneklem alanı (Aşağı su 62 °C)	21
Resim 7. DNA Örneklerinin Elektroforez Görüntüsü.....	29
Resim 8. pUC19 EcoRI ile Restriksiyon.....	30
Resim 9. TA vektör (pUC19 plazmidinin SmaI Enzimi ile Restriksiyon)	31
Resim 10. Umut termal, Ortakçı, Hasköy İnaltı (1) ve Hasköy İnaltı (2) örneklerinden elde edilen klonların kolonileri	32
Resim 11. Alangüllü örneğinden elde edilen klonların kolonileri	32
Resim 12. Alangüllü ve Ortakçı örneklerinin M13 PCR görüntüsü	33
Resim 13. Hasköy İnaltı-1 örneğinin M13 PCR görüntüsü	33
Resim 14. Hasköy İnaltı-2 örneğinin M13 PCR görüntüsü	33
Resim 15. Kabağaç-1 örneğinin M13 PCR görüntüsü	34
Resim 16. Kabağaç-2 örneğinin M13 PCR görüntüsü	34
Resim 17. Kabağaç-3 örneğinin M13 PCR görüntüsü	34
Resim 18. Umut Termal örneğinin M13 PCR görüntüsü	34

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan örnekler ve istasyonları.....	18
Tablo 2. Çalışmada kullanılan primerler	23
Tablo 3. Kullanılan primerler, PCR ve klonlama sonuçları.....	30
Tablo 4. Alangüllü (55°C) sekans analiz sonuçları	35
Tablo 5. Hasköy inaltı 1.istasyon (86°C) sekans analiz sonuçları.....	36
Tablo 6. Hasköy inaltı 2.istasyon (92°C) sekans analiz sonuçları.....	37
Tablo 7. Kabağaç-1 (52°C) sekans analiz sonuçları	37
Tablo 8. Kabağaç-2 (57°C) sekans analiz sonuçları	38
Tablo 9. Kabağaç-3 (57°C) sekans analiz sonuçları	38
Tablo 10. Ortakçı (46°C) sekans analiz sonuçları	39
Tablo 11. Seferihisar (50°C) sekans analiz sonuçları	39
Tablo 12. Umut termal (62°C) sekans analiz sonuçları	40

ÖZET

AYDIN İLİ VE ÇEVRESİNDEKİ SICAK SU KAYNAKLARINDA ARKE ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Özkan R. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2020.

Canlıların üç büyük domaininden birini oluşturan arkeler gerek biyokimyasal özellikleri gerekse yapısal özellikleri bakımından hem ökaryotlar hem de bakterilerden ayrılan prokaryotik hücre tipinde canlılardır. Arkelerin büyük çoğunluğu ekstrem ortam koşullarında metabolik ve moleküler adaptasyonları sayesinde hayatta kalabilmektedirler. Arke türlerinin saf kültürlerinin izole edildiği tipik ortamlar; kaplıcalar, hidrotermal bacalar, solfataralar, tuz gölleri, soda gölleri gibi habitatlardır. Son yıllarda, çevresel örneklerdeki 16S *rRNA* genlerinin PCR-bazlı amplifikasyonunu içeren moleküler tekniklerin kullanılması, kültürden bağımsız bir mikrobiyal çeşitlilik değerlendirmesine izin vermiştir. Bu çalışmada Aydın ili ve çevresindeki sıcak su kaynaklarındaki arkeal çeşitliliğinin kültürden bağımsız yöntemler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Su, çamur ve birikinti örneklerinden total DNA izolasyonu yapılmış ve sonrasında, arke domainine spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile 16S *rRNA* gen bölgesi çoğaltılmıştır. Amplikonlar puc19 plazmidine yerleştirildikten sonra *E.coli* DH10B suşuna transformasyon yoluyla aktarılmıştır. Beyaz koloniler seçilerek, M13 primerleriyle PCR reaksiyonları kurulmuş ve elde edilen 16S *rDNA* amplikonlarının dizileri belirlenerek veri tabanındaki diğer prokaryotlarla olan benzerlik oranları saptanmıştır. Çalışmamızda bir tanesi kesim bölgesi olmak üzere 3 farklı primer çifti (751F/1406R- 25F/1492R- 1F/1000R) ve 2 farklı klonlama yöntemi (TA klonlama ve restriksiyon enzimi ile klonlama) kullanılmıştır. Elde edilen 112 klondan 45 tanesi bakteri (%40) ve 67 tanesi arke (%60) olmak üzere geniş bir çeşitlilik yelpazesi ortaya konulmuştur. Tespit edilen arkeleri ağırlıklı olarak hipertermofilik *Ignisphaera aggregans* ve *Thermofilum* türleri oluştururken, örneklerde *Methanocaldococcus* ve *Methanospirillum* cinslerine ait metanojenik üyelere de rastlanmıştır. Bakteri domainine ait klonlar ise *Thermus* türleri, siyanobakteriler ve Proteobakteri filumuna ait üyelere de rastlanmıştır. Ülkemizde sıcak su kaynaklarında arke çeşitliliğinin belirlenmesi ile ilgili araştırmalar oldukça kısıtlıdır. Tez çalışmamız ekstrem

mikroorganizmaların biyoteknoloji başta olmak üzere pek çok alanda popüler olduğu günümüzde ülkemiz biyoçeşitliliğine önemli katkı sağlayacaktır. Farklı PCR ve klonlama yöntemlerinin karşılaştırılması bu konuda çalışan araştırmacılar için yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kültürden Bağımsız Yöntemler, 16S *rRNA*, Prokaryotik Çeşitlilik, Termofilik Arke

ABSTRACT

DETERMINATION OF ARCHAEL DIVERSITY OF HOT WATER SOURCES IN AYDIN

Özkan R. Aydın Adnan Menderes University Molecular Biotechnology Department
Master's Thesis, Aydın, 2020.

Archaea, which constitute one of the three major domains of living things, in terms of both biochemical properties and structural features, are prokaryotic cell types that are separated from eukaryotes and bacteria. The vast majority of members of Archaea survive in extreme ambient conditions thanks to their metabolic and molecular adaptations. Typical environments in which pure cultures of archaea species isolated; are hot springs, hydrothermal vents, solfataras, salt lakes, soda lakes. In recent years, the use of molecular techniques involving PCR-based amplification of 16S *rRNA* genes in environmental samples has allowed a culture-independent microbial diversity assessment. In this study, it was aimed to investigate the archeal diversity of hot water sources in Aydın and its surroundings using culture independent methods. Total DNA isolation was performed from water, sludge and debris samples and then 16S *rRNA* gene region was amplified by PCR method using domain-specific primers. After the amplicons were ligated into the puc19 plasmid, *E.coli* DH10B cells was transformed by recombinant plasmid. By selecting white colonies, PCR reactions were established with M13 primers, and the sequences of the 16S rDNA amplicons obtained were determined to find the similarity rates with other prokaryotes in the database. In addition, three different primer sets (751F/1406R-25F/1492R- 1F/1000R) and two different cloning methods (TA cloning and cloning with restriction enzyme) were compared. Among the 112 clones obtained in the study 45 of them were found to be belong to domain Bacteria, while 67 of the clones were belong to the domain Bacteria and a wide biodiversity were determined. The sequences of archeal clones were found to be mostly similar to *Ignisphaera aggregans* and *Thermofilum* spp., also some methanogenic members of Archaea like *Methanocaldococcus* spp. and *Methanospirillum* spp. On the other hand, bacterial lineages were found to be mostly similar with some species of genus *Thermus*, members of Cyanobacteria and Proteobacteria phyla in the samples. In

our country, researches on determining archeal diversity in hot water resources are very limited. Our thesis study will make an important contribution to the biodiversity of our country today, where extreme microorganisms are popular in many fields, especially in biotechnology. Comparison of different PCR and cloning methods will be a guide for the researchers working on this subject.

Keywords: Culture Independent Methods, 16S *rRNA*, Prokaryotic Diversity, Thermophilic Archaea

1. GİRİŞ

1976'da moleküler biyolog Carl Woese'un çalışmaları sonucu arkelerin ökaryotlardan ve bakterilerden farklı bir domainde yer alması gerektiği ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda, arkeler bazı özellikleri bakımından hem ökaryotlara hem de bakterilere benzemektedir. Buna istinaden ilk bulunduğu yıllarda 'arkebakteri' isimlendirmesi yapılmıştır ancak gerek yapısal gerekse metabolik faaliyetleri açısından bakterilerden ayrılmaktadırlar. Ekstrem habitatlardaki adaptasyonları göz önüne alındığında arkeler bulunduğu yıllardan bu yana pek çok alanda ve çalışmada yer almaktadır. Ancak *in-vitro* olarak kültürasyonları zor olduğu için henüz bilinmeyen çok fazla arke türünün olduğu aşikardır (Garrett ve Klenk, 2007).

Arkelerin ilk zamanlarda yalnızca ekstrem koşullarda bulunabileceğinden bahsedilirken sonraki yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda ılıman ve normal ortam koşullarında da tespit edilmişlerdir. Yaşamın 3 ana domaininden birini oluşturan arkeler yaşam alanlarına göre Alkalifiller, Asidofiller, Halofiller, Metanojenler, Termofiller, Hipertermofiller ve Psikrofiller olarak 7 farklı gruba ayrılabilir. Alkalifilik arke türleri; alkali ortamlarda ve 9 ile 11 arasında pH değerlerinde bulunurlar. Asidofilik arke türleri alkalifillerin aksine düşük pH aralıklarında bulunmaktadırlar. Halofilik arkeler ise yüksek tuz oranına sahip habitatlarda yaşam sürmektedirler. Termofilik ve hipertermofilik arkeler yüksek sıcaklık adaptasyonu göstermektedirler. Genellikle sıcak su kaynakları, hidrotermal bacalar, kaplıcalar gibi üst sıcaklık limitlerinde hayatta kalabilme kabiliyeti göstermektedirler. Psikrofilik arkeler ise termofillerin ve hipertermofillerin tam tersi soğuk çevrelere uyum sağlamaktadır (Brock ve Freeze, 1969).

Ülkemizde ve dünyada mikrobiyal yaşamın çeşitliliği konusundaki ilgi her geçen gün artmaktadır. Ekstrem çevrelerdeki adaptasyonlarıyla ilgi çekici hale gelen arkelerin kültür ortamına dayalı yapılan çalışmaları laboratuvar koşullarının yetersizliği bakımından az sayıdadır. Bununla birlikte klasik mikrobiyal temelli analizler her zaman arkelerin kültüre edilmelerine ve karakterizasyonlarına olanak vermemektedir. Bu çalışmada Aydın ve çevresindeki sıcak su kaynaklarından su, birikinti ve çamur örnekleri alınarak, moleküler temelli kültürden bağımsız yöntemlerle ülkemizde ilk kez termofilik ve hipertermofilik arke çeşitliliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

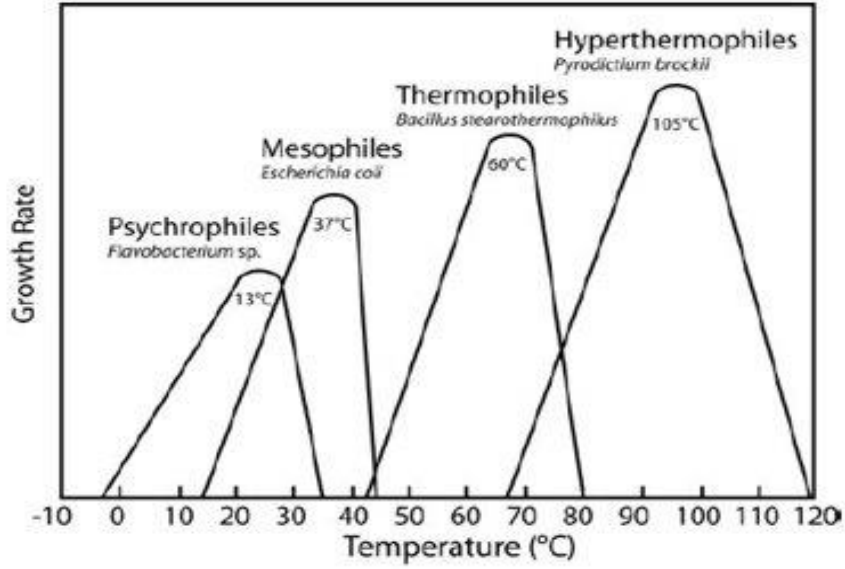
2.1. Termofilik Mikroorganizmalar

Terminolojik olarak, 50 ° C'den daha yüksek bir maksimum büyüme sıcaklığına sahip organizmalar, termofiller olarak tanımlanmaktadır. Kristjansson ve Stetter'in yaptıkları çalışmalar sonucunda optimal olarak 80° C'nin üzerinde büyüyen mikroorganizmalar hipertermofiller olarak kabul edilmektedir. Günümüzde, sıcaklık açısından üst yaşam sınırı olarak bir *Pyrolobus* türü olan Strain 121 bilinmektedir ve 130 ° C 'de canlı kalabilmektedir (Kristjansson ve Stetter,1992). Bunlara ek olarak bazı metanojen hipertermofilik türler sıcaklığın 110° C olduğu volkanik bölgelerde bulunurlar (L'Haridon ve ark,2003).

2.2. Termofillerin Tarihi

1972'de Brock ve arkadaşları tarafından bildirilen ve o tarihe kadar bilinen en yüksek sıcaklığa sahip olan mikroorganizma *Sulfolobus acidocaldarius* olarak tanımlanmıştır. Bu tür ilk olarak Bakteri domaininde yer almıştır ancak 1980'de yaşamın üç ana domainden meydana geldiğinin tarihe geçmesiyle birlikte *S. acidocaldarius* 'un “Archaea” domainine ait olduğu belirlenmiştir (Garrett ve Klenk, 2007). Bu tür, optimum olarak 75- 80 ° C sıcaklıkta gelişmektedir. Hipertermofiller ise Zillig ve ark. tarafından keşfedilmiştir (Zillig ve ark, 1981). Mikroorganizmalar büyüme sıcaklıklarına göre;

- Psikrofiller: -20 °C'nin altında gelişebilenler
- Mezofiller: 20 °C ile 45 °C arasında gelişenler
- Termofiller: 55 ° C'nin üzerinde gelişme gösterenler ve
- Hipertermofiller: 80°C'nin üzerinde gelişebilenler olarak 4 ana grupta sınıflandırılmışlardır (Kristjansson ve Stetter, 1992).



Şekil 1. Psikrofilik, mezofilik, termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalar için sıcaklık ve büyüme oranlarının ilişkisi (Stetter, 2006a).

2.3. 16S Ribozomal RNA ve Sistematikteki Önemi



Şekil 2. 16S rRNA gen bölgesindeki değişken bölgeler (V1-V9) (Chaudhary ve ark, 2015).

Ribozomal RiboNükleik Asit (rRNA) bütün canlılarda protein sentezinden sorumlu ribozomun alt ünitesidir. rRNA iki alt ünite içermektedir. Bunlar büyük alt ünite (LSU) ve küçük alt ünite (SSU) olarak adlandırılmaktadır. rRNA'nın büyük alt ünitesi ribozom gibi işlev görür ve peptid bağı oluşumunu katalizler. Bir bakteriyel ribozom çoklu ribozomal proteinler ve 23S rRNA, 16S rRNA, ve 5S rRNA olmak üzere 3 ribozomal RNA' dan oluşmaktadır. rRNA, genomda *rrn* olarak adlandırılan bir operon şeklinde düzenlenmiş ilgili genler tarafından kodlanır. Bir bakteriyel genomun büyüklüğüne ve türe bağlı olarak çoklu *rrn* operonlarına sahip olabilir. Kapsüller, flagella, hücre boyutu ve şekli, biyokimyasal özellikler morfolojik özellikler, bakteri türlerinin tanımlanması ve

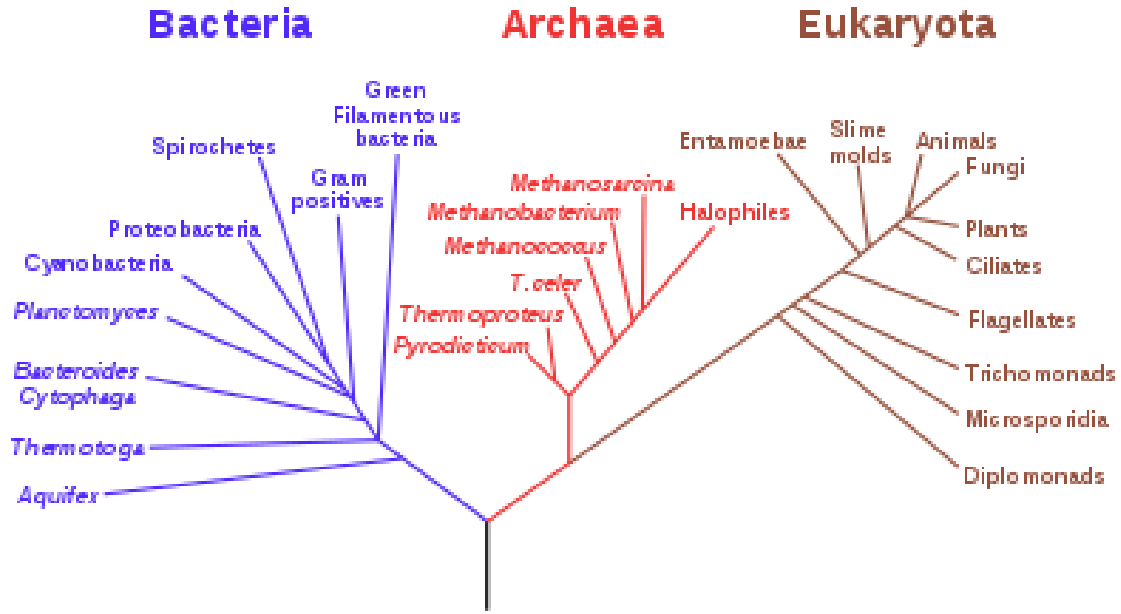
sınıflandırılması için kullanılmıştır. Ancak, bakteriler arasında yatay gen transferinin olması bu özelliklerin onların filogenetik sınıflandırması için çok yeterli olmadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, evrimsel olarak stabil marker genlerinin DNA dizi analizi bakteri filogenetiğini ve çeşitliliğini incelemek için potansiyel bir strateji olarak kabul edilir (Rajendhran ve Gunasekaran, 2011).

1994'te Stackebandt ve Goebel rRNA'ların small subunit (SSU) sekans teknolojisi ve tür tanımlamada kullanımını ortaya çıkarmıştır. 16S *rDNA*'nın sekansındaki %97'den az benzerlik yeni tür olarak tanımlanmıştır (Janda ve Abbott, 2007). Bakteriye taksonomi çalışmalarında 16S *rDNA*'nın genetik marker olarak yaygın kullanımının pek çok sebebi vardır; 16S *rDNA* bütün bakteri ve arkelerde bulunur, evrenseldir. 16S *rRNA* geninin fonksiyonu zaman içinde değişmemiştir. Buna rağmen 16S rRNA bazı değişken bölgeler içermektedir. Değişken bölgelerin varlığı sınıflandırma için bir araç sağlamaktadır. Bunun yanı sıra mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında kullanılan korunmuş bölgelerin varlığı uygun PCR primerleri ve hibridizasyon problemlerinin etkin tasarımına olanak tanımaktadır (Şekil 2). Genin büyüklüğü (1500 bp) informatik bilgi edinmek için yeterince büyüktür.

Ancak 16S *rRNA* çalışmalarında bazı kısıtlayıcı hususlar vardır. Genom başına düşen kopya sayıları 1'den 15'e kadar veya daha fazladır. Kopya sayıları bir ölçüde taksona özel gibi görünse de aynı türün suşları arasında da varyasyonlar kaydedilmiştir. Bazı bakteriyel taksonlarda son derece farklı 16S *rRNA* dizileri gözlenmiştir. 16S *rRNA* dizilerinin daha büyük bir değişkenlik gösterdiği termofilik bakteriler de saptanmıştır. Bu durumda, yatay gen transferinin yüksek oranda potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir (Větrovský ve Baldrian, 2013).

2.4. Arkelerin Tarihi

Dünyaca ünlü moleküler biyolog Carl Woese 1976'da 60 farklı bakteri türünün rRNA'larını analiz ederek bu diziler arasında farklılıklar olabileceğini ortaya koymuştur. Bakterilere çok benzeyen bazı mikroorganizmaların bakterilerden farklı olarak metan ürettiklerini ve bakterilerde görülen rRNA özelliklerinin bu metanojenlerde görülmediğini fark etmiştir. İlk yıllarda Carl Woese'un, çalışmaları sonucu bu kültürdeki mikroorganizmalar "*Archaeobacteria*" olarak tanımlanmıştır. Bu sayede bakterilerin filogenetik sınıflandırılması mümkün hale gelmiştir. 31 Ocak 1980'de yaşamın 3 ana domainden meydana geldiği tarihe geçmiştir (Garrett ve Klenk, 2007).



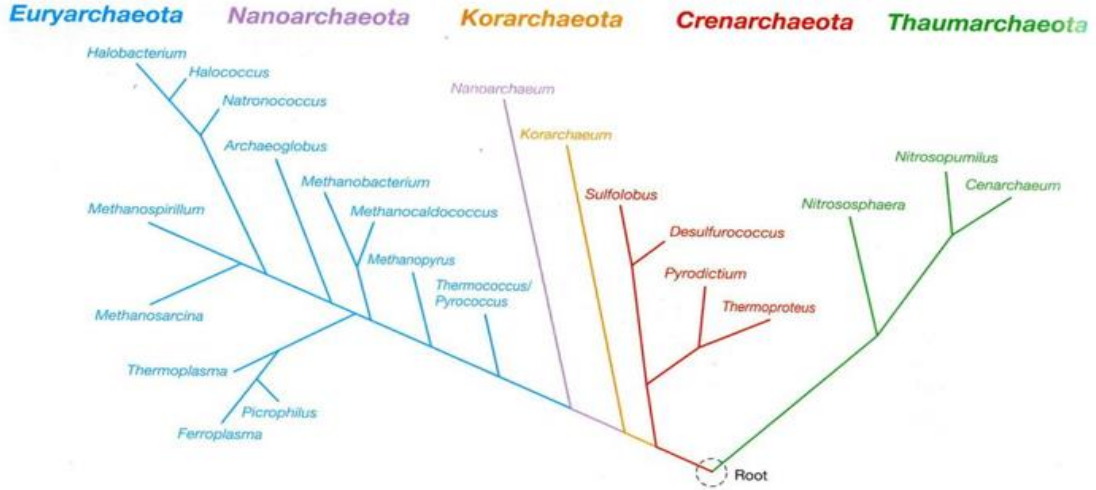
Şekil 3. Yaşamın 3 temel domaini (Garrett ve Klenk, 2007).

