

Asid Maden Drenaj Göllerindeki Prokaryotik eřitliliđin Geleneksel ve Moleküler
Yöntemler ile Belirlenmesi ve Biyoteknolojik Uygulamaları

Belma Nural Yaman

DOKTORA TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Ekim 2019

Identification of Prokaryotic Diversity in Acid Mine Drainage by Conventional Methods in
combination with Culture Independent Methods and Biotechnological Applications

Belma Nural Yaman

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biotechnology and Biosafety

October 2019

Asid Maden Drenaj Göllerindeki Prokaryotik eřitliliđin Geleneksel ve Moleküler
Yöntemler ile Belirlenmesi ve Biyoteknolojik Uygulamaları

Belma Nural