Arkeleri diğer canlılardan ayıran özellikler olan; ekstrem ortamlarda yaşayabilmesi, metan üretimi gibi özelliklere ek olarak arkeler; moleküler, metabolik ve sitolojik özellikleri bakımından bakteri ve ökaryot domainlerinden oldukça farklı özellikler taşımaktadır. Arkelerle ilgili ilk bulgular Woese tarafından bulunsa da o tarihler için termofilik ve hipertermofilik arkelerle ilgili çalışmalar yetersiz idi. Termofillerin keşfiyle ilgili yaptığı çalışmalar sonucu Zillig ve arkadaşları bilinenin aksine pek çok termofilik ve hipertermofilik arke türü belirlemişlerdir. 2006'da Karl O. Stetter yayınladığı araştırmada; Woese ve Zillig'in arkelerle ilgili yaptıkları çalışmalardan yola çıkarak hipertermofilik türler üzerine bir araştırma yürütmüştür. 1972'ye kadar en yüksek büyüme sıcaklığına sahip mikroorganizma *Sulfolobus acidocaldarius* iken 1977'de Carl Woese yaşamın domainlerine Arke'yi eklediğinde bu türün arke domainine ait olan bir hipertermofilik mikroorganizma olduğu ortaya çıkmıştır. Stetter, Kerlingarfjöll'deki kaynar su ve çamur örneklerinden çubuk şekilli bir metanojen olan *Methanothermobacter thermautotrophicus*'u izole etmiştir. Bu organizma 97 °C'ye kadar bir sıcaklıkta büyümüş ve 82 °C'de en hızlı (optimal) büyümesini sergilemiştir. *Sulfolobus acidocaldarius*'tan çok daha yüksek sıcaklıklarda hayatta kalabilmiştir. Bunun yanı sıra Stetter ve Zillig 1981'de anaerobik *Thermoproteales*'in ilk üyelerini izole etmişlerdir. *Methanothermobacter*'a benzer şekilde, *Thermoproteales* 97 °C'ye kadar büyüme sıcaklığı sergilemiş ve 65° C veya daha düşük sıcaklıkta büyümüştür. Bunu takiben 1981'de Vulcano Adası'ndaki (İtalya) 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıkta Porto di Levante'deki

sıcak deniz tabanında yer alan bir denizaltı solfatarik alanından örnekler almıştır. İzole edilen örneklerden belirlenen mikroorganizmalar 100 ° C'nin üzerinde gelişim göstermişlerdir.

Böylece Stetter, Volcano'ya adapte olmuş ilkel yaşam tarzlarına dayanarak, benzer hipertermofilik mikroorganizmaların 3,9 milyon yıl önceden beri Dünyada var olabileceği hipotezini gündeme getirmiştir. Buna dayanarak bu heyecan verici hipertermofillerin daha fazlasını bulmak için, son 25 yıl boyunca dünyanın her yerindeki yüksek sıcaklık alanlarını ziyaret etmiş ve oradan ekstremofil organizmaları izole etmiştir. Stetter denizaltı bacaları ile derin deniz hidrotermal bacalarından, jeotermal alanlar, Kuzey Denizi'nin tabanı ve Alaska da yüzeyin yaklaşık 3.500 m altındaki bölgelerden hipertermofilik toplulukları keşfetmiştir (Stetter, 2006a).

2.5. Arkelerin Taksonomisi



Şekil 4. Arke filumları (Madigan ve Martinko, 2009).

Arkeler filogenetik olarak 5 temel şubeye ayrılmaktadırlar:

Crenarchaeota

Kültürü yapılan arkeler arasında Crenarchaeota çoğunlukla, bilinen en yüksek sıcaklık derecelerinde üreyebilen hipertermofilik mikroorganizmaları içermektedir. Bu filumun üyelerine örnek olarak *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Desulfurococcus* cinsleri verilebilir.

Euryarchaeota

Crenarchaeotalar gibi Euryarchaeotaların da büyük bir kısmı ekstrem ortamlarda yaşamaktadır. Bu şube metanojenik Archaea ve bazı ekstrem halofilik Archaea cinslerini içermektedir. Bu sınıfta *Thermococcales*, *Thermoplasmatales*, *Methanopyrales* ordolarının üyeleri bulunmaktadır.

Korarchaeota

Korarchaeota ilk olarak Yellowstone'da bir sıcak su kaynağında yaşayan mikroorganizmaların metagenomik analizleri yapılarak keşfedilmiştir. Bu mikroorganizmaların saf kültürleri bulunmamaktadır.

Nanoarchaeota

Bir diğer Archaeal şube Nanoarchaeota'dır. Bu şubenin tek cinsi olan *Nanoarchaeum* bir Crenarchaeota olan *Ignicoccus* hücrelerine tutunarak yaşayan çok küçük bir parazitik prokaryottur.

Thaumarchaeota

Cenarchaeum symbiosum 'un sekanslanması sonucu keşfedilmiş olan ve Archaea domainine son eklenen şube Thaumarchaeota diğer filumlardan oldukça farklıdır. Thaumarchaea, su ve karasal ortamlardaki önemli amonyak oksitleyicilerdir ve nitrifikasyonda yer aldığı bulunan ilk archaeadır. Genellikle denizlerde ve açık okyanuslarda bulunurlar (Madigan ve Martinko, 2009).

Spang ve arkadaşları 2017'de bir derleme hazırlamışlardır. Çalışma arkeal çeşitliliğe genel bir bakış sunarak, yakın zamanda tanımlanan arkeal soyların metabolik potansiyeli hakkındaki yeni bulguları özetlemekte ve bu verileri arkeal evrim ışığında tartışmaktadır. Yıllar öncesinden bugüne arkelerin taksonomisi iki ana grupta incelenmiştir. Genellikle termofilik ve hipertermofilik türleri içeren Crenarchaeota ve metanojenik, halofilik türleri içeren Euryarchaeota. Ancak yıllar geçtikçe ve mikrobiyal çeşitlilik çalışmaları devam ederken arkeal çeşitlilikle ilgili bilgimiz hızlı şekilde artmaktadır. Şu an hepsi potansiyel olarak Euryarchaeota'nın sinonimleri kabul edilen 4 farklı filum sıralaması tanımlanmıştır. Euryarchaeota, TACK, Asgard ve DPANN arkea. Bu grupların üyeleri sadece ekstrem habitatlarda değil Dünya'daki mikrobiyal biyokütlenin önemli bölümlerini oluşturan tüm ortamlarda, örneğin hayvanların rumenlerinde de bulunmaktadırlar. Son yapılan çalışmalarla birlikte Thaumarchaeota (Taum-), Crenarchaeota (C-) ve Korarchaeota (K-) içeren bir TACK süperfilum önerilmiştir. Bunu Proteoarchaeota olarak da nitelendirmek mümkündür. Günümüzde TACK süperfilumu yüksek taksonomik dereceye sahip üç ek arkea soyundan oluşmaktadır: Geoarchaeota, Bathyarchaeota ve Verstraetearchaeota.

Bunların yanısıra iki yeni filum Asgard ve DPANN de önerilmiştir. Asgard filumu arkelere nazaran ökaryot genomuna daha yakın olan Lokiarchaeota, Thorarchaeota, Heimdallarchaeota ve Odinararchaeota türlerinden ortaya çıkmıştır. DPANN ise Korarchaeota filumunun içinde barındırdığı türleri ve daha çok henüz kültürü yapılmamış ve tanımlanmamış türleri içermektedir. Geniş çeşitliliklerine paralel olarak, karşılaştırmalı genomik analizleri, Archaea'nın metabolik olarak çok yönlü olduğunu ve farklı yaşam tarzlarıyla karakterize olduğunu ortaya koymaktadır.

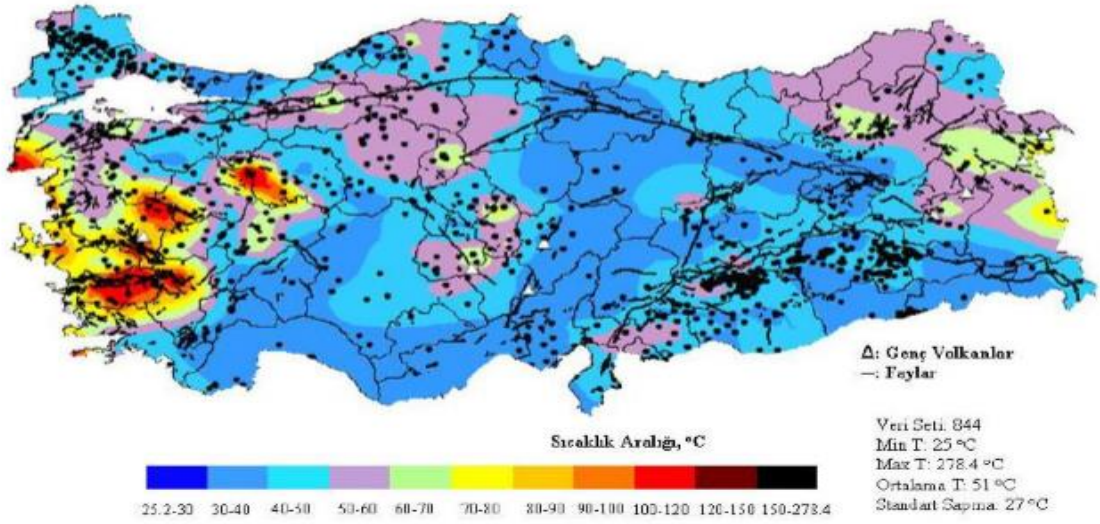
Son zamanlarda keşfedilen arkeal soylar arasında mezofiller ve (hiper-) termofiller, anaeroblar ve aeroblar, ototroflar ve heterotrofların yanı sıra önceden bilinmeyen asetojenler ve farklı metanojen grupları bulunmaktadır. Sonuç olarak kültürden bağımsız genomik yaklaşımlardaki ilerlemeler, yaşamın arkeal alanının eşi benzeri görülmemiş genomik çeşitliliğini ortaya çıkarmaya başlamıştır. Yeni genomik veriler, Archaea üyelerinin metabolik repertuarına, evrimine ve bunların ökaryotlarla ilişkisine dair görüşler sağlamıştır. İlerleyen yıllarda bu bulguların sentez halinde kullanılmasıyla mikrobiyal yaşamın kilit taşlarının yerine oturtulacağı görüşü bu derlemede desteklenmektedir (Spang ve ark, 2017).

2.6. Termofilik Habitatlar

Dünya üzerinde çok sayıda bölgede çeşitli sıcak su kaynakları bulunmaktadır. Biyologların çoğu 19. yüzyılın ortalarından sonra termal sularda yaşayan organizmalar üzerinde gözlemler yapmışlardır. Dünya üzerindeki sıcak su kaynakları Batı Amerika, Orta Afrika, Yeni Zelanda, İzlanda, Japonya, İtalya, Endonezya, Orta Amerika, Orta Afrika gibi ülkelerin bulunduğu geniş bir alanda bulunur. Ancak, termal habitatlarda yaşayan mikroorganizmalar üzerine kapsamlı çalışmalar Yellow Stone Ulusal Parkı'nda yapılmıştır. Bu park dünyada termal özelliklere sahip en önemli yerlerden biridir.

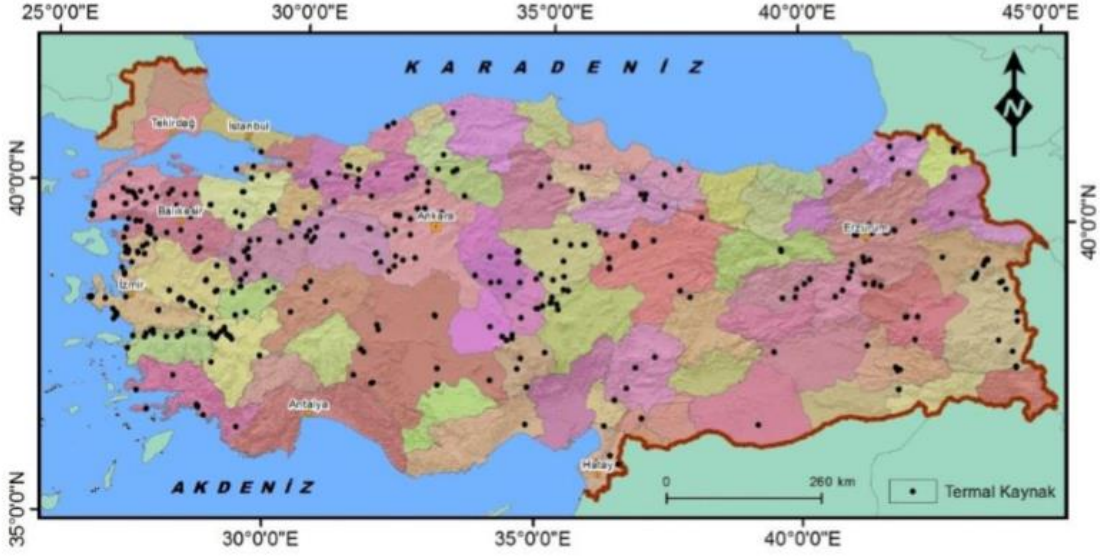
Ülkemiz coğrafi yapısı gereği deprem kuşağında yer almaktadır ve sıcak su kaynakları bakımından oldukça zengindir. Türkiye'nin jeolojik özellikleri nedeniyle debileri, sıcaklıkları, radyoaktiviteleri, eriyik mineral oranları ve ulaşılabilirlikleri ile literatüre giren toplam 410 adet termal kaynağının olduğu saptanmıştır. Termal kaynaklar bakımından en zengin bölgenin 123 adet kaynak ile Ege Bölgesi, en zengin ilin ise 31 adet kaynak ile İzmir olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'deki termal kaynakların daha çok turizme dönük tedavi amaçlı kaplıca kullanımına yönelik olduğu görülmüştür. Bunun yanında sera ve konutların ısıtılmasından, sanayi faaliyetlerine, kuru buz üretimine ve içme suyuna kadar birçok alanda da bu kaynaklar kullanılmaktadır. Biyolojik zenginliklerin belirlenerek kayıt

altına alınması ülkelerin yeraltı zenginliklerinin belirlenmesi kadar önem teşkil etmektedir (Özşahin ve Kaymaz, 2013). Türkiye'nin 500 m ve 100 m derinlikteki yer altı sıcaklıklarını gösteren, yer altı sıcaklık dağılım haritası incelendiğinde, ülkenin batı bölgesinin diğer bölgelere göre daha yüksek sıcaklıklar sergilediği görülmektedir. Şekil 5' de Türkiye 1000 m yeraltı sıcaklık haritası gösterilmiştir.



Şekil 5. Türkiye 1000 m yeraltı sıcaklık haritası (Serpen ve ark,2008).

Bunun yanı sıra Türkiye jeolojik ve jeomorfolojik özellikleri nedeniyle debileri, sıcaklıkları, radyoaktiviteleri, eriyik mineral oranları ve ulaşılabilirlikleri bakımından birbirinden farklı çok sayıda termal kaynağa sahiptir (Şekil 6). Bu özellikleri yönüyle termal alan konusunda Türkiye Avrupa'da birinci sırada, dünyada ise ilk beş ülke arasında yer almaktadır (Özşahin ve Kaymaz, 2013).

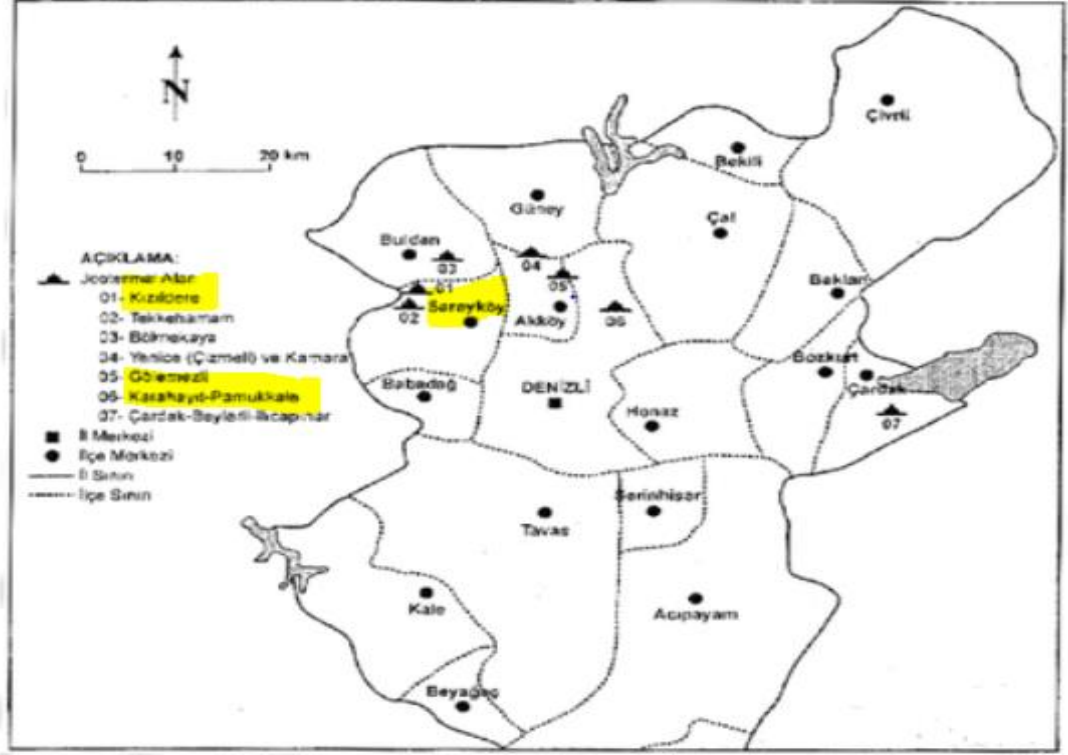


Şekil 6. Türkiye’de termal su kaynaklarının dağılışı haritası (Serpen ve ark, 2008).

Türkiye’de genel olarak termal kaynakların sıcaklıkları düşük olup, bunun yanında sıcaklıkları yüksek olan kaynakların sayısı ise 38 tanedir. Türkiye’nin en sıcak termal kaynağı ise 200-242 °C ile Kızıldere (Denizli)’dir.

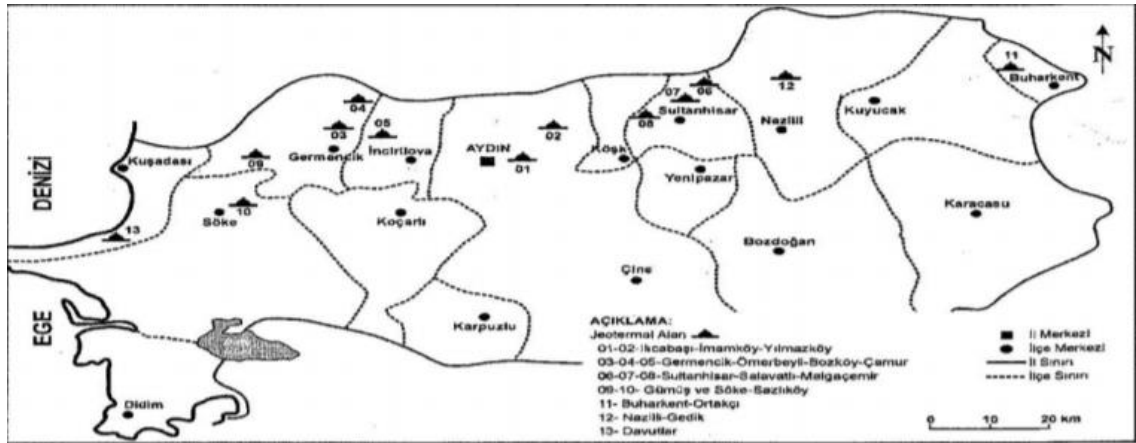
Denizli ve Aydın Termal Alanı

Yukarda da bahsedildiği gibi Türkiye termal kaynaklar açısından zengin bir ülkedir. Özellikle Ege bölgesi bu bakımdan çok elverişlidir. Ülkemizdeki bu çok sayıdaki termal sahaların en önemli olanı ise Kızıldere, Tosunlar, Bölmekaya, Yenice, Gölemezli, Karahayıt ve Pamukkale alanlarını kapsayan Denizli termal alanıdır. Bölgedeki termal kaynaklar yüksek sıcaklıklar ve düşük sıcaklıklar olarak iki temel kategoriye ayrılmıştır. Düşük sıcaklıklılar termal turizm, konut ve sera ısıtmacılığı amacıyla kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıklar ise elektrik santrallerini çalıştıracak güçtedir. Bu alanlar ayrıca kaplıca ve kaplıca tesisi ısıtılmasında kullanılmaktadırlar. Kızıldere ve Tekkehamam sıcak su kaynakları Sarayköy’ün ısıtılmasında da kullanılabilir niteliktedir (Özşahin ve Kaymaz, 2013).



Şekil 7. Denizli ili jeotermal alanları haritası (Serpen ve ark, 2008).

Denizli gibi Aydın'da da sıcak su kaynağı oldukça fazladır ve buradaki jeotermal araştırmalar 1981'de başlamıştır. Türkiye'nin jeotermal olarak potansiyeli de büyük ölçüde Aydın'da yer almaktadır. Bu bölgeler arasında Kızıldere, Buharkent, Germencik ve Kuşadası ilçeleri bulunmaktadır. Aynı zamanda Buharkent ilçesi 2008 tarihinde Resmî Gazete 'de "Termal Turizm Merkezi" ilan edilmiştir.



Şekil 8. Aydın ili jeotermal alanları haritası (Özşahin ve Kaymaz, 2013).

2.7. Termofilik Arkelerde Adaptasyon Mekanizmaları

Farklı türler arasındaki DNA değişimi bakteriyel adaptasyon ve bakteriyel genom evrimine izin verir. Yüzlerce genom dizisinin karşılaştırması gösterir ki, bakteriyel genlerin %20'si, arkeal genlerin %40 'ı yatay gen transferi ile gelmiştir. *Thermotoga maritima* ve *Aquifex aeolicus* genomlarının %24 ve %16,2 kadarı yatay gen transferi ile termofilik arkelerden geldiği gösterilmiştir (Nelson ve ark, 1999). Önemli enzimlerden biri olan ters giraz enziminin arkelerden yatay gen transferi ile bakterilere geçtiği düşünülmektedir. Ters giraz çift sarmallı DNA'nın erime sıcaklığını artırmak için pozitif superkoil bir yapı kazandıran bir DNA topoizomeraz enzimidir. *Thermococcus kodakarensis*'ten ters giraz enzimi gen bölgesi çıkarılmış ve mutant strain yüksek sıcaklıkta daha yavaş gelişme göstermiştir (Atomi ve ark, 2004). DNA yüksek sıcaklıklarda stabil olmadığı için termofillerde DNA onarım sistemleri genomik kararlılığı koruyabilmeleri için daha sıkı olmalıdır. *Thermus thermophilus* ve *Sulfolobus acidocaldarius* gibi termofillerin mutasyonlarının genom analizi, baz değişimlerinin mezofillerde termofillerden daha az sıklıkta ortaya çıktığını göstermektedir (Averhoff, 2009).

Genomlarının küçük olması nedeniyle termofillerdeki protein uzunlukları ve protein ailesi üyelerinin sayısı termofil olmayan homologlarına nazaran azalmıştır. *Thermus thermophilus* ve *Deinococcus radiodurans* genomlarının karşılaştırılması, *T. thermophilus*'da üreaz kompleksi, ramnoz metabolizma yol izi, asetil CoA: asetat/3-ketoasit CoA transferaz, fruktoz taşıma ve yararlanım ve gliserol metabolizması gibi sistematik gen kaybını ortaya çıkarmıştır (Ghosal ve ark, 2005). Termofillerde genomun işlevsel kompleksliğinin azaltıldığı hipotezi muhtemelen sıcaklık adaptasyonunda maliyeti azaltan bir mekanizmadır. Bununla birlikte, evrimsel süreçte termofillerin düşük termostabiliteli proteinleri kodlayan genleri elemine edip etmediği belirsizdir (Jaenicke, 1996). Ek olarak termofillerdeki hem arke hem de bakteriyel ribozomal protein kompleksleri, mezofilik üyelerle karşılaştırıldığında yapıları daha kompakt olmalarına rağmen 23S rRNA'ya daha fazla afiniteye sahiptir.

Ekstrem şartlarda yaşamak ve çoğalmak için organizmalar metabolik ve diğer hücresel fonksiyonlarını bu ortamlara uyarlamak zorundadır (L'Haridon ve ark, 2003). Yüksek sıcaklık membranların akışkanlığını artırır. Optimum membran akışkanlığı sağlamak için hücre, lipidlerin miktarını ve türünü (örneğin doymuş ve doymamış) içeren membran bileşimini ayarlamalıdır. Sıcaklık proteinlerin de yapısını ve işlevini etkiler. Proteinlerin yüksek sıcaklıklarla başa çıkmak için geliştirdiği yollar arasında iyon çifti

içeriğinin arttırılması, hidrojen bağları ve disülfür köprülerinin arttırılması, daha yüksek dereceli oligomerler oluşturulması ve oda sıcaklığında esnekliğin azaltılması bulunur.

Stres faktörlerine maruz kalan birçok biyolojik yapı strese karşı belirli yanıtlar ve bazı maddeler oluşturur. Bu maddelerin başında ise stres proteinleri olarak da adlandırılan ısı şok proteinleri gelir (Guzzo,2012). Bu bilgiler ışığında termofillerde ısı şok protein içeriğinin arttığı da belirlenmiştir (Jaenicke,1996).

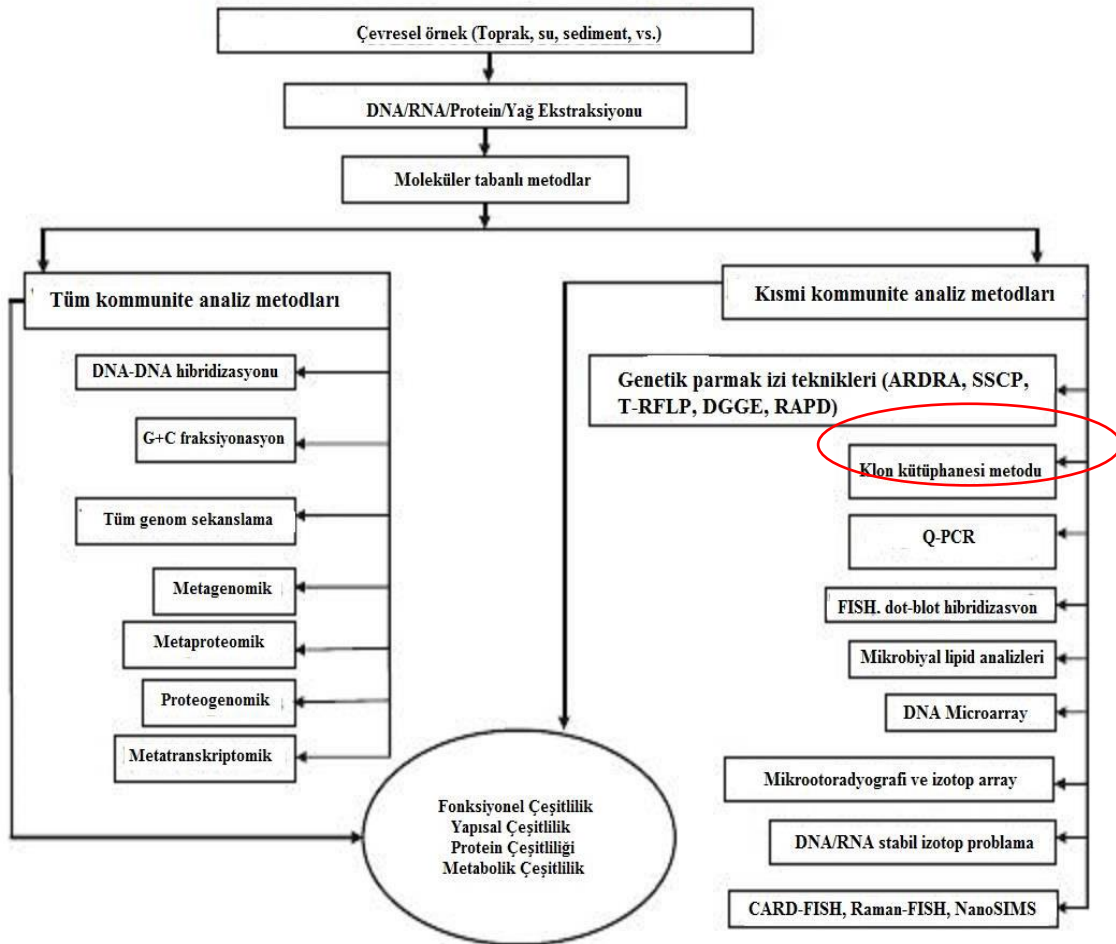
2.8. Arkelerin Biyoteknoloji Alanında Kullanımları

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvan kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır (Amend ve ark, 2003). Enzim üretiminde kullanılan mikroorganizmalar sadece enzim üretme yeteneklerine göre değil, toksik ve patojen olmamalarına göre de seçilmektedir. Bugün, endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenlidir. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Günümüzde, endüstriyel olarak önemli birçok kimyasal proses, yüksek sıcaklık ve basınç gibi sert koşullarda gerçekleştiğinden, bunlara alternatif ve çevresel etkisi daha az yöntemler için ekstrem koşullara dayanıklı enzimlere gerek duyulmaktadır. Günümüzde endüstriyel enzimlerin büyük çoğunluğu mezofilik mikroorganizmalardan sağlanmakta, ancak birçok avantaja sahip olmalarına karşın, uygulamalara dayanıksız olmaları nedeni ile kullanımları sınırlı kalmaktadır. Öte yandan, ekstrem termofil mikroorganizmalardan elde edilen enzimler (ekstremozimler) ekstrem koşullara daha dayanıklı olduklarından, enzim üretimi için önemlidirler. Arkelerin sıcaklık, tuzluluk ve pH sınırlarında işlev gösterme kabiliyetlerinin bir sonucu olarak, termofilik arkelerin ekstremofilik enzimleri veya ekstremozimleri günümüzde birçok uygulamada kullanım alanı bulmaktadır ve çeşitli biyoteknolojik çalışmalarda kullanım için düşünülebilmektedir. Arkeler, aktif çamur sistemlerinin giderilmesinde kilit bir rol oynamaktadır. Ek olarak termofilik arkeler, *Metallosphaera sedula* gibi termoasidofilik mikroorganizmaların katı sülfid minerallerine bağlandığı ve sonuçta altın ve bakır gibi metallerin salınmasıyla oksitlendiği düşük dereceli cevherlerin elde edilmesinde (Biomining) de kullanılmaktadır

(Norris ve ark, 2000). Termofilik ve hipertermofilik arkelerden elde edilen ısıya dayanıklı enzimlere ekstremozimler adı verilmektedir (Eichler,2001). Termofilik ve hipertermofilik arkelerden elde edilen ekstremozimler üç başlık altında toplanabilmektedir. Bunlar glikozil hidrolazlar, proteazlar ve DNA ilişkili enzimlerdir.

2.9. 16S rDNA Analizi

Kültürden bağımsız yöntemler ve 16S rDNA molekülü

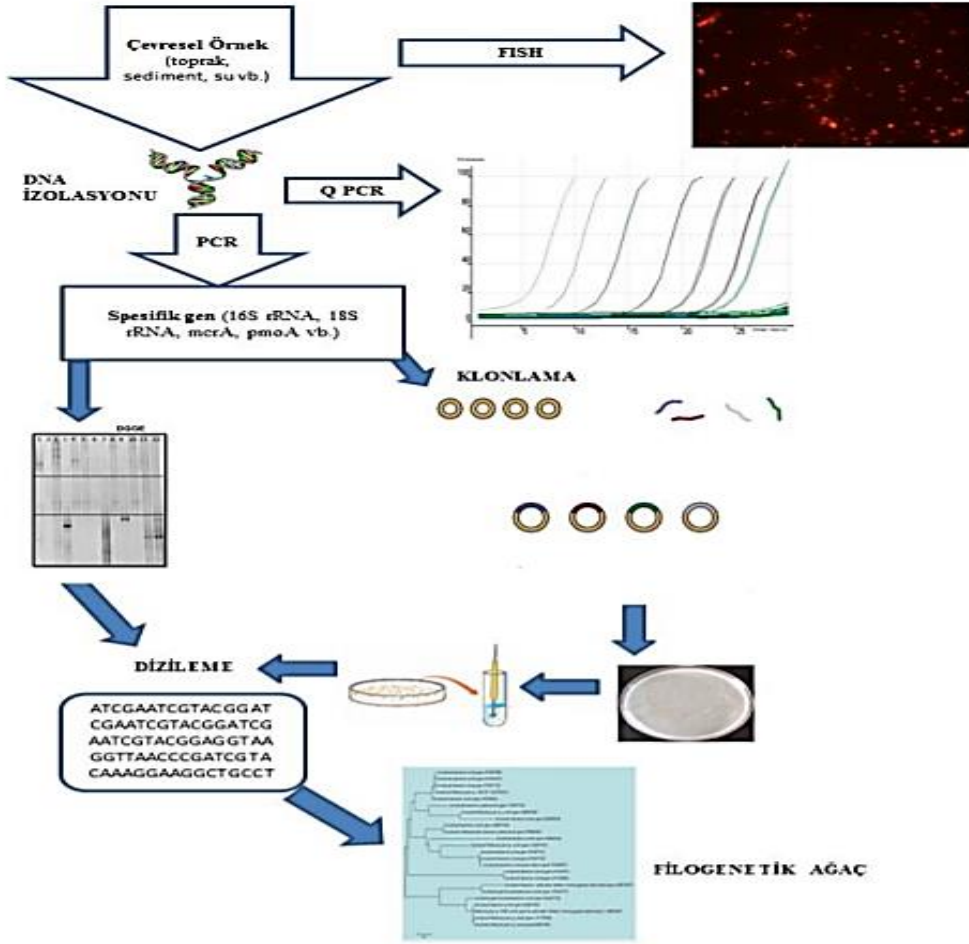


Şekil 9. Kültürden bağımsız moleküler bazlı metodlar (Ahmad ve ark,2011).

Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan kültürden bağımsız yöntemler Şekil 10'da özetlendiği gibidir. Bu amaçla pek çok farklı molekül (DNA, RNA vb) ve /veya yaklaşım seçilebilmektedir Farklı habitatların prokaryotik çeşitlilikleri hem mikrobiyolojik

kültür temelli hem de moleküler yöntemlere bağılı yaklaşımlar kullanılarak belirlenebilmektedir. Kültür temelli yöntemlerin kullanılabilmesi mikrobiyal canlılığa bağılı olduğu için ekstrem koşullarda hayatta kalmaya adapte arke türlerini laboratuvar koşullarında canlı tutmak her zaman mümkün olmamaktadır. Pace ve arkadaşları ilk olarak 1986'da ssurRNA'lar için tasarlanan primerleri kullanarak PCR yöntemiyle çevresel araştırmalara başlamışlardır (Pace ve ark,1986). Doksanlı yıllardan itibaren kullanılmaya başlanan PCR-bazlı ve örneklerden direkt 16S *rDNA* ların çoğaltıldığı moleküler yöntemler sayesinde çeşitli habitatlardaki bakteri ve arkeleri (eğer önceden tanıları yapılmış ve veri tabanına girilmişse) genus/tür bazında tespit etmek mümkündür.

Kültürden bağımsız yöntemlerle bir çevrede bulunduğunu doğruladığımız yani sekans analiziyle tespit ettiğimiz prokaryotik canlıları laboratuvarında organizmanın besinsel ve çevresel isteklerine bağılı olarak kùltive edebiliriz. Çevresel örneklerden DNA ekstraksiyonundan başlayarak klonların plaklarda geliştirilmesine kadar olan süreç Şekil 10'de özetlenmiştir. Kısaca, örneklerden DNA ekstrakte edilir ve PCR ile örnekteki tüm 16S *rDNA* lar çoğaltılır. Amplikonlar plazmidlere klonlanır ve *E. coli* hücreleri bu rekombinant plazmidler ile transforme edilir. Sonrasında çevresel klonları içeren koloniler petride geliştirilir ve her bir klonun içerdđi 16S *rDNA*'lar dizilenecek veri tabanındaki diziler ile karşılaştırılır.



Şekil 10. Kültürden bağımsız (PCR-bazlı) yöntem (Lasken ve McLean,2014).

Ekstrem çevrelerdeki arkeal çeşitliliğin belirlenmesi için yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Röling ve arkadaşları tarafından 2004 'te yapılan çalışmada, petrol rezervuarları, yeraltı ham petrol depolama boşlukları ve hidrokarbonla kirlenmiş sucul evreler gibi yağ içeren yüksek sıcaklık olan ortamlarda termofilik arkeler tespit edilmiştir. Bunun bir sonucu olarak termofilik arkelerin biyoremediasyonla ilişkilendirilebileceği görülmüştür (Röling ve ark, 2004).

2005'te Dombard ve arkadaşları tarafından ABD'nin Yellowstone ulusal parkında yapılan çalışmada; 3 farklı kaplıcadan örnekler alınmıştır. *Thermosphaera aggregans* gibi hipertermofilik türlerle birlikte kültürü yapılmamış çok sayıda mikroorganizma tespit edilmiştir (Dombard ve ark,2005).

Chaban ve arkadaşları 2006'da arkelerin yaşam alanlarına odaklanan bir çalışma yayınlamışlardır. Bu derlemede arkelerin normal habitatlarda da (su ve soda gölleri, bataklıklar vb.) var olabileceği ortaya koyulmuştur (Chaban ve ark,2006).

2010'da Malkawı tarafından yürütülen çalışmada Ürdün kaplıca sularında bakteri ve arkea çeşitliliği kültürden bağımsız olarak tespit edilmiştir. Farklı kaynaklardan 5 örnekte termofilik ve hipertermofilik arke türlerine rastlanmıştır (Malkawi ve Al-omari, 2010).

2014'te Budakoğlu ve ark. Acıgöl'ün Archaeal mikrobiyal çeşitliliği çalışmasına göre; TA klonlama yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada toplamda 50 koloni seçilmiş ve sekanslanan mikroorganizmaların tümünün Halofilik mikroorganizmalara ait olduğu belirlenmiştir (Budakoglu ve ark, 2014).

2016'da Çınar ve arkadaşları Doğu Anadolu bölgesinde (Sivas, Erzincan, Bingöl) bulunan 4 farklı tuzlada prokaryotik çeşitlilik analizi gerçekleştirmişlerdir. Genellikle halofilik arkeler tespit edilirken bunun yanı sıra halotolerant mikroorganizmalara da rastlanmıştır (Çınar ve Mutlu, 2016).

2018'de Güven ve arkadaşları Türkiye'nin ekstrem çevrelerinden alınan kaynaklarda termofilik ve halofilik mikroorganizmaların izolasyonu ve tanımlanmasını amaçlamışlardır. İncelenen termofilik bakteriler; *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* ve Bacillaceae familyasına ait *Aeribacillus* ve *Thermus* ve *Thermomonas* gibi termofillerdir. Halofilik mikroorganizmaların ise genelini arkeler oluşturmuştur (Güven ve ark,2018).

Ülkemizdeki biyoçeşitliliğin ortaya konmasına katkıda bulunan mikrobiyal çeşitlilik çalışmaları yıllardan beri artarak devam etmektedir. Genellikle halofilik arkelerle yapılan bu çalışmalarda kültür bağımlı ve kültürden bağımsız yöntemler kullanılarak pek çok arke tanımlanmıştır. Ancak, sıcak çevrelerde yaşayan arkelerin kültürasyonu zor olduğu ve çevresel-direkt moleküler yöntemler ülkemizde son yıllarda kullanılmaya başlandığı için ekstrem çevrelerdeki biyoçeşitliliğimiz henüz tam anlamıyla ortaya konamamıştır.

Yapılan literatür taramalarına göre Türkiye'de termofilik ve hipertermofilik arkelerin mikrobiyolojik ya da klon kütüphaneleri oluşturularak tespit edildiği bir araştırmaya rastlanmamıştır. Aydın ve çevresindeki termal alanların zenginliği de düşünüldüğünde tez çalışmamız biyoteknolojik açıdan bir potansiyel oluşturmaktadır ve ülkemiz biyoçeşitliliğine katkı sağlayacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Su, Çamur ve Birikinti Örnekleri

Çalışmada kullanılan örnekler Denizli ve Aydın illerinden 2016, 2019 ve 2020 yıllarında toplanmıştır. Örnekler -80 °C’de muhafaza edilmektedir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan örnekler ve istasyonları.

İstasyon	Örnek İsmi ve Numarası	Sıcaklık (°C)	Koordinat
Germencik-Aydın	Alangüllü	55	37°56’13’’N27°37’39’’E
Buharkent-Aydın	Ortakçı	46	37°56’19’’N27°37’35’’E
Sarayköy-Denizli	Hasköy inaltı 1.İstasyon	86	37°55’36’’N28°48’29’’E
Sarayköy-Denizli	Hasköy İnaltı 2.İstasyon	92	37°55’36’’N28°48’29’’E
Sarayköy-Denizli	Umut termal Otel	62	37°55’18’’N28°49’45’’E
Sarayköy-Denizli	Kabağaç -1 Kuyu suyu	57	37°56’06’’N28°45’39’’E
Sarayköy-Denizli	Kabağaç-2 Kırmızı birikinti	57	37°56’06’’N28°45’39’’E
Sarayköy-Denizli	Kabağaç-3 Dere suyu	52	37°56’06’’N28°45’39’’E
Seferihisar-İzmir	Seferihisar	65	38°11’38’’N26°49’50’’E



Resim 1. Alangüllü örneklem alanı (55 °C)



Resim 2. Hasköy İnaltı (1) örneklem alanı (86 °C)



Resim 3. Hasköy İnaltı (2) örneklem alanı (92 °C)



Resim 4. Kabağaç örneklem alanı (57 °C)



Resim 5. Ortakçı örneklem alanı (46 °C)



Resim 6. Umut termal örneklem alanı (Aşağı su 62 °C).

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Tryptic Soy Agar (TSA)

18.5 g hazır besiyeri 500 ml distile suda ısıtılarak çözülmüştür. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edilen besiyeri steril petrilere dökülmüştür.

Tryptic Soy Broth (TSB)

12 g hazır besiyeri 500 ml distile suda ısıtılarak çözülmüştür. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Brain Heart Infusion (BHI) Agar

24.5 g hazır besiyeri 500 ml distile suda ısıtılarak çözülmüştür. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Brain Heart Infusion (BHI) Broth

18.5 g hazır besiyeri 500 ml distile suda ısıtılarak çözülmüştür. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir.

AXI Seçici Besiyeri

300 ml TSA içerisine 300 uL Ampisilin,750 uL X-gal,1500 uL IPTG ilave edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

50X Tris Asetat EDTA (TAE) Tamponu pH :8

Trizma Base: 242 g

Glasiyel Asetik Asit: 57.1 ml

EDTA (0,5 M) pH:8: 100 ml

Bütün maddeler bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüştür. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 8'e ayarlanmıştır. Son hacim distile su ile 1 lt'ye tamamlanmıştır. 121 °C 15 dk otoklavlanarak steril edilerek kullanılmıştır.

10X Tris-Borat EDTA (TBE) tamponu pH:8

Trizma Base: 108 g

Borik Asit: 55 g

EDTA: 8.3 g

Bütün maddeler bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüştür. Hazırlanan çözeltinin pH ı 8'e ayarlanmıştır. Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. 121 °C 15 dk otoklavlanarak steril edilerek kullanılmıştır.

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Primerler

Tablo 2. Çalışmada kullanılan primerler

Primer Kodu	Sekans 5'- 3'	Restriksiyon Bölgesi Primer	Tm	Referans
25F	CYGGTTGATCCTGCCRG		49	(Vetriani ve ark. 1999)
A751F	CCGACGGTGAGRGRYGAA	(EcoRI) atcGAATTCCCGACGGTG AGRGRYGAA	54	Baker ve ark. 2003)
1ArF	TCCGGTTGATCCYGCBRG		60	(Bahram ve ark. 2019)
A1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		53	(Burns ve ark. 2004)
U1406R	GACGGGCGGTGTGTRCA	(EcoRI) atcGAATTCACGGGCGGT GTGTRCA	52	(Baker ve ark. 2003)
1000ArR	GGCCATGCAMYWCCTCTC		58	(Gantner ve ark. 2011)

3.2. Yöntem

3.2.1. Su, Çamur, Toprak ve Birikinti Örneklerinin Alınması

Su örnekleri steril şişelere, sediment ve çamur örnekleri ise steril kavanozlara alınarak, laboratuvara getirilmiş ve örnekler kullanılana kadar -20 C'de saklanmıştır. Örneklerden DNA izolasyonu öncesinde 5000 rpm +4 C 'de 30 dk'lık döngüler halinde santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Dibe çöken pellet yardımıyla DNA izolasyonu işlemi uygulanmıştır.

3.2.2. Örneklerden DNA İzolasyonu

Örneklerden DNA izolasyonları için "Presto Soil DNA isolation kiti" ile üretici firmanın belirttiği şekilde proses uygulanmıştır.

Presto Soil DNA İzolasyon Kiti

- 250-500 mg örnek, Bead beating tube aktarılır. Ve 750 ul SL1 buffer eklenir.10 dk oda sıcaklığında vorteks işlemi gerçekleştirilir.
- 2 dk 11.000 g hızda santrifüj yapılır. (İşlemin amacı SL1 buffer kaynaklı köpüklerin giderilmesidir.)
- Ardından 150 ul SL2 tamponu eklenir ve 5 sn vorteks işlemi gerçekleştirilir.
- 0-4 C de 5 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra çözünmeyen parçacıkların çözünmesi ve PCR inhibitörlerini çöktürmek için 1 dk 11.000 g hızda santrifüj yapılır.
- Ardından oluşan süpernatantın 600 ul'si mavi filtreli tüpten geçirilerek 2 ml'lik microsantrifüj tüpüne aktarılır.
- 1dk maximum hızda santrifüj edilir ve filtre atılır yerine 1,5 ml'lik microsantrifüj tüpüne alınır. Daha sonra DNA bağlama işlemine geçilir.
- 900 ul SL3 buffer eklendikten sonra 5 sn hızlıca altüst edilir ve yeşil başlıklı tüplere 750 ul süpernatant aktarılır.1 dk 11.000 g'de santrifüj edilir.
- Bu işlem bir kez daha tekrar edilir.
- Ardından süpernatant atılır temiz bir tüpe geçilir ve yıkama işlemi yapılır.400 ul SL3 bufferla yıkama yapılır.30 sn 11.000 g'de santrifüj edilir. Ve alt kısım dökülür.

- Bu işlem iki kez de 600 ul solüsyon ile tekrar edilir. En son 11.000 g'de 3dk santrifüj yapılır ve kurumaya bırakılır.
- 5-10 dk kuruduktan sonra, 1,5 ml'lik microsantrifüj tüpüne alınır ve üzerine 50 ul Elution buffer eklenir. (Kullanılmadan önce 65 C'de 5 dk inkübasyon yapılır.) 11.000 g'de 2 dk santrifüj yapılır.
- Elde edilen DNA örneği -20 C'de saklanır.

3.2.3. 16 rRNA Genlerinin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Amplifikasyonu

25F/1492R		751F/1406R	
95°C	5 dk	95°C	5 dk
95°C	1 dk	95°C	30 sn
48°C	1 dk	55°C	40 sn
72°C	90 sn	72°C	1 dk
72°C	20 dk	72°C	7 dk
30 siklus		35 siklus	

1F/1000R	
95°C	5 dk
95°C	30 sn
55°C	30 sn
72°C	35 sn
72°C	20 dk
32 siklus	

Şekil 11. PCR koşulları.

PCR sonucunda elde edilen 16S rDNA ampliconlarına ilk olarak PCR Clean-up kiti kullanılarak pürifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 751F/1406R primer çifti ile elde edilen ampliconlarla restriksiyon ve plazmid restriksiyonu yapılmıştır. 1F/1000R ve 25F/1492R primer çiftleri ile elde edilen ampliconlarla TA klonlama yöntemi gerçekleştirilmiş ve ligasyona bırakılmıştır.

PCR CleanUp Kiti ile Pürifikasyon İşlemi

Her bir örnek için volüm*3 Binding Solution koyulur.

- Örnekler Spin+Collection tüpe alınır. 1 dk 14 000 g 'de santrifüj işlemi gerçekleştirilir.
- Alt kısım dökülür. Üzerine 700 ul Wash Solution eklenir ve 1 dk beklenir.
- Daha sonra 14 000 g'de 1 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilir.
- Alt kısım dökülür ve bu işlem bir kez daha tekrar edilir.
- Daha sonra kolonlar boş olarak 5 dk max. 'de santrifüj edilir.
- Alt kısım atılır yerine 1,5 ml'lik microsantrifüj tüpü koyulur.

- 50 ul Elution Solution eklenir ve DNA bağlanması için 1-2 dk beklenir.
- Daha sonra 2 dk max.'de santrifüj işlemi gerçekleştirilir.
- Pürifiye edilen örnekler +4 C de saklanır.

3.2.4. Amplikon ve Plazmid'in Restriksiyonu

Tüm bu işlemler sonrasında restriksiyon enzimiyle restriksiyon işlemi yapılmıştır. Plazmit olarak E. coli suşu olan pUC19 plazmidi kullanılmıştır. Ardından presipitasyon işlemine geçilmiş ve bu aşamada DNA ve plazmid aynı tüpte birleştirilmiştir.

Amplikon Restriksiyonu:

- 10 uL Total DNA
- 2 uL FastDigest Enzim Tamponu(10X)
- 1 uL FastDigest HindIII Restriksiyon Enzimi
- 7 uL Distile su

pUC19 Plazmid Restriksiyonu:

- 10 uL pUC19 plazmidi
- 2 uL FastDigest enzim tamponu(10X)
- 1 uL FastDigest HindIII Restriksiyon Enzimi
- 1 uL Alkalen Fosfataz
- 6 uL Distile su

Bileşenler karıştırıldıktan sonra 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında Fenol/Kloroform kullanılarak presipitasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlem sonrasında ligasyon işlemine geçilmiştir.

TA Klonlama Vektörü Yapımı ve TA Klonlama İşlemi

Plazmid DNA Restriksiyonu

- 10 µl pUC19 plazmidi
- 2 µl 10X Enzim Tamponu
- 1 µl SmaI Restriksiyon Enzimi
- 7 µl Distile su

Bileşenler karıştırılıp spin yapıldıktan sonra 1 saat 37°C'de inkübe edilir. Sonrasında, restriksiyon ürününün 5 µl'lik kısmı elektroforez için ayrılır. Sonrasında presipitasyon işlemi yapılır.

Küt uçlu vektöre dTTP eklenmesi (TA Vektörüne dönüştürülmesi)

- 34 µl Plazmid DNA'sı
- 10 µl 10 mM dTTP (Final kons. 2 mM)
- 1 µl Taq DNA polimeraz (1u/µl)
- 5 µl 10X PCR Tamponu

Hazırlanan reaksiyon 72 °C'de 2 saat inkübe edilir. Yeniden presipitasyon işlemi tekrarlanır. Ardından 10 ul su ile sulandırılmıştır. Ligasyon işlemi için 22°C 'de gece boyu inkübasyona bırakılır.

*Bu yöntemde normal PCR koşullarından farklı olarak son uzama süresi 30 dakikadır ve ligasyonun kurulacağı gün taze olarak kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur.

Ligasyon:

- 17 uL vektör-total DNA karışımı
- 2 uL T4 Ligaz tamponu (10X)
- 1 uL T4 DNA ligaz (5 U/uL)

Hazırlanan reaksiyon 22°C'de 1 saat bekletildikten sonra 16°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Bununla birlikte klonlama işlemi için kullanılan bir diğer yöntem ise;

3.2.5. Elektrokimyasal Kompetan Hücre Hazırlama Yöntemi

- Gecelik bakteri kültüründe 50 uL alınıp 1,5 mL TSB içerisine eklenerek 37°C' de yaklaşık 3 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrası, bakteri kültürünü içeren tüp 30 dakika buz içerisinde bekletilir ve 5000 rpm'de 10 dakika +4°C santrifüj edilir.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pellet üzerine 10 mL soğuk distile su ilave edilerek homojenize edilir. Ve 5000 rpm'de +4°C 'de 10 dakika santrifüj edilir. Bu işlem ikinci kez tekrarlanır.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pellet üzerine 10 mL %10'luk soğuk gliserollü su eklenerek homojenize edilir 5000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 30 mL 80 mM MgCl₂ 40mM CaCl₂ eklenerek homojenize edilir. 5000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilir.

- Daha sonra yeniden süpernatant atıldıktan sonra pellet yoğunluğuna göre 500-1000 uL 0.1 M'lık CaCl₂ eklenerek homojenize edilir.
- Hazırlanan kompetan hücre buz üzerinde her birinde 100 uL olacak şekilde tüplere dağıtılır. Üzerine 10 uL ligant eklenir ve pipetaj yapılarak karıştırılır.30 dk buzda inkübasyona bırakılır.
- Süre bitiminde 42° C 'de 2 dk thermoshaker'da inkübe edilir ve sonra 5 dk buzda bekletilir.
- Daha sonra her birinde 900 uL olacak şekilde tüplere TSB eklenir.
- Thermoshaker'da 37°C 'de 1 saat bekletilir.
- Süre bitiminde AXI seçici besiyerlerine (Ampisilin-Xgal-İPTG ve Antibiyotik içerir.) ayrı ayrı 50 ve 200'er uL olacak şekilde hücreler yayma ekim yöntemi ile ekilir.
- 37°C'de en az 24 saat olmak üzere inkübasyona bırakılır. (Üreme)

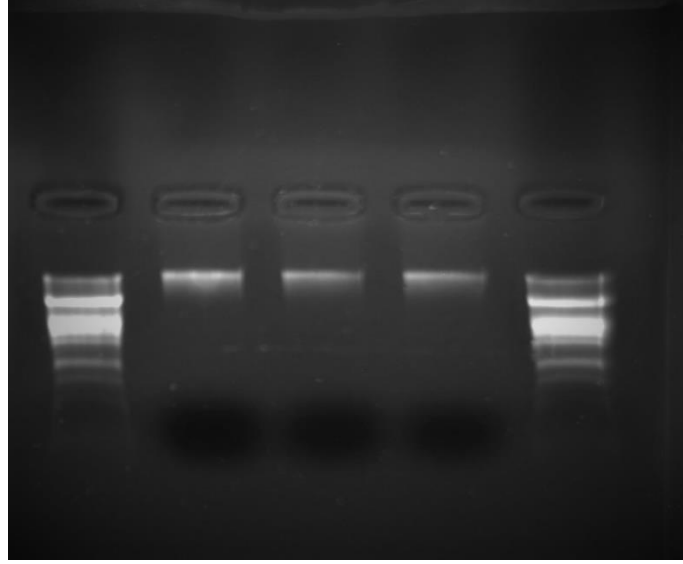
3.2.6. Transformantların Seçilmesi, M13 PCR ve Sekans Analizi

Klonlama sonucunda Ampisilin, IPTG ve X-Gal içeren AXI besiyerinde oluşan beyaz klonilerden (transformantlardan) en az 30-50 koloni seçilmiştir. 16S fragmentlerinin çoğaltılabilmesi için M13F ve M13R primerleri kullanılarak koloni PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan PCR sonucunda elde edilen DNA fragment boyutlarının uygun olması halinde (> ~500 bp) sekans analizi hizmet alımı yolu ile yaptırılmıştır. Sekans analizi için de M13F ve M13R primerleri kullanılmıştır. Elde edilen diziler NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sitesi aracılığıyla BLAST programı kullanılarak BLAST analizi yapılmış ve klonlardan elde edilen dizilere göre benzerlik oranları / klonların hangi gruplara ait oldukları saptanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Sıcak Su Örneklerinden DNA İzolasyonu

Umut termal, Alangüllü ve Ortakçı örneklerinden izole edilen total DNA'ların elektroforez görüntüleri sırasıyla resim 7'de verilmiştir. Kabağaç ve Hasköy numunelerinden elektroforez sonucu DNA görüntülenememiş ancak ekstraksiyon sonucu elde edilen örnekler yine de PCR için kullanılmıştır.



Resim 7. DNA Örneklerinin Elektroforez Görüntüsü.

4.2. 16S *rDNA* Genlerinin PCR ile Çoğaltılması

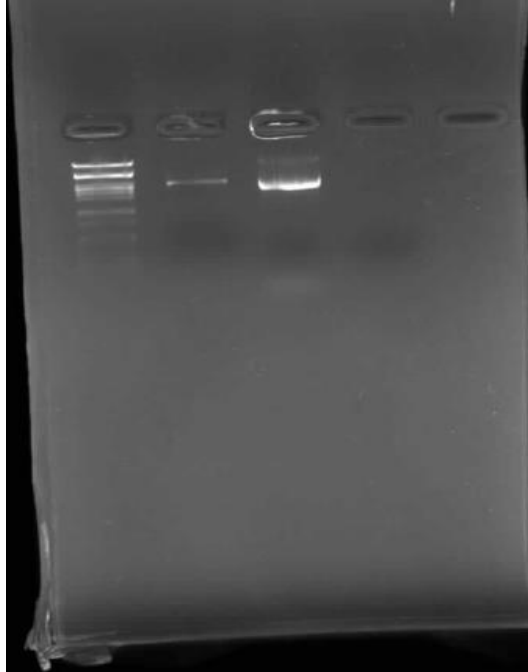
DNA izolasyonu sonrası elde edilen örnekler ile 751F/1406R, 25F/1492R ve 1F/1000R primerleri kullanılarak 16S *rDNA* genlerinin PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerler ve pozitif sonuç veren örneklerin karşılaştırılması Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan primerler, PCR ve klonlama sonuçları.

	25F/1492R		1F/1000R		751F/1406R	
	PCR	Klonlama	PCR	Klonlama	PCR	Klonlama
Alangüllü	-	-	+	+	-	-
Hasköy-1	+	+	-	-	+	+
Hasköy-2	+	-	+	+	-	-
Kabağaç-1	+	+	-	-	-	-
Kabağaç-2	+	+	-	-	-	-
Kabağaç-3	+	+	-	-	-	-
Ortakçı	+	-	+	+	-	-
Seferihisar	-	-	-	-	+	+
Umut Termal	-	-	+	+	+	+

4.3. Amplikon ve Plazmit Restriksiyonu

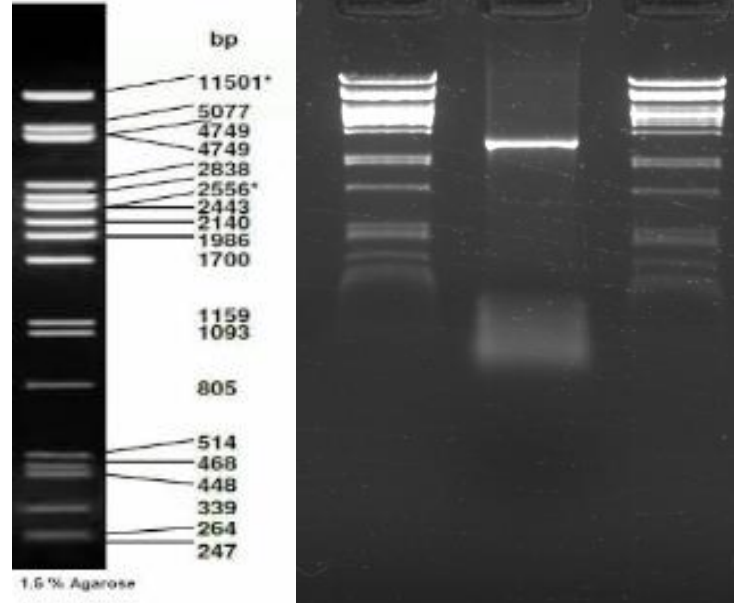
751F/1406R primeri ile elde edilen amplikonların klonlama işlemi için Amplikon ve plazmit restriksiyonu gerçekleştirilmiştir. EcoRI enzimi ile yapılan restriksiyon işlemi elektroforez görüntüleri resim 8’de verilmiştir.



Resim 8. pUC19 EcoRI ile Restriksiyon (Soldan sağa 1. Lamda marker, 2. Plazmid, 3. Amplikon).

4.4. TA klonlama vektörü

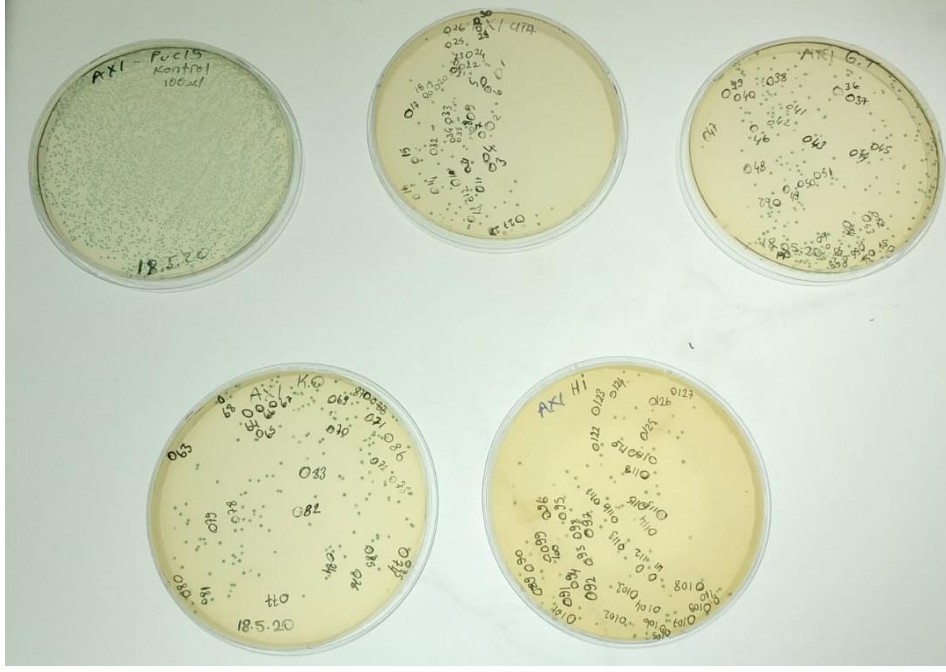
25F/1492R ve 1F/1000R primerleri ile elde edilen ampliconların klonlanması için TA klonlama kiti kullanılmıştır ve ayrıca kendi protokolümüz olan TA vektör hazırlama işlemi gerçekleştirilmiştir. SmaI ile kestiğimiz Puc19 plazmidinin elektroforez resmi resim 9'da verilmiştir. Ardından, plazmit ligasyon işlemi için 22°C'de bir gece inkübe edilmiştir.



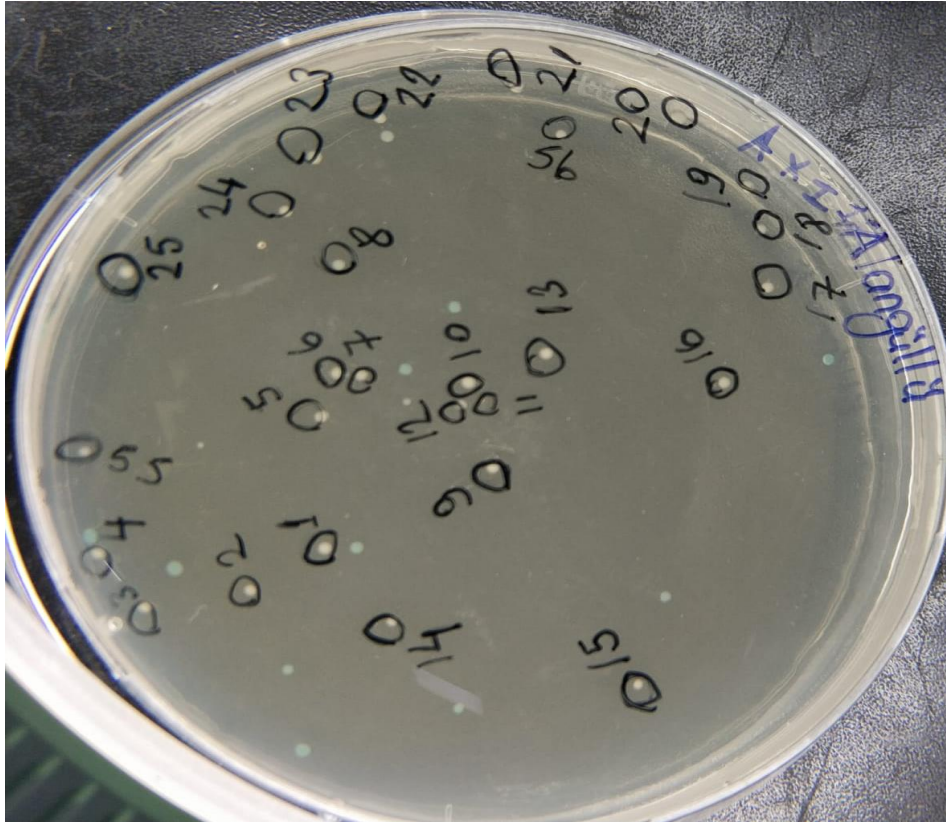
Resim 9. TA vektör (pUC19 plazmidinin SmaI Enzimi ile Restriksiyon).

4.5. Transformantların Seçilmesi ve M13 PCR

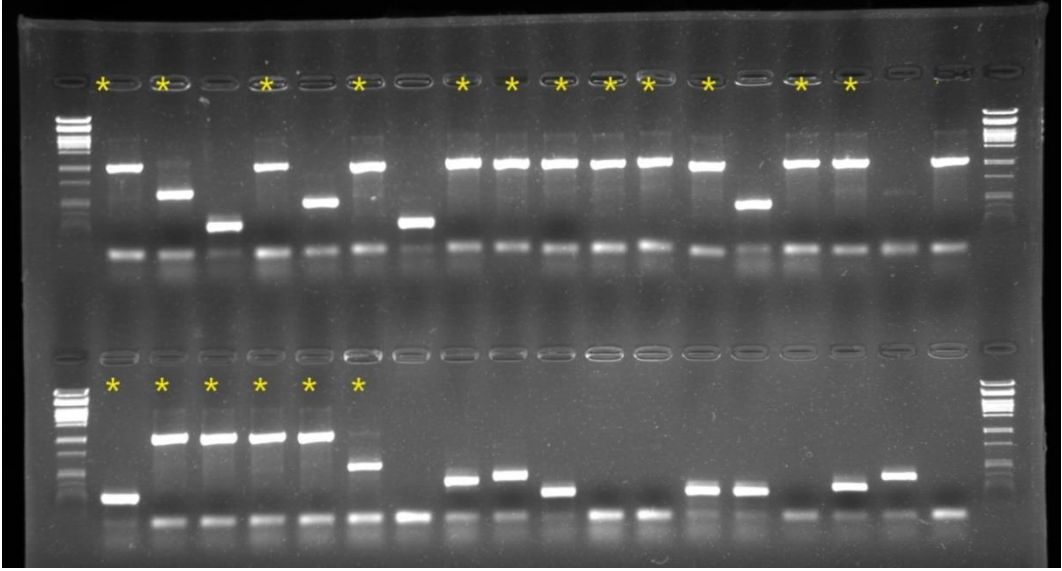
Transformasyon sonucu AXI besiyerinde gelişen beyaz koloniler seçilmiştir. (Resim 10-11) M13 primerleri ile yapılan PCR sonucunda 500 bp ve üzeri boyutlardaki ampliconlar sekans analizine gönderilmiştir. Farklı örneklere ait klonların M13 PCR sonuçları resim 12-18'de verilmiştir. Sekansa gönderilen ampliconlar elektroforez görüntülerinde yıldız ile gösterilmiştir. Klonlara farklı kodlar verilmiştir.



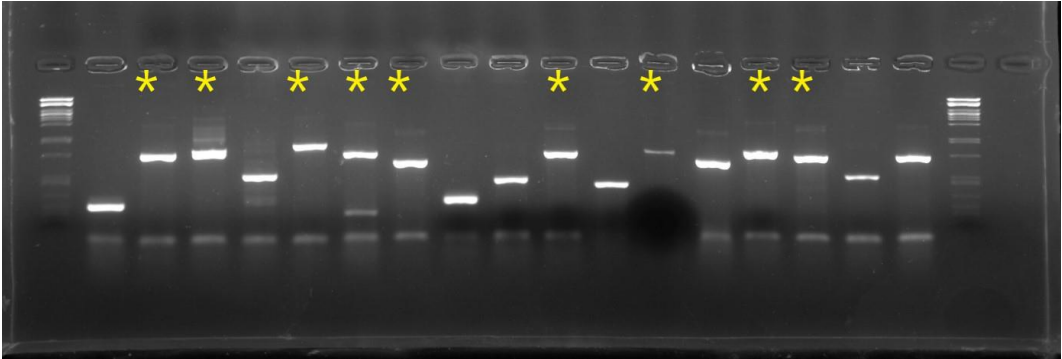
Resim 10. Umut termal, Ortakçı, Hasköy İnalıtı (1) ve Hasköy İnalıtı (2) örneklerinden elde edilen klonların kolonileri.



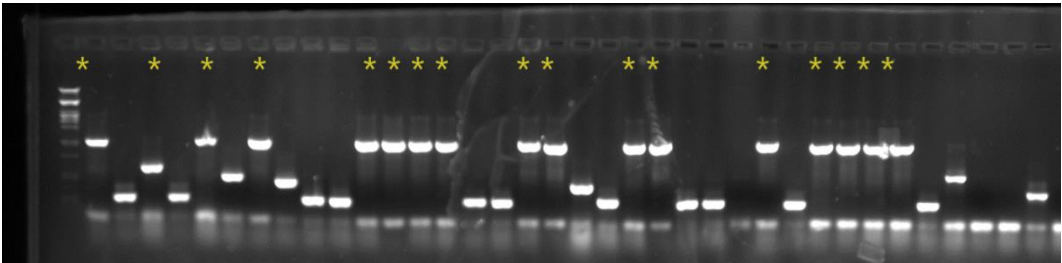
Resim 11. Alangüllü örneğinden elde edilen klonların kolonileri.



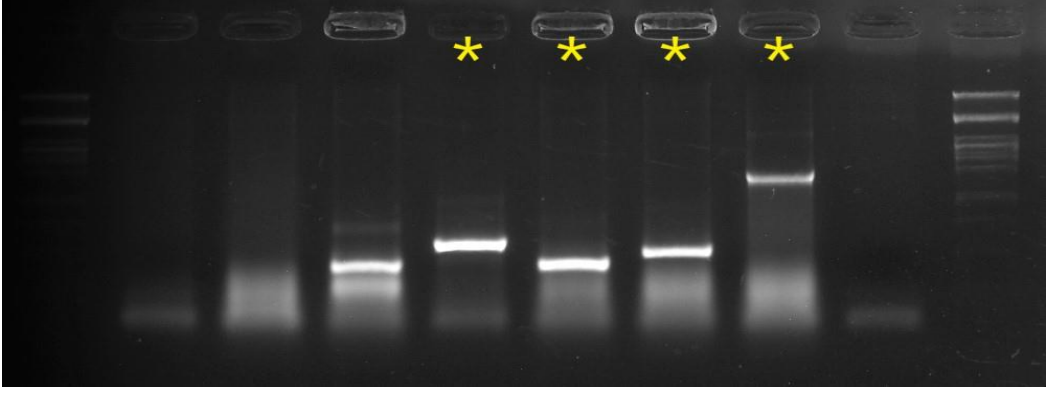
Resim 12. Alangüllü ve Ortakçı örneklerinin M13 PCR görüntüsü.



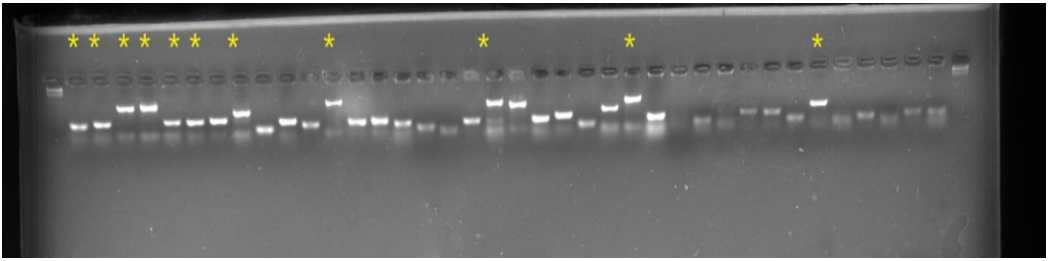
Resim 13. Hasköy İnaltı-1 örneğinin M13 PCR görüntüsü.



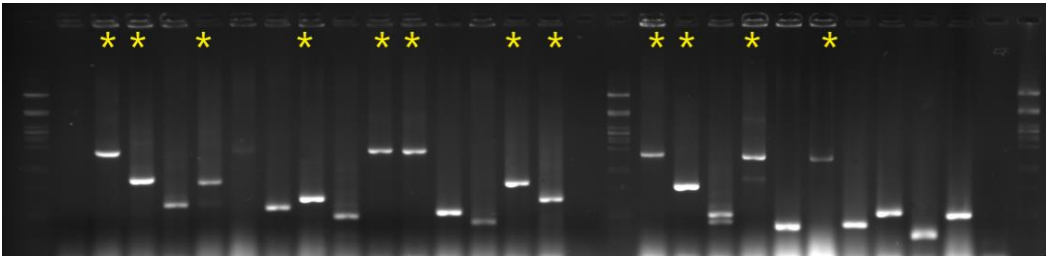
Resim 14. Hasköy İnaltı-2 örneğinin M13 PCR görüntüsü.



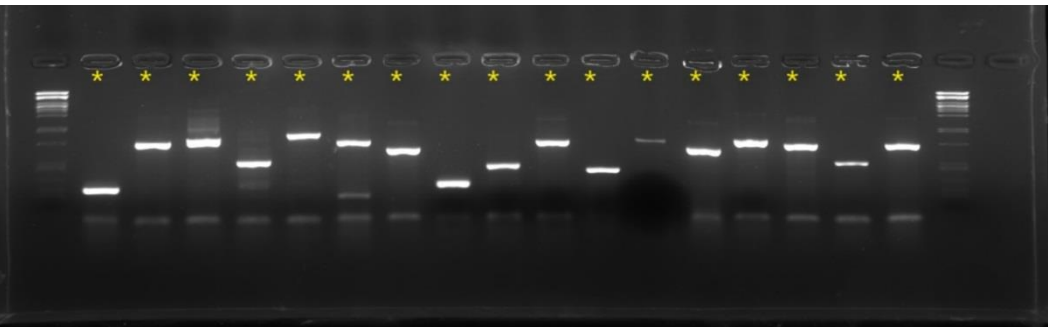
Resim 15. Kabağaç-1 örneğinin M13 PCR görüntüsü.



Resim 16. Kabağaç-2 örneğinin M13 PCR görüntüsü.



Resim 17. Kabağaç-3 örneğinin M13 PCR görüntüsü.



Resim 18. Umut Termal örneğinin M13 PCR görüntüsü.

4.6. Sekans Analizi ve Homolojilerin Belirlenmesi

M13 PCR ile çoğaltılan 16S rDNA genlerinin dizileri GenBank'ta bulunan BLAST programı kullanılarak veri tabanındaki diğer diziler ile karşılaştırılmıştır. En yüksek benzerlik oranları, karşılaştırılan bazlar ve mikrobiyal sınıflar aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 4. Alangüllü (55°C) sekans analiz sonuçları.

Klon	En Yüksek Benzerlik 1F/1000R	Benzerlik Oranı (%) / Karşılaştırılan Baz (bp)	Sınıf
AL1	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	99 977/986	Euryarchaeota
AL3	<i>Methanospirillum hungatei</i> strain HS18	99 369/370	Euryarchaeota
AL5	<i>Methanomethylovorans hollve ica</i> DSM 15978	96 827/862	Euryarchaeota
AL7	<i>Methanoculleus taiwanensis</i> strain CYW4	92 897/971	Euryarchaeota
AL11	<i>Methanotorris igneus</i> Kol 5	77 771/999	Euryarchaeota
AL12	<i>Methanotorris formicicus</i> Mc-S-70	78 718/921	Euryarchaeota
AL13	<i>Methanolinea tarda</i> strain NOBI-1	98 968/990	Euryarchaeota
AL14	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	98 972/991	Euryarchaeota
AL17	<i>Methanospirillum lacunae</i> strain Ki8-1	99 976/990	Euryarchaeota
AL18	<i>Methanoculleus marisnigri</i> strain JR1	92 902/985	Euryarchaeota
AL21	<i>Methanobacterium aarhusense</i> strain 5-4	77 780/1009	Euryarchaeota
AL22	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	99 981/989	Euryarchaeota

Tablo 5. Hasköy inaltı 1.istasyon (86°C) sekans analiz sonuçları.

0 Klon	En Yüksek Benzerlik		Benzerlik Oranı (%) / Karşılaştırılan Baz (bp)		Sınıf	
	25F/1492R	751F/1406R	25F/1492R	751F/1406R	25F/1492R	751F/1406R
Hİ1.2	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 8774	-	96 593/619	-	Euryarchaeota	-
Hİ1.4	-	<i>Spirulina</i> sp. ElfSPR27	-	99 612/617	-	Cyanobacteria
Hİ1.5	-	<i>Spirulina</i> sp. ElfSPR27	-	99 612/617	-	Cyanobacteria
Hİ1.6	-	<i>Spirulina</i> sp. ElfSPR27	-	99 612/617	-	Cyanobacteria
Hİ1.7	-	<i>Synechocystis</i> sp. LEGE 06079	-	93 572/613	-	Cyanobacteria
Hİ1.8	<i>Desulfurococcus mucosus</i> ND1	-	91 562/618	-	Crenarchaeota	-
Hİ1.9	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 8774	-	97 600/618	-	Euryarchaeota	-
Hİ1.10	<i>Sulfophobococcus zilligii</i> strain K1	-	90 554/616	-	Crenarchaeota	-
Hİ1.11	<i>Archaeoglobus lithotrophicus</i> strain TF2	-	95 587/621	-	Euryarchaeota	-

Tablo 6. Hasköy inaltı 2.istasyon (92°C) sekans analiz sonuçları.

Klon	En Yüksek Benzerlik	Benzerlik Oranı (%) / Karşılaştırılan Baz (bp)	Sınıf
	1F/1000R		
Hİ2.1	<i>Candidatus Caldiarchaeum subterraneum</i> clone PNG_TBR_A557	83 863/1044	Thaumarchaeota
Hİ2.2	<i>Thermofilum uzonense</i> strain 1807-2	87 619/711	Crenarchaeota
Hİ2.3	<i>Thermofilum adornatus</i> 1505	84 796/945	Crenarchaeota
Hİ2.4	<i>Pyrodictium abyssi</i> DSM 6158	84 766/914	Crenarchaeota
Hİ2.5	<i>Hyperthermus butylicus</i> DSM 5456	83 806/974	Crenarchaeota
Hİ2.6	<i>Conexivisphaera calidus</i> NAS-02	81 795/980	Candidatus Geothermarchaeot a
Hİ2.7	<i>Ignisphaera aggregans</i> strain DSM 17230	84 827/981	Crenarchaeota
Hİ2.8	<i>Conexivisphaera calidus</i> NAS-02	82 851/1035	Candidatus Geothermarchaeot a
Hİ2.9	<i>Methanothermus sociabilis</i> strain Kf1-F1	82 720/875	Euryarchaeota
Hİ2.10	<i>Aciduliprofundum</i> sp. EPR07-39	81 796/978	Euryarchaeota
Hİ2.11	<i>Pyrodictiaceae archaeon</i> 4021	83 857/1028	Crenarchaeota
Hİ2.12	<i>Pyrolobus fumarii</i> 1A	82 845/1027	Crenarchaeota
Hİ2.13	<i>Methanocaldococcus bathoardescens</i> strain JH146	83 838/1009	Euryarchaeota
Hİ2.14	<i>Aciduliprofundum</i> sp. EPR07-159	80 818/1018	Euryarchaeota
Hİ2.15	<i>Euryarchaeote</i>	98 97/99	Euryarchaeota
Hİ2.16	<i>Euryarchaeote</i>	98 97/98	Euryarchaeota
Hİ2.17	<i>Pantoea rwve ensis</i> strain ND04	73 410/561	Proteobacteria

Tablo 7. Kabağaç-1 (52°C) sekans analiz sonuçları.

Klon	En Yüksek Benzerlik	Benzerlik Oranı (%) / Karşılaştırılan Baz (bp)	Sınıf
	25F/1492R		
KA1.1	<i>Ignisphaera aggregans</i> strain DSM 17230	79 794/1000	Crenarchaeota
KA1.2	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i> strain Parker strain X	96 209/217	Proteobacteria
KA1.3	<i>Thiobacillus</i> sp. strain S5643	90 601/661	Proteobacteria
KA1.4	<i>Mycobacterium</i> sp. SY-3-12	87 216/247	Actinobacteria

Tablo 8. Kabağaç-2 (57°C) sekans analiz sonuçları.

Klon	En Yüksek Benzerlik	Benzerlik Oranı (%) / Karşılaştırılan Baz (bp)	Sınıf
	25F/1492R		
KA2.1	<i>Ignisphaera aggregans</i> strain DSM 17230	81 800/991	Crenarchaeota
KA2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain DSM 50071	60 650/1100	Proteobacteria
KA2.3	<i>Mycobacterium</i> sp. SY-3-12	78 207/265	Actinobacteria
KA2.4	<i>Methanotorris igneus</i> strain Kol 5	81 145/178	Euryarchaeota
KA2.5	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i> strain Parker strain X	86 285/330	Proteobacteria
KA2.6	<i>Acidilobus saccharovorans</i> strain 345-15	81 145/178	Crenarchaeota
KA2.7	<i>Ignisphaera</i> sp. Tok10A.S1	84 213/255	Crenarchaeota
KA2.8	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> strain JCM	78 729/929	Euryarchaeota
KA2.9	<i>Ignisphaera aggregans</i> strain DSM 17230	82 810/985	Crenarchaeota
KA2.10	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> DSM 2661	87 872/1000	Euryarchaeota

Tablo 9. Kabağaç-3 (57°C) sekans analiz sonuçları.

Klon	En Yüksek Benzerlik	Benzerlik Oranı (%) / Karşılaştırılan Baz (bp)	Sınıf
	25F/1492R		
KA3.1	<i>Nitrososphaera viennensis</i> strain EN76	79 395/500	Thaumarchaeota
KA3.2	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> strain JCM	82 739/900	Euryarchaeota
KA3.3	Unidentified bacterium clone Y	96 791/820	Unidentified
KA3.4	<i>Thermofilum carboxyditrophus</i> strain A35-arc	77 365/472	Crenarchaeota
KA3.5	<i>Ignisphaera</i> sp. Tok10A.S1	84 213/255	Crenarchaeota
KA3.6	<i>Thermofilum adornatus</i> 1505	78 376/483	Crenarchaeota
KA3.7	<i>Bacterium</i> YC-ZSS-LKJ62	93 236/254	Bacterium
KA3.8	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i> strain Parker	98 308/314	Proteobacteria
KA3.9	<i>Methanobacterium formicicum</i> strain DSM 1535	87 216/247	Euryarchaeota
KA3.10	<i>Mycobacterium</i> sp. SY-3-12	87 226/257	Actinobacteria
KA3.11	<i>Aureobacterium</i> sp. IPB1	97 892/918	Actinobacteria
KA3.12	<i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i> OPF8	79 258/328	Korarchaeota
KA3.13	<i>Thermofilum carboxyditrophus</i> strain A35-arc	78 376/483	Crenarchaeota
KA3.14	<i>Methanocaldococcus infernus</i> strain ME	76 281/371	Euryarchaeota
KA3.15	<i>Acidilobus saccharovorans</i> strain 345-15	92 598/650	Euryarchaeota

Tablo 10. Ortakçı (46°C) sekans analiz sonuçları.

Klon	En Yüksek Benzerlik	Benzerlik Oranı (%) / Karşılaştırılan Baz (bp)	Sınıf
	1F/1000R		
OR.1	<i>Peridinium umbonatum</i> strain UTEX LB 2255	98 963/979	Eukaryota
OR.2	<i>Chlamydomonas gloeophila</i> strain UTEX_608	95 1028/1078	Eukaryota
OR.3	<i>Oceanibaculum indicum</i> strain USBA_36	95 631/663	Proteobacteria
OR.4	<i>Oceanibaculum indicum</i> strain USBA_36	95 628/663	Proteobacteria
OR.5	<i>Glenodinium</i> sp. LaTo3	97 1034/1065	Eukaryota
OR.6	<i>Scrippsiella</i> sp. SCKS 0701	94 915/978	Eukaryota
OR.7	<i>Selaginella moellendorffii</i>	92 46/50	Eukaryota
OR.8	<i>Baldinia anauniensis greenGS</i> clone 1	98 995/1016	Eukaryota
OR.9	<i>Alishewanella jeotgali</i> KCTC 22429 strain MS1	99 352/353	Proteobacteria
OR.26	<i>Methanosarcina vacuolata</i> strain Z-761	98 970/993	Euryarchaeota
OR.28	<i>Methanocella arvoryzae</i> strain MRE50	97 964/998	Euryarchaeota
OR.29	<i>Methanosarcina subterranea</i> strain HC-2	99 982/992	Euryarchaeota
OR.30	<i>Methanosarcina lacustris</i> Z-7289	97 967/998	Euryarchaeota
OR.31	<i>Methanocella arvoryzae</i> strain MRE50	97 966/1001	Euryarchaeota
OR.33	<i>Bradyrhizobium</i> sp. PAC24	99 103/104	Proteobacteria

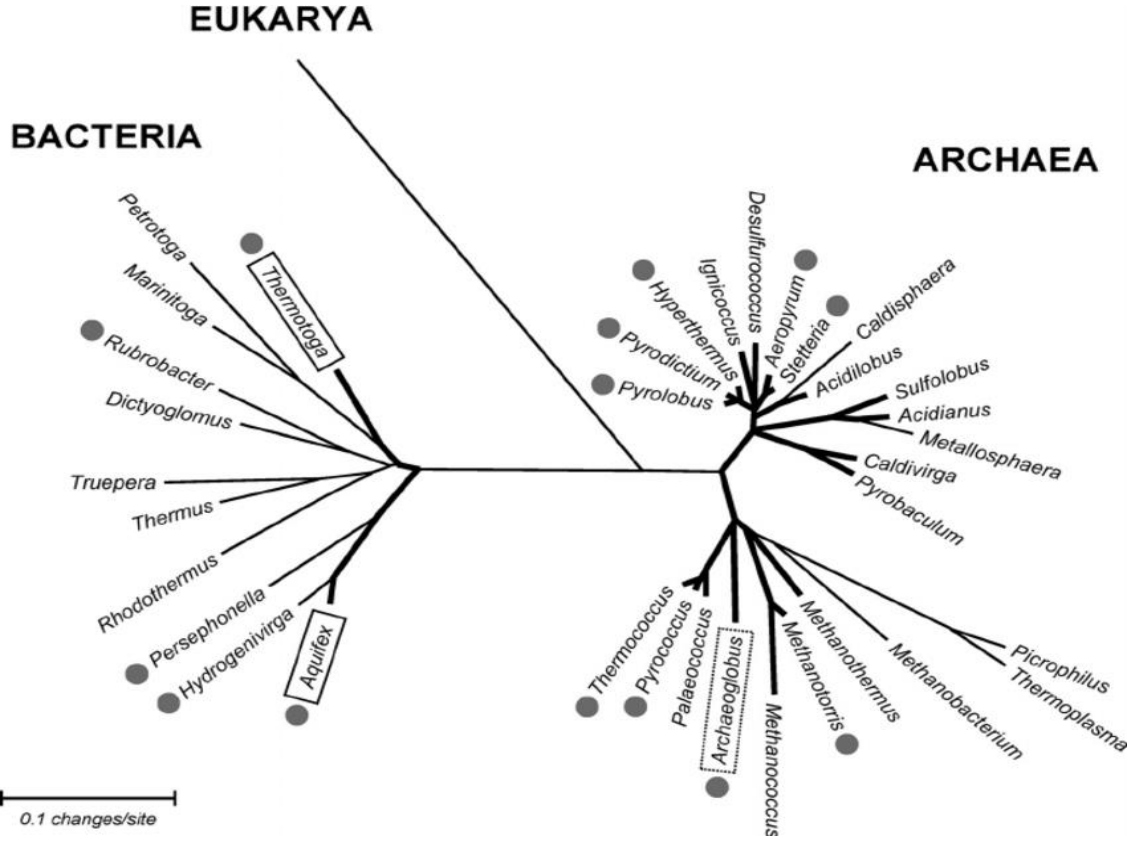
Tablo 11. Seferihisar (50°C) sekans analiz sonuçları.

Klon	En Yüksek Benzerlik	Benzerlik Oranı (%) / Karşılaştırılan Baz (bp)	Sınıf
	751F/1406R		
S.1	<i>Thermus</i> sp. strain CFH 72773T	98 608/618	Deinococcus-Thermus
S.2	<i>Aquificaceae</i> bacterium	96 522/542	Aquificales
S.3	<i>Thermus</i> sp. strain CFH 72773T	98 677/689	Deinococcus-Thermus
S.4	<i>Thermus</i> sp. strain CFH 72773T	98 677/689	Deinococcus-Thermus

Tablo 12. Umut termal (62°C) sekans analiz sonuçları.

Klon	En Yüksek Benzerlik		Benzerlik Oranı (%) / Karşılaştırılan Baz (bp)		Sınıf	
	1F/1000R	751F/1406R	1F/1000R	751F/1406R	1F/1000R	751F/1406R
UT.1	<i>Phaeobacter inhibens</i> strain P88	<i>Thermus scotoductus</i> strain ITI-252T	77 263/340	99 603/608	Proteobacteria	Deinococcus- Thermus
UT.2	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> B10	<i>Thermus</i> sp. strain InS-183	87 877/1006	98 595/608	Euryarchaeota	Deinococcus- Thermus
UT.3	<i>Enrichment culture E31B1</i>	<i>Thermus</i> sp. SR60-1	76 306/405	98 592/607	Euryarchaeota	Deinococcus- Thermus
UT.4	<i>Methanococcus aeolicus</i> strain H-A4	<i>Thermus scotoductus</i> clone 1-43	76 699/922	99 599/605	Euryarchaeota	Deinococcus- Thermus
UT.5	<i>Aciduliprofundum</i> sp. MAR08-641	<i>Thermus</i> sp. TibetanG7	81 824/1018	84 415/494	Euryarchaeota	Deinococcus- Thermus
UT.6	<i>Desulfurococcus mucosus</i>	<i>Thermus</i> sp. B70-05	91 562/618	98 592/606	Crenarchaeota	Deinococcus- Thermus
UT.7	<i>Methanofervidicoccus</i> sp. A16	<i>Thermus</i> sp. KI7 from USA	77 720/932	98 599/614	Euryarchaeota	Deinococcus- Thermus
UT.8	<i>Anaerobic methanogenic archaeon</i> ET1-8		91 666/735		Archaea	
UT.9	<i>Oceanibaculum indicum</i> strain USBA_36	<i>Thermus scotoductus</i> strain SR60-2	95 631/663	98 641/655	Proteobacteria	Deinococcus- Thermus
UT.10	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> strain JCM	<i>Thermus</i> sp. TibetanG7	77 615/798	98 457/465	Euryarchaeota	Deinococcus- Thermus
UT.11	<i>Halococcus</i> sp. Strain ZJ1	<i>Thermus</i> sp. PSS8 from USA	82 80/98	99 600/608	Euryarchaeota	Deinococcus- Thermus
UT.12	<i>Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis</i> isolate MGYG-HGUT-02160	<i>Thermus scotoductus</i> strain Se-1	82 762/926	98 457/466	Euryarchaeota	Deinococcus- Thermus
UT.13	<i>Anaerobic methanogenic archaeon</i> ET1-8	<i>Thermus scotoductus</i> strain ITI-252T	90 661/734	99 500/508	Archaea.	Deinococcus- Thermus

5. TARTIŞMA



Şekil 12. Termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalar filogenetik ağaç (Stetter, 2006).

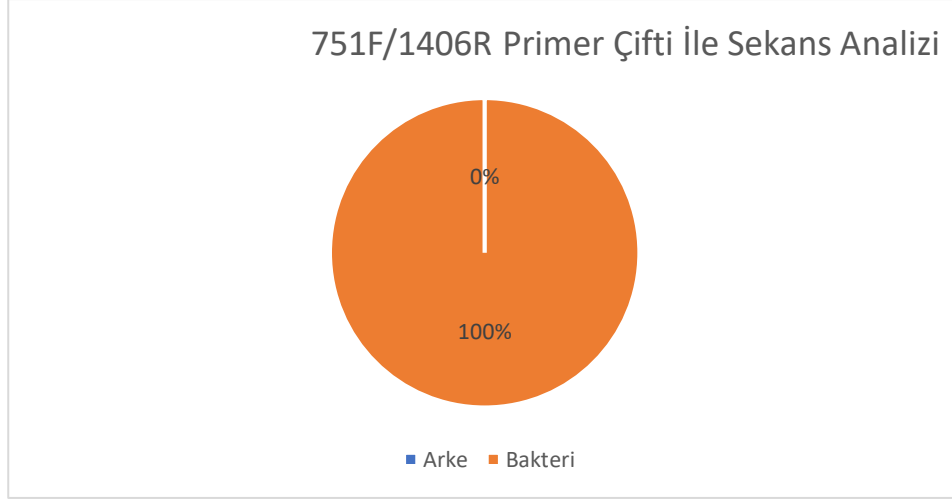
Carl Woese'un öncü çalışmaları sayesinde ssurRNA genleri kullanılarak moleküler filogenetik analizler yapılmaktadır. Bugün sekans karşılaştırmaları sonucunda hipertermofiller ve termofillerin filogenetik ağacını oluşturmak mümkün hale gelmiştir (Şekil 12). Bu filogenide bakterilerin farklılaşmasını, en derin ve en erken dallanma noktası olan arke ve ökaryotların paylaştığı dal temsil etmektedir. Kalın dalların temsil ettiği hipertermofiller en derin kök olarak filogenide yer almaktadır (Stetter, 2006b). Arke ve bakterilerin bu filogenideki yerlerinin belirlenmesinde 16S *rRNA* geni baz alınmıştır.

16S *rRNA* geni tüm bakteri ve arkelerde ortak olarak bulunan fonksiyonel şekilde korunmuş bölgeler içerse de 16S *rRNA*'daki değişim oranının tüm mikroorganizmalar için tanımlayıcı olmaması bu yöntemin dezavantajlarından biridir. Farklı taksonomik gruplar, farklı değişim oranlarına sahip olabilirler. Bir diğer dezavantaj genom başına düşen kopya sayılarının farklı olmasıdır. Kopya sayıları taksona özel gibi görünmesine rağmen aynı türün

suşları arasında da varyasyon kaydedilmiştir. Bazı taksonlarda 16S rRNA kopya sayısı ile elverişli yaşam koşullarına adaptasyon arasında bir bağlantı ileri sürülmektedir. Düşük kopya sayısına sahip taksonların daha oligotrofik olduğu bildirilmiştir.

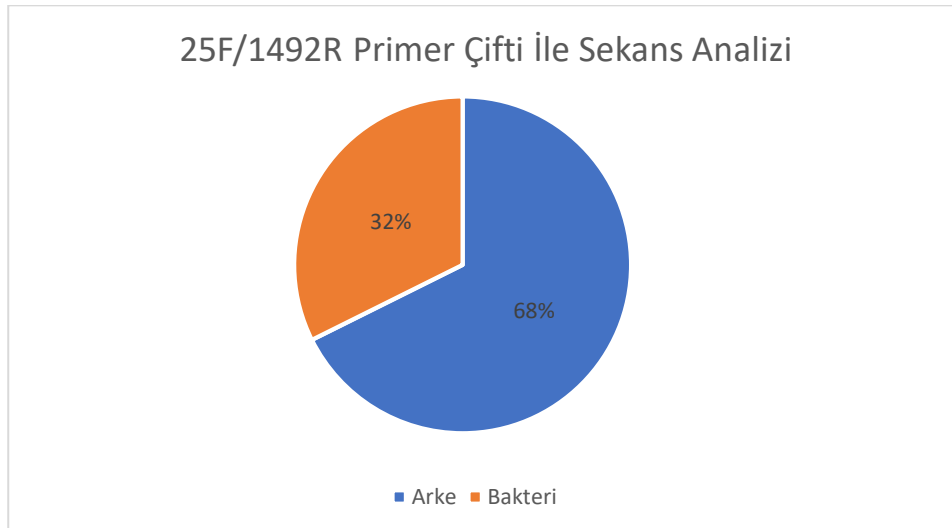
Bir organizma türünde 16S *rRNA* gen kopya sayısının aynı olduğu düşünülmesine rağmen aynı türde hatta aynı türün farklı genom dizilerinde bile 16S rRNA sekansları farklılık gösterebilir. 16S rRNA varyantlarının, bakteriyal türlerin sayısından 2,5 kat fazla olduğu hesaplanmıştır ve bazı bakteriyal taksonlarda oldukça farklı 16S dizileri gözlenmektedir. Sekansları arasında %1 den yüksek farklılık içeren bakteri türleri oldukça yaygındır. Hatta bazı termofilik bakterilerde bu oranın daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu duruma yatay gen transferinin etkili olduğu ileri sürülmektedir (Větrovský ve Baldrian, 2013).

Çalışmamızda bir tanesi kesim bölgesi olmak üzere 3 farklı çift primer seçilmiştir ve 2 farklı klonlama yöntemi kullanılmıştır. Primerlerden 751F/1406R kodlu primerin tüm örneklerde 16S PCR işleminde etkili olduğu ancak klonlama sonrası yapılan sekans işleminde bütün klonların bakterilerle benzerlik verdiği ortaya çıkmıştır. Yaklaşık 655 bp uzunluğundaki gen bölgesini çoğaltan bu primerin dizisi 16S *rRNA* geninin değişken bölgelerinden V3-V4'tedir. Bu primeri Baker ve arkadaşları 2003'te ilk kez dizayn etmişlerdir ve özellikle Crenarchaeota ve Euryarchaeota filumlarındaki arkelerin tespiti için kullanılabileceğini iddia etmişlerdir (Baker ve ark,2003). Ancak daha sonra Bahram ve arkadaşlarının 2019'da gerçekleştirdiği çalışmada bu primer çiftinin beklenmeyen oranda bakteri tespit ettiği ortaya konmuştur (Bahram ve ark, 2019). Nitekim, çalışmamızda da bu primer çiftini kullandığımızda ağırlıklı olarak *Thermus* türleri ve siyanobakteri sekansları tespit edilmiştir. Bu primer çifti ile yapılan 16S rRNA sekans analizi sonucu Şekil 13'te yüzdellik olarak verilmiştir.



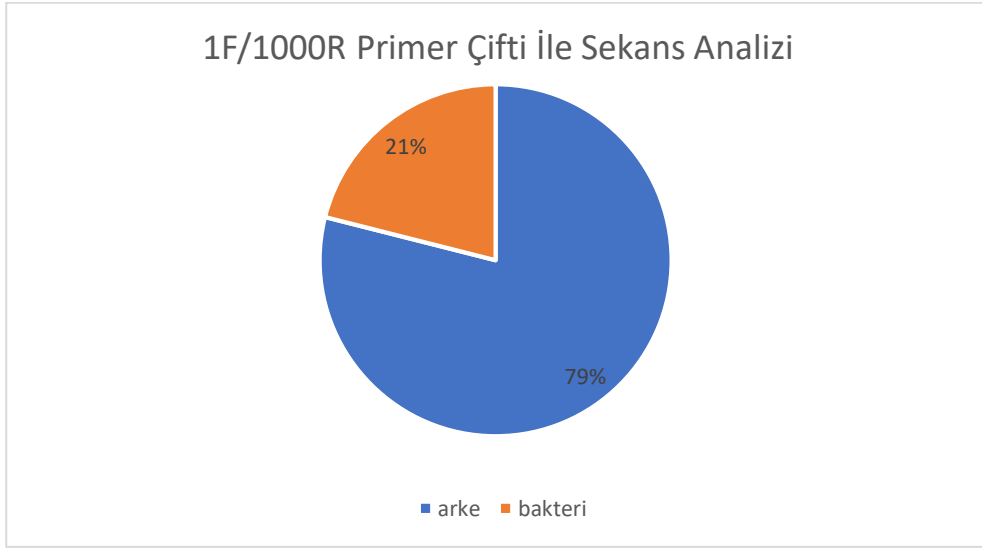
Şekil 13. 751F/1406R primer çifti ile saptanan domainlerin oranı.

Çalışmamızda kullanılan bir diğer primer 25F/1492R kodlu “evrensel” primer çiftidir ve araştırmacılar bu primer çiftini halofilik arke ve bakterilerin tespitinde kullanmışlardır (Burns ve ark, 2004). Shimizu ve ekibi 2011’de Japonya’daki sıcak su kaynaklarında bu primer çifti ile bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. “Euryarchaeote” filumuna ait, çoğu anaerobik metanojen arke olan birçok tür belirlenmiştir. Bunun yanı sıra *Acetobacterium* benzeri bakteri türleri de tanımlanmıştır. Çalışmamızda ise bu primer çifti kullanılarak hem bakteri hem de arke tespiti yapılmıştır. Proteobacteria, Euryarchaeota, Crenarchaeota filumlarına ait üyeler başta olmak üzere geniş bir çeşitlilik elde edilmiştir. Bu primer ile yapılan çalışma sonucunda elde edilen klon dağılımı Şekil 14’te verilmiştir.



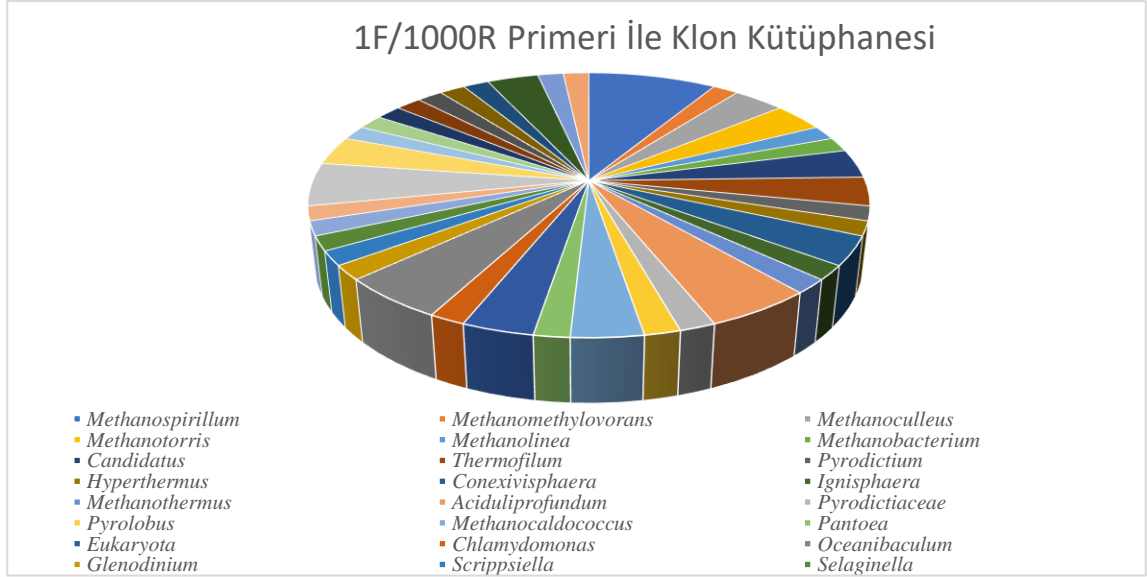
Şekil 14. 25F/1492R primer çifti ile saptanan domainlerin oranı.

Kullandığımız diğer primer çifti ise 1F/1000R kodlu primer çiftidir. İlk kez Bahram ve arkadaşları tarafından 2019’da dizayn edilen primerin arkelere yüksek spesifite gösterdiği belirlenmiştir. Bu primerler, 16S *rRNA* geninde en değişken olarak kabul edilen ve spesifitesi artırılarak yeniden düzenlenen V1 ve V2 bölgelerini kapsar. Bunun yanı sıra yüksek filum zenginliği için yeniden düzenlenmişlerdir. Bu bulgulara paralel olarak çalışmamızda yüksek verimlilikte bir arke çeşitliliği sağlanmıştır (Bahram ve ark, 2019). 1F/1000R primeri ile yapılan sekans analizi sonucu Şekil 15’te verilmiştir.

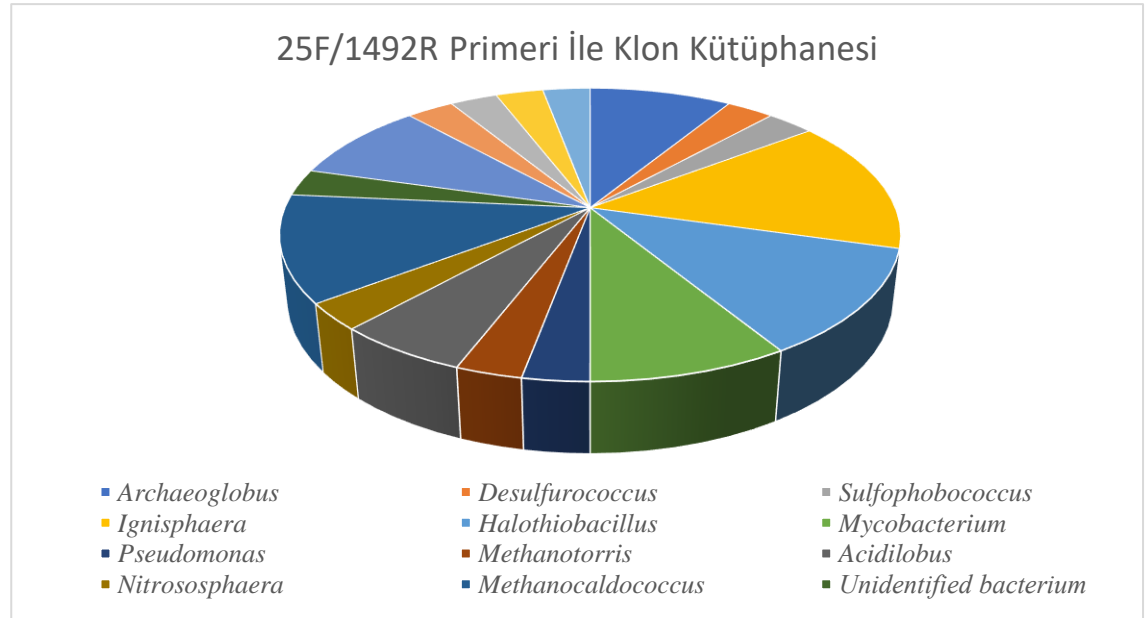


Şekil 15. 1F/1000R primer çifti ile saptanan domainlerin oranı.

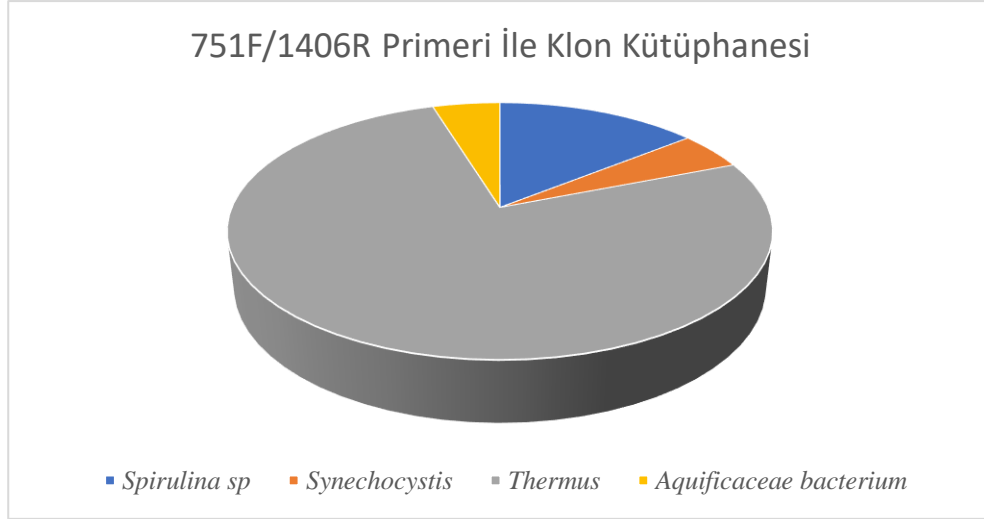
Bunun yanısıra çalışmamızda kullandığımız primerler arke spesifik 16S *rRNA* gen bölgesini çoğaltmış olmasına rağmen örneklerimizde bakteri türlerine de rastlanmıştır. Bunun sebebi kullandığımız primerlerin 16S *rRNA* evrensel gen bölgesindeki ortak bölgeleri çoğaltması ve sadece “Arke domainindeki tüm üyelerin (metanojenik, hipertermofilik, halofilik-alkalifilik gruplar)” dizilerini çoğaltacak ortak bir primer bulunmamasından dolayı olabilir. Çalışmamızda yapılan sekans analizi sonucu yüksek oranda bakteri benzerliği veren klonların %46’sı 751F/1406R primer çifti ile elde edilmiştir. Diğer çalışmalara bakıldığında bu primerin %95 oranında bakteri çoğalttığı ortaya çıkmıştır (Bahram ve ark, 2019). Kullandığımız diğer iki primer çiftinde totalde %26 oranında bakteriye rastlanırken yaklaşık %79 oranında arke tespit edilmiştir. Yapılan sekans analizleri sonucu primerlere göre klon yüzde dağılımları aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



Şekil 16. 1F/1000R toplam klonlar yüzdelerik dağılımı.



Şekil 17. 25F/1492R toplam klonlar yüzdelerik dağılımı.



Şekil 18. 751F/1406R toplam klonlar yüzdeleri dağılımı.

Bir diğer çalışmada ise; Gantner ve ekibi 2011’de Kuzey Kutbu Amundsen Körfezi’nden ve Batı Kutup Bölgesinden sıcaklıkları yaklaşık 55-71 °C arasında değişen çevresel örnekler toplamışlardır. Çalışmada 340F/1000R ve 344F/915R primer çiftleri kullanılmış ve mevcut sekansların %93 ve %97’sini kapsayan yüksek arkeal spesifite göstermişlerdir. Her bir primer seti için 30 klon seçilmiş ve sekanslanmıştır. 1000R revers primeri tüm arkeal 16S *rRNA* geninin %91’i ile uyumaktadır ve Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota gibi büyük bir çeşitlilik yelpazesi sergilemiştir. 340F/1000R primer çiftinin archaea sekanslarının %83’ünü (340F) ve %88’ini (1000R) eşleştirildiğinde üstün bir özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Gantner ve ark, 2011). Bu sonuçlar bizim çalışmamızdakiler ile benzerdir ve arke çeşitliğinin tespiti açısından kullandığımız en verimli primer çifti 1F/1000R’dir.

Kültürden bağımsız yöntemlerle yapılan mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarının özellikle ekstrem çevreler için oldukça yaygın olduğu görülmektedir. Ivanova ve arkadaşları 2011’de, Bulgaristanın Varvara bölgesindeki sıcak sulara arkeal çeşitlilik çalışması gerçekleştirmişlerdir. Örnek sıcaklıkları 65–92 °C aralığında olmak üzere toplam 5 farklı kaplıcadan örnek alınmıştır. Çalışmada 21F/958R primer çifti kullanılmıştır. Totalde 145 klon elde edilmiştir ve beş Archaea filumundan üçüne ait toplam 35 arkeal operasyonel taksonomik birim (OTU) tanımlanmıştır. OTU moleküler çeşitlilik çalışmalarında kullanılan bir terimdir ve kültürü yapılmamış belirli bir türün başka türlerle DNA dizisi benzerliği baz alınarak yapılan organizma kümelerini ifade eder (Blaxter ve ark, 2005). Sonuç olarak oluşturulan arkeal kütüphaneler: 1) yüksek oranda, kültürü yapılmamış arkeal filogrupları

temsil eden OTU içermektedir, 2) yeni filotip dizileri boldur 3) kültürü yapılmış organizmalarla ilişkisi olmayan Crenarchaeotarcheota filotiplerinden yüksek oranlarda bulunmaktadır 4) Korarcheota filumu ile sadece uzaktan akraba olan bir sekansın varlığı saptanmıştır. Çalışmamızda ise bu araştırmaya benzer olarak henüz kültürü yapılmamış ancak veri tabanında yer alan türler belirlenmiştir.

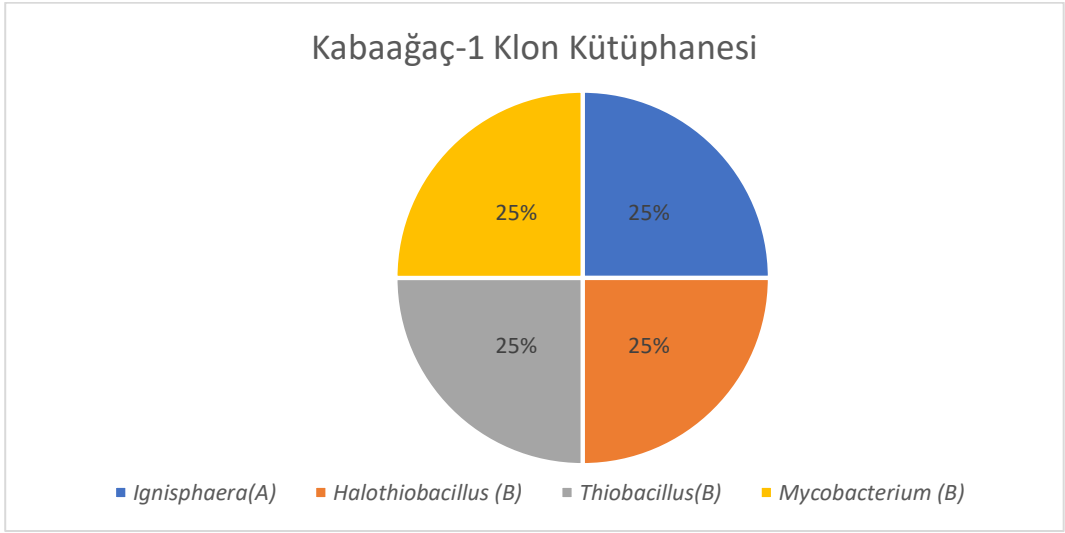
2017'de Ghilamicael ve arkadaşları Eritre'deki çeşitli sediman ve mikrobiyal mat örneklerinde prokaryotik çeşitlilik analizi gerçekleştirmişlerdir. Örneklerin sıcaklıkları 49,5 ° C ile 100 ° C arasında değişirken, pH seviyeleri 6.97 ila 7,54 arasında değişmektedir. 16S *rRNA* geninde V4-V7 değişken bölgelerini içeren 515F/806R primer çiftleri kullanılmıştır. Beş lokasyonda mikrobiyal topluluk yapısında ve OTU düzeyinde örnek tiplerinde anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Kaynakların sıcaklıklarına bağlı olarak, değişen oranlarda Aquificae, Deinococcus-Thermus, bazı Siyanobakteriler ve Crenarchaeota grupları belirlenmiştir. Ayrıca bazı istasyonların tuzluluk oranına bağlı olarak Halobacterium cinsine ait klonlara da rastlanmıştır. Çalışmamızda yapılan sekans analizi sonucunda 50 ° C'lik örneğimizde Aquificae ve Deinococcus-Thermus bakterileri tespit edilmiştir. Bunun yanısıra 52 ° C ile 92 ° C sıcaklığa sahip örneklerimizde çok sayıda Crenarchaeota filumuna ait türler belirlenmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada, Kamchatka kaplıcalarında mikrobiyal çeşitlilik analizi araştırılmıştır. 16S *rRNA* geninin V3-V4 bölgesini çoğaltan 319F/806R primer çifti kullanılmıştır. Sekans analizi sonucu *Sulfurihydrogenibium* cinsinden bakteriler (filum Aquificae), *Caldimicrobium* türleri (phylum Thermodesulfobacteria), *Vulcanisaeta* cinsi arkeler, yüksek sıcaklıkta pek çok Nanoarchaeota ve henüz kültürü yapılmamış Thermoplasmataceae familyasının üyeleri tespit edilmiştir (Merkel ve ark, 2017). Bu çalışmaya benzer olarak yaptığımız sekans analizleri sonucunda Nanoarchaeota ile ilişkili türlerin yanı sıra özellikle 92 ° C'lik örneğimizde *Vulcanisaeta* cinsi hipertermofilik arkeler yüksek benzerlik oranına sahip olarak belirlenmiştir.

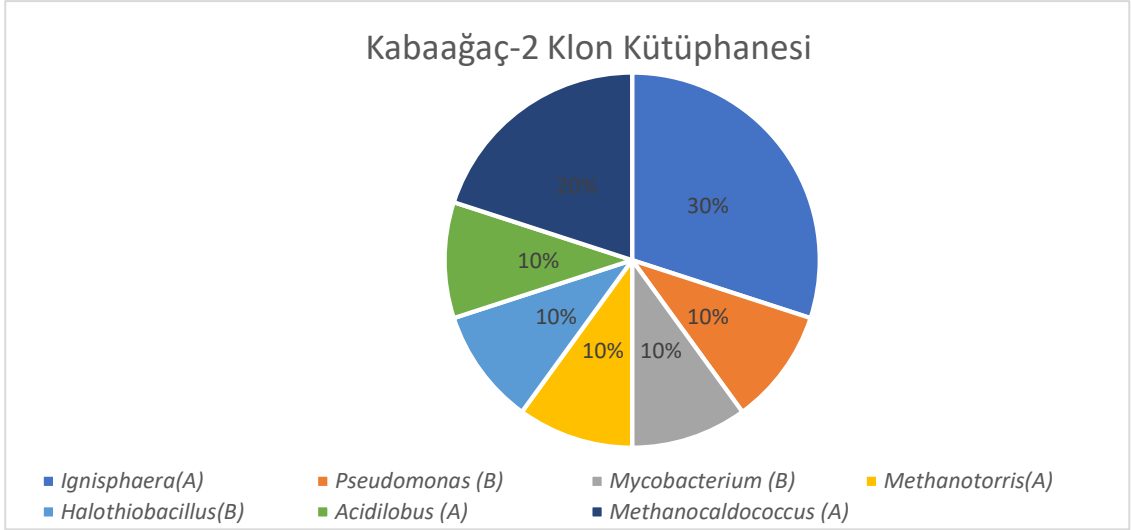
2017'de Pektaş ve Temel'in gerçekleştirdiği çalışmada Denizli'de bir sülfidik mağara olan Kaklık mağarasından alınan örneklerde mikrobiyal çeşitlilik araştırılmıştır. Bu mağara bir traverten formunda, karbonat ve sülfür yönünden zengin olan bir termal kaynaktır. 340F/915R primer çifti kullanılarak 16S *rRNA* geni için pyrosequencing tekniği kullanılmıştır. Toplamda 3 arkeal filum ve 25 bakteriyal filum tespit edilmiş ve arke sekansları içerisinde *Thermoplasmata* tüm örnekleme alanlarında en bol bulunan grup olarak belirtilmiştir (Gulecal-Pektaş ve Temel ,2017). Çalışmamızdan farklı olarak burada pyrosequencing metodu kullanılmıştır. Bu yöntem sentez yoluyla dizileme prensibine

dayanmaktadır (Üstek ve ark, 2011). Çalışmada çok sayıda bulunan *Thermoplasma* daha önce de sülfür yönünden zengin bu mağarada yapılan araştırmalarda yaygın olarak gözlenmiştir. Çalışmamızda yapılan 16S rRNA sekans analizi sonucu elde edilen türler *Thermoplasma* gibi yüksek oranda hipertermofilik ve termofilik arke türleri ile yüksek oranda benzerlik göstermiştir.

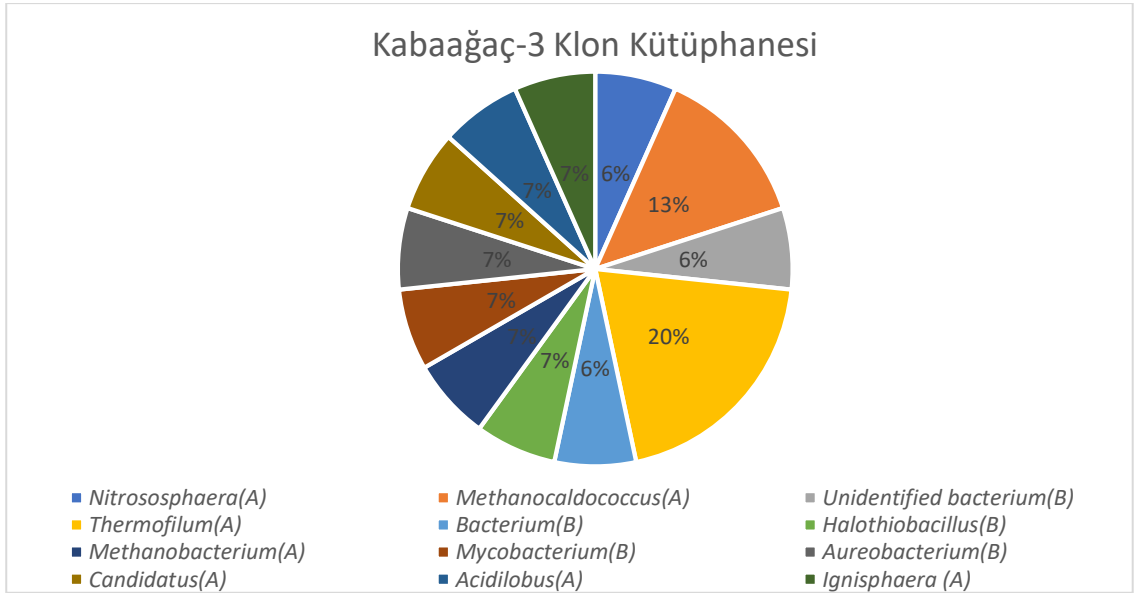
Ayrıca bazı örneklerimizde insan ve hayvanlarda patojeniteye sebep olan bakteri türlerine (*Pseudomonas aeruginosa* ve *Mycobacterium sp.*) rastlanmıştır. Bu türler 57 C sıcaklığa sahip Kabağaç örneğinde %60'lık bir benzerlik oranıyla tespit edilmiştir ve bu bakteri türlerinin yüksek sıcaklıkta hayatta kalamayacağı göz önünde bulundurulduğunda bu türlerin örnek alınan bölgenin çevresindeki hayvanlardan bulaşmış olabileceği veya çevresel bir kontaminasyon olabileceği düşünülmektedir. Bu örnek ile elde edilen tüm türler klon kütüphanesi halinde şekil 19-20-21'de verilmiştir.



Şekil 19. Kabağaç-1 klon yüzde dağılımları.



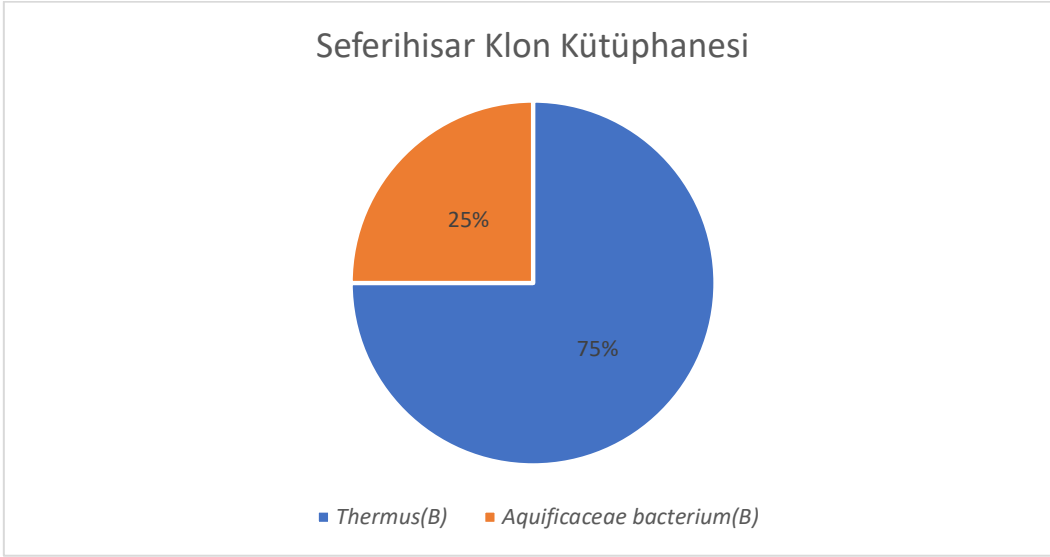
Şekil 20. Kabağaç-2 klon yüzde dağılımları.



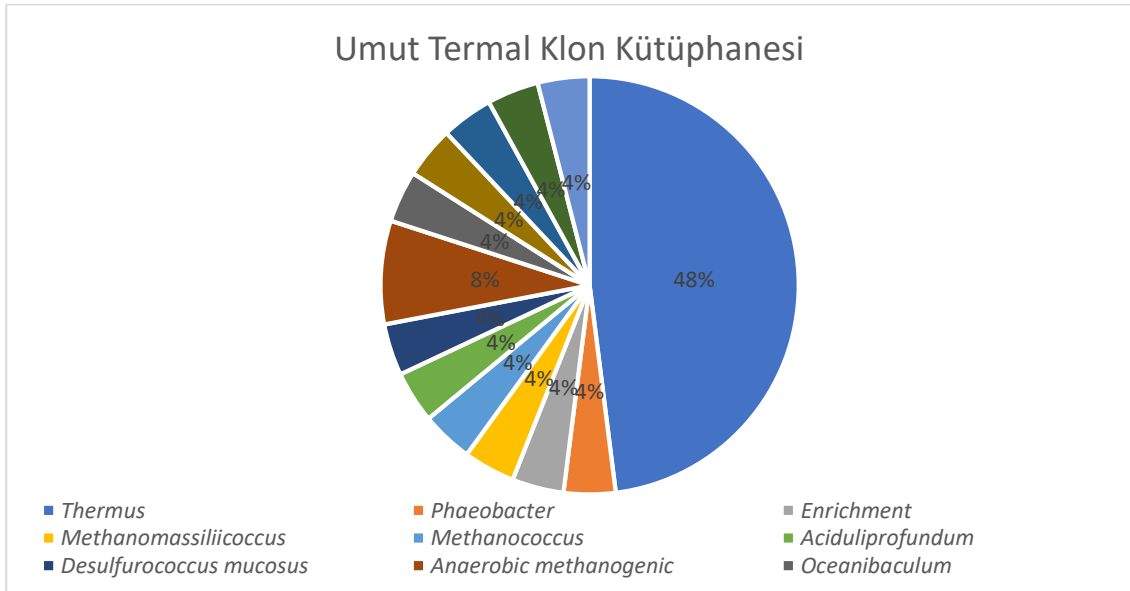
Şekil 21. Kabağaç-3 klon yüzde dağılımları.

Elde ettiğimiz bulgulara göre çalışmamızda en fazla rastlanan bakteriyel türler *Thermus* cinsine ait türlerdir. Bu tür ilk kez 1969'da Brock ve Freeze tarafından tanımlanmıştır (Brock ve Freeze,1969). Genellikle termal alanlarda yaşayan bu bakterinin optimum gelişme sıcaklığı 60 °C'dir. Bu tür Denizli, Sarayköy'de bir termal otel olan 62 °C'lik sıcaklığa sahip Umut Termal örneğinde ve yine termal kaplıcadan alınan 50 °C' lik sıcaklığa sahip Seferihisar örneğinde %96 oranında benzerlik vermiştir. Elde edilen bulgular

Tablo 11-12’de ve örneklerin sekans analizi sonucu oluşturulan klon kütüphanesi Şekil 22-23’te verilmiştir.



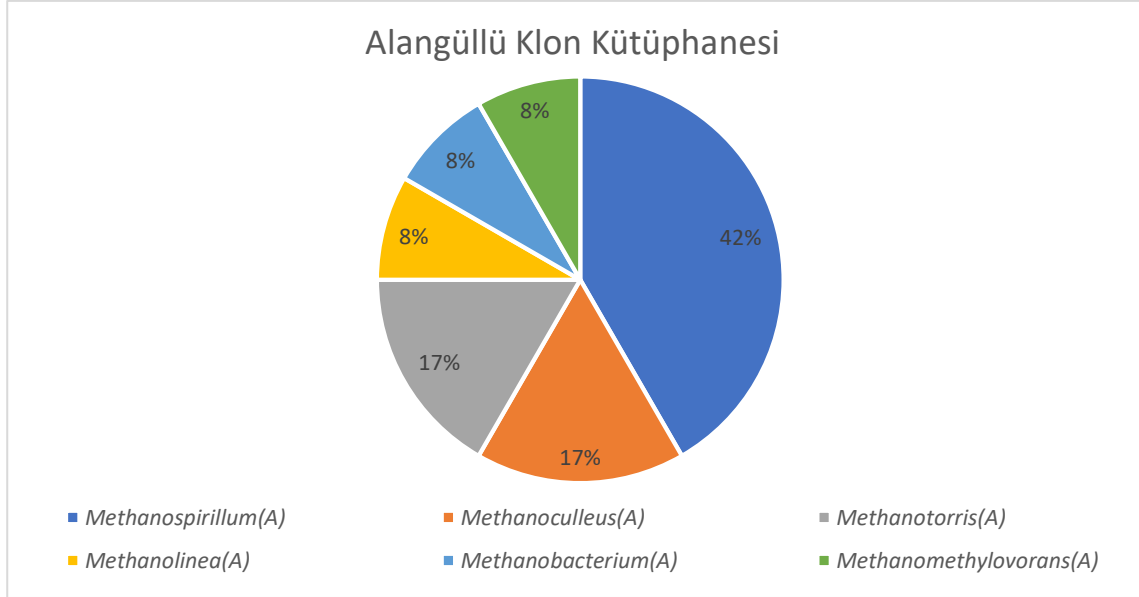
Şekil 22. Seferihisar klon yüzde dağılımları.



Şekil 23. Umut termal klon yüzde dağılımları.

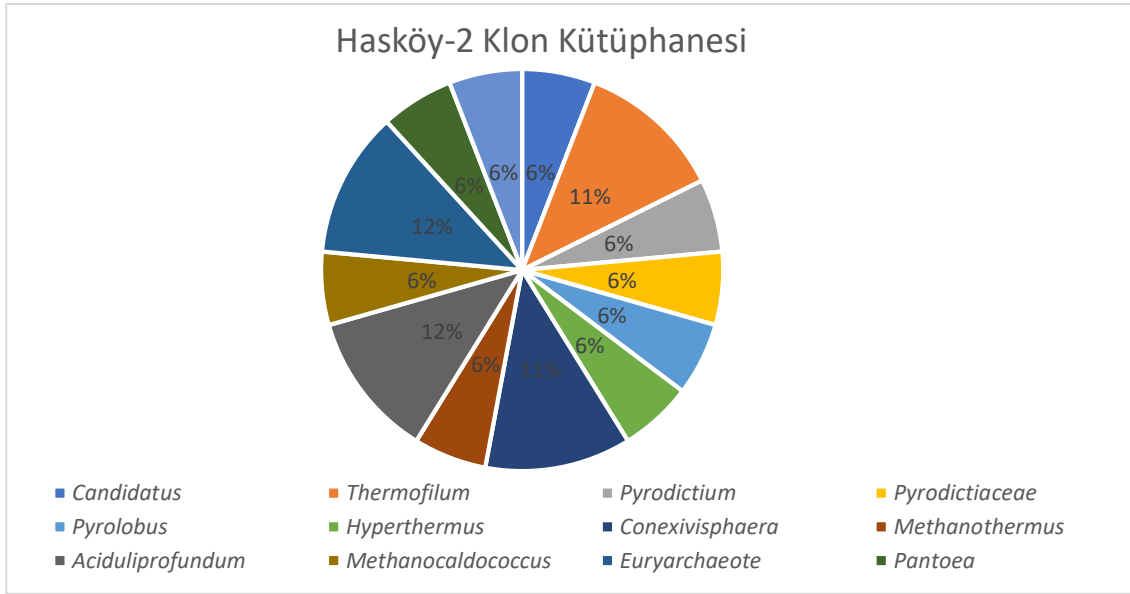
Elde ettiğimiz pek çok farklı arke türünün yanısıra “*Methanospirillum*” türü çalışmamız kapsamındaki bir diğer fazla sayıda rastladığımız mikroorganizmadır. Bu tür metanojenik arke türlerindedir ve optimum 30 °C sıcaklıkta üreyebilmektedir ve maksimum 55 °C ‘de bulunabilmektedir. Bu arke türü çalışmamızda kuyu suyundan

örneklenen 55°C'lik Alangüllü örneğindeki klonlarımız ile %99 oranında benzerlik göstermiştir. Elde edilen bulgular Tablo 4'te ve örnek için oluşturulan klon kütüphanesi Şekil 24'te verilmiştir.



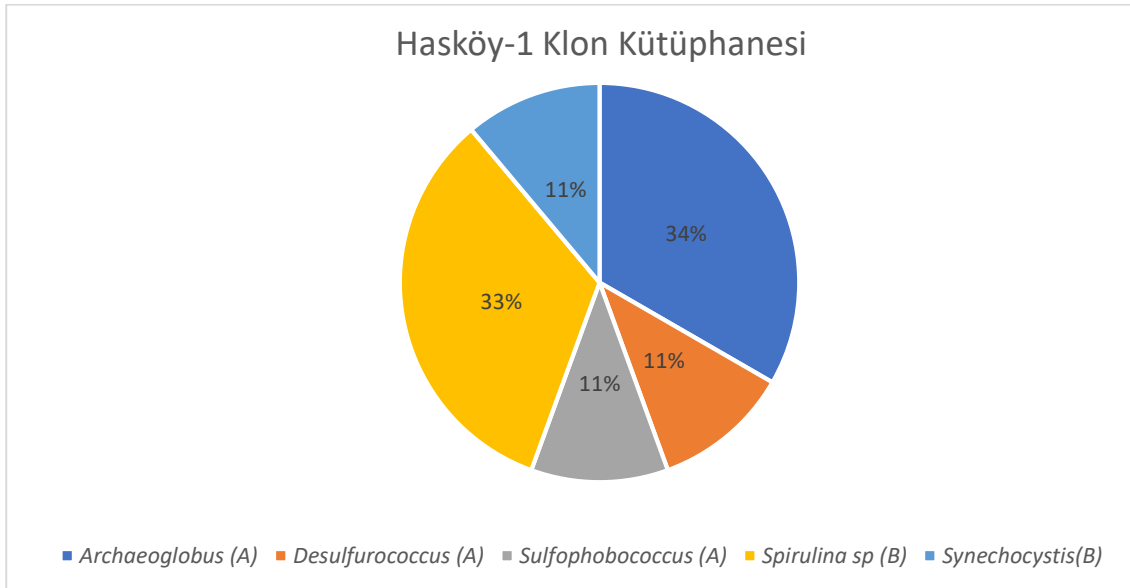
Şekil 24. Alangüllü klon yüzde dağılımları.

Çalışmamızda tespit edilen bir diğer tür *Ignisphaera aggregans*, örneklerimiz arasından 4 tanesinde yaklaşık %79 ile %84 oranında benzerlik göstermiştir. Crenarchaeota filumuna ait olan bir hipertermofilik arke türü olan *I. aggregans* ilk kez Yeni Zelve a'da Kuirau Park'da bir solfataradan izole edilmiştir. Daha sonra ABD Yellowstone Park'ta bir sıcak su kaynağından izole edilmiştir. Gelişme sıcaklığı 85°C ile 98°C arasındadır (Niederberger ve ark,2006). Çalışmamızda bu türe 92°C'lik sıcaklığa sahip örneğimizde %84 benzerlik oranı ile rastlanmıştır. Yanı sıra 52-57 °C sıcaklık aralığındaki üç örneğimizle %70 oranında benzerlik bulunmuştur. Yaptığımız sekans analizleri sonucunda bazı türlerin gelişme sıcaklıkları ile tespit ettiğimiz örnek sıcaklıkları farklılık göstermektedir. Ancak elde edilen türlerin benzerlik oranları %95'ten düşük olduğu için bu türlerin kesin olarak bulunan türler olduğu söylenemez. Bu örneklerden elde edilen klonların BLAST analizi sonucu en yüksek benzerlik veren türler seçilmiştir. 92°C'lik sıcaklığa sahip örneğimizin klon yüzde dağılım grafiği Şekil 25'te verilmiştir.



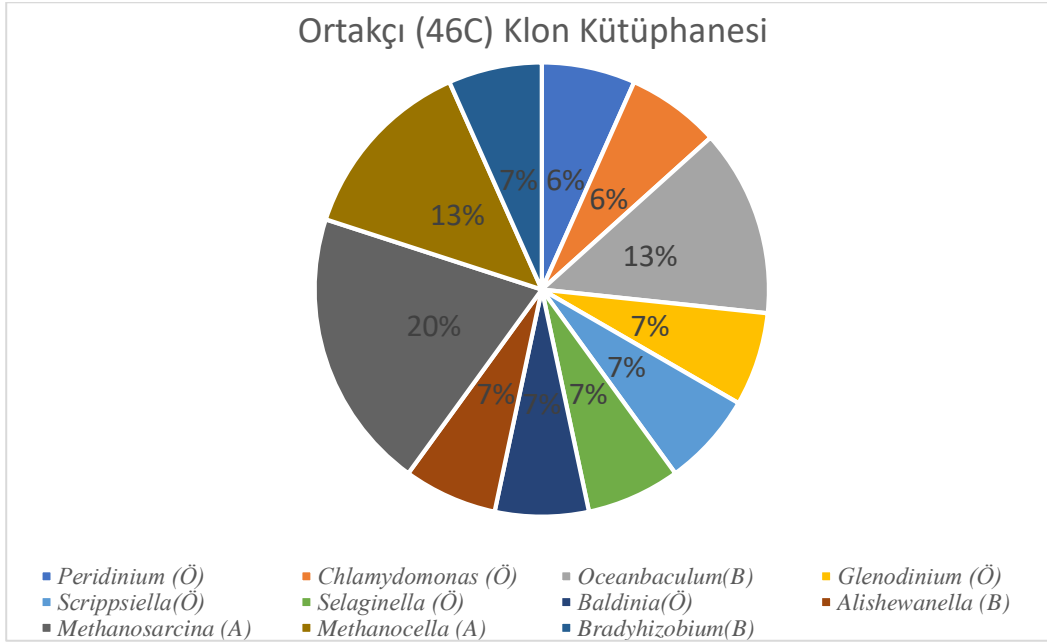
Şekil 25. Hasköy-2 klon yüzde dağılımları.

Bu türlerin yanısıra 86°C'lik Hasköy inaltı istasyonundan alınan örneğimizde 80°C'lik gelişme sıcaklığına sahip hipertermofilik arke türü olan *Archaeoglobus fulgidus*, optimum 85°C'de gelişen anaerobik hipertermofilik arke türü *Desulfurococcus mucosus* ve gelişme sıcaklığı 70-95°C olan hipertermofilik arke türü *Sulfophobococcus zilligii* %91-96'lık yüksek bir benzerlik oranı ile tespit edilmiştir. Bulunan türlerin yüzdelik dağılımları Şekil 26'da verilmiştir.



Şekil 26. Hasköy-1 klon yüzde dağılımları.

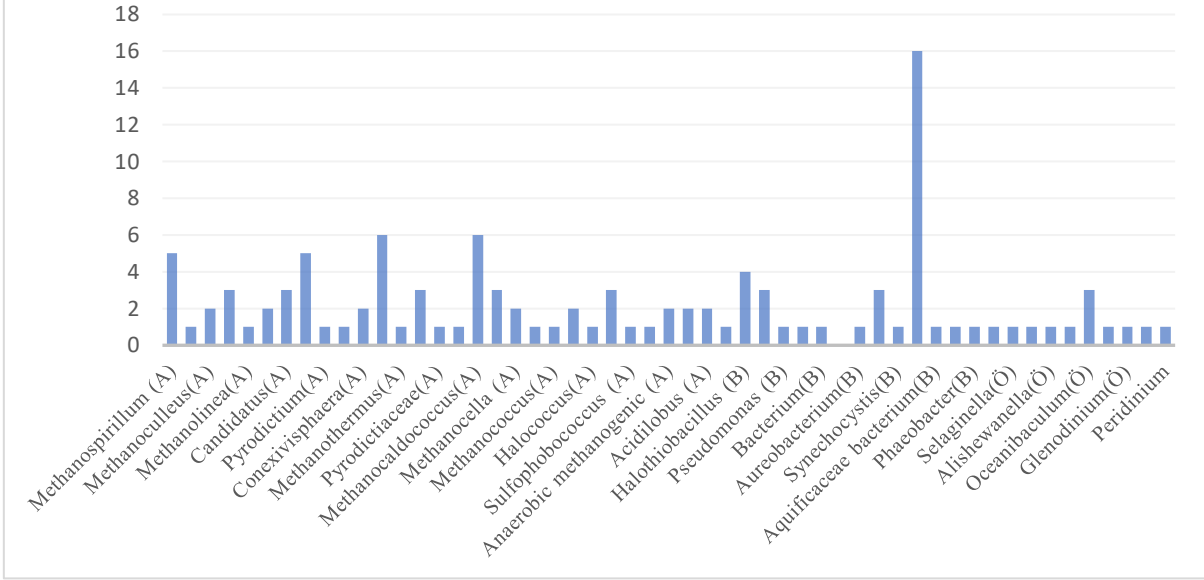
Son olarak 46 °C'lik istasyon sıcaklığına sahip örneğimizde mezofilik metanojenik arke türleri ağırlıklı olmak üzere Dinoflagellata şubesine ait 6 adet tür belirlenmiştir. Bir diğer adı su yosunları olan bu şubeye çalışmamızda yeşil renkli ve yosunumsu olan örneklerde rastlanmıştır. Sekans analizi sonucu elde edilen türlerin yüzdeleri Şekil 27'de gösterilmiştir.



Şekil 27. Ortakçı klon yüzde dağılımları.

Çalışmamızda totalde 112 klon elde edilmiştir bunlar %60 oranında arke, %40 oranında bakteridir. Çalışmamızda yapılan 16S rRNA sekans analizleri sonucu elde edilen toplam klon kütüphanesi resim 19'da verilmiştir.

Toplam Klon Kütüphanesi



Şekil 28. Toplam klon dağılımları.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Aydın ve çevresindeki sıcak su, birikinti ve çamur örneklerinde 16S rRNA sekans analizi bazlı metotlar ile arkeal çeşitliliğin tanımlanması amaçlanmıştır. Çalışmamızda bir tane kesim bölgesi (751F/1406R) olmak üzere 3 farklı primer çifti (25F/1492R-1F/1000R) seçilmiş ve 2 farklı klonlama yöntemi kullanılmıştır. Bunun sonucunda toplamda 112 klon olmak üzere 45 tane bakteri (%40) ve 67 tane arke (%60) tespit edilerek geniş bir çeşitlilik yelpazesi ortaya konulmuştur. Tespit edilen bakteriler ağırlıklı olarak *Thermus* türleri, siyanobakteri ve proteobakteri sınıfına ait bakterilerden oluşmaktadır. Arkeleri ise ağırlıklı olarak hipertermofilik arke türlerinden olan *Ignisphaera aggregans* ve *Thermofilum* oluştururken, termofilik arke türlerini ise *Methanocaldococcus* ve *Methanospirillum* oluşturmaktadır.

1972'de arkelerin ilk kez tanımlanması ile birçok bakteri türü arkeal mikroorganizmalar sınıfına dahil edilmiştir. Gerek metabolik gerek ise fizyolojik özellikleri açısından arkeler, bakteri ve ökaryotlardan farklı mikroorganizmalardır. Ancak tüm bunlara rağmen özellikle termofilik ve hipertermofilik türleri içeren arkeal çeşitlilik çalışmaları yeterli sayıda değildir. Bakteriyel çeşitliliğin yoğun bir şekilde çalışılmasından dolayı literatürde bakteriler pek çok bilgiyi ve veri tabanında birçok türü barındırmaktadır. Ek olarak Türkiye'de ekstrem çevrelerdeki florayı belirleme çalışmaları genellikle kültüre dayalı mikrobiyolojik yöntemlerle gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalarda genellikle halofilik arke türlerine odaklanılmıştır. Tez çalışmamız kültürden bağımsız yöntemler kullanılarak ülkemizde yer alan bazı sıcak su kaynaklarındaki termofilik / hipertermofilik / metanojenik arke çeşitliğinin ilk kez ve detaylı bir şekilde ortaya koymuş olması ve arke biyoçeşitliliği açısından öncü ve aydınlatıcı bir çalışma olacaktır.

Arkelerin ekstrem çevrelere olan adaptasyonları onları prokaryotik çeşitlilik çalışmaları için ilgi çekici hale getirmesinin yanı sıra endüstriyel olarak da pek çok avantaja sahip olmalarını sağlamaktadır. Özellikle termofillerden elde edilen enzimler sahip oldukları dayanıklılıktan dolayı günümüzde ticari olarak kullanım alanı bulmuştur. Son yıllarda yapılan birçok çalışma sıcak su kaynakları gibi ekstrem şartlardan izole edilen arkelerin tanımlanması ve bunların önemli ürünleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Ekstrem şartlarda yaşamak ve çoğalmak için organizmalar metabolik ve diğer hücresel fonksiyonlarını bu ortamlara adapte etmişlerdir. Sıcak su kaplıcalarından izole edilen termofilik arkelerin en

önemli özelliği ekstrem şartlara dayanıklı enzimlere sahip olmasıdır ve bu da onları biyoteknolojik açıdan önemli kılmaktadır. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ile, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değeri nin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, arkeal enzimlerin önemini daha da arttırmaktadır. Endüstriyel/biyoteknolojik ürün çalışmalarının en önemli ve ilk adımlarından biri ise çeşitliğin ortaya konduğu, özellikle olağandışı çevrelerde yapılan flora belirleme araştırmalarıdır.

Tez çalışmamız sayesinde çalıştığımız ekstrem ortamlarda bulunan arkeler başta olmak üzere farklı mikrobiyolojik türler tespit edilmiştir. Elde edilen klon dizileri GenBanka girilecek ve depolanacaktır. Bu vesileyle, kayıt altına alınarak ülkemiz biyoçeşitliliğine katkı sağlanacaktır. Ayrıca, tespit ettiğimiz türlere yönelik izolasyon çalışmaları başlatılabilir, bu sayede elde edilen izolatlardan faydalı metabolitler üretilebilir. Yine aynı şekilde, örneklerimizde hangi mikrobiyal grupların bulunduğunu saptadığımız ve çoğunun metabolik/fizyolojik özelliklerini literatürden öğrenebildiğimiz için bu organizmalara ait metabolik genler de ileriki çalışmalarda klonlanabilir ve faydalı protein/enzimlerin çalışmaları yapılabilir.

KAYNAKLAR

Ahmad I, Ahmad F, Pichtel J. Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications. *Springer Sciences* 2011, 1–516

Amend J.P, Meyer-Dombard D.R, Sheth S.N, Zolotova N & Amend A.C. *Palaeococcus helgesonii* sp. nov., a facultatively anaerobic, hyperthermophilic archaeon from a geothermal well on Vulcano Island, Italy. *Archives Of Microbiology* 2003, 179(6), 394–401

Atomi H, Fukui T, Kanai T, Morikawa M & Imanaka T. Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea* 2004, 1(4), 263-267.

Averhoff B. Shuffling genes around in hot environments: The unique DNA transporter of *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiology Review* 2009, 33(3), 611–626

Bahram M, Anslan S, Hildebrand F, Bork P & Tedersoo F. Newly designed 16S *rRNA* metabarcoding primers amplify diverse and novel archaeal taxa from the environment. *Environmental Microbiology Reports* 2019, 11(4), 487–494

Baker G. C, Smith J.J , Cowan D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiology Methods* 2003, 55(3) , 541–555

Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R & Abebe E. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 2005,360(1462),1935-1943

Budakoglu M, Kurt H, Karaman M, Kumru M, Kumral M & Akarsubaşı A.T. Archaeal Microbial Diversity of Hypersaline Lake Acigöl, Denizli, Turkey. *Geomicrobiology Journal* 2014, 31(6), 454–460

Burns D. G, Camakarıs H. M, Janssen P. H & Dyalı-Smith M. L. Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Applied Environmental Microbiology* 2004, 70 (9), 5258–5265

Brock T.D, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal Of Bacteriology* 1969, 98(1), 289–297

Chaban B, Ng S.Y, Jarrell K.F. Archaeal habitats from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology* 2006, 52(2), 73-116

Çınar S, Mutlu M.B. Comparative analysis of prokaryotic diversity in solar salterns in eastern Anatolia (Turkey). *Extremophiles* 2016, 20(5), 589–601

Eichler J. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology Advances* 2001, 19(4), 261–278

Gantner S, Andersson A. F, Alonso-Sáez L & Bertilsson S. Novel primers for 16S *rRNA*-based archaeal community analyses in environmental samples. *Journal Of Microbiology Methods* 2011, 84(1),12–18

Garrett R.A, Klenk H.P. *Archaea: evolution, physiology, and molecular biology.* Blackwell Publishing 2007, Oxford, United Kingdom

Ghosal D, Omelchenko M. V, Gaidamakova E. K, Matrosova V. Y, Vasilenko A, Venkateswaran A & Wackett L.P. How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS microbiology reviews* 2005, 29(2), 361-375.

Gulecal-Pektas Y, Temel M. A Window to the Subsurface: Microbial Diversity in Hot Springs of a Sulfidic Cave (Kaklik, Turkey). *Geomicrobiology Journal* 2017, 34(4), 374–384

Güven K, Matpan Bekler F, Gul Güven R. Thermophilic and Halophilic Microorganisms Isolated from Extreme Environments of Turkey with Potential Biotechnological Applications. *In Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications* 2018, 219-264

Guzzo J. Biotechnical applications of small heat shock proteins from bacteria. *International Journal Of Biochemical Cell Biology* 2012, 44(10), 1698–1705

l'Haridon S, Reysenbach A.L, Banta A, Messner P, Schumann P, Stackebrandt E & Jeanthon C. *Methanocaldococcus indicus* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen

isolated from the Central Indian Ridge. *International Journal Of Systems Evolution Microbiology* 2003, 53(6), 1931–1935

Jaenicke R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*: Strategies of protein stabilization. *FEMS Microbiology Reviews* 1996, 18(2-3), 215–224

Janda J.M, Abbott S.L. 16S *rRNA* gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal Of Clinical Microbiology* 2007, 45(9), 2761–2764

Lasken R.S, McLean J.S. Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. *Nature Reviews Genetics* 2014,15(9), 577–584

Madıgan M, Martıno J, Bender K, Buckley D, Stahl D. Mikroorganizmaların Biyolojisi (Ed: Prof. Dr. Cumhuri Çökmüş), Palme Yayınları, Ankara, 2016, 834.

McDonald L. Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 1999, 399(6734), 323–329

Malkawi H.I, Al-omari M.N. Approaches to study the bacterial and archaeal diversity from Jordanian hot springs. *African Journal Of Microbiolgy Research* 2010, 4(10), 923-932.

Merkel A.Y, Pimenov N V, Rusanov I.I, Slobodkin A.I, Slobodkina G.B, Tarnovetckii I.Y & Bonch-Osmolovskaya E.A. Microbial diversity and autotrophic activity in Kamchatka hot springs. *Extremophiles* 2017, 21(2), 307–317

Meyer-Dombard D. R , Shock E. L , Amend J. P. Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA. *Geobiology* 2005, 3(3), 211–227

Nelson K.E, Clayton R.A, Gill S.R, Gwinn M.L, Dodson R.J, Haft D.H & McDonald L. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 1999, 399(6734), 323-329

Niederberger T.D, Götz D.K, McDonald I.R, Ronimus R.S & Morgan H.W. *Ignisphaera aggregans* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic crenarchaeote isolated from hot springs in Rotorua and Tokaanu, New Zealand. *International Journal Of Systems Evolutions Microbiology* 2006, 56(5), 965–971

Norris P.R, Burton N.P, Foulis NA. Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles* 2000, 4(2), 71–76

Özşahin E, Kıvanç KAYMAZ Ç. A Geographic Evaluation of Thermal Water Sources of Turkey. *The Journal of Social Science* 2013, 50(50), 25–38

Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiology Research* 2011, 166(2), 99–110

Röling W.F.M, Couto De Brito I.R, Swannell R.P.J & Head I.M. Response of archaeal communities in beach sediments to spilled oil and bioremediation. *Applications Environmental Microbiology* 2004, 70(5), 2614–2620

Serpen U, Korkmaz Basel E.D, Satman A. Power generation potentials of major geothermal fields in Turkey. *Thirty-Third Workshop on Geothermal Reservoir Engineering* 2008, 28–30

Stetter K. O. History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles* 2006, 10(5), 357–362

Stetter, K. O. Hyperthermophiles in the history of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2006, 361(1474), 1837-1843

Üstek D, Abacı N, Sırma S, & Çakiris A. Yeni Nesil DNA Dizileme. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2011, 1(1), 11–18

Větrovský T, Baldrian P. The Variability of the 16S *rRNA* Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS One* 2013, 8(2), 1–10

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ÖZKAN, Rümeysa Gülsu
Uyruk. : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Konya / 09/11/1996
E-mail : gulsuozaann@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü	04/07/2018

BURSLAR ve ÖDÜLLER

Markersız plazmid amplikonuyla direnç geni avcılığı. TÜBİTAK 1002 Projesi, 119Z640, Bursiyer

AKADEMİK YAYINLAR

1. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

ÖZKAN R., Aytar M., BAŞBÜLBÜL G. (2019). Kabağaç (Denizli) Sıcak Su Kaynağında Arke Çeşitliliğinin Belirlenmesi. 2nd International Agriculture, Health, Environment Congress, Aydın. Sözlü Bildiri.

2. PROJELER

Aydın İli ve çevresindeki Sıcak su kaynaklarında arke çeşitliliğinin belirlenmesi.BAP projesi, FEF-19023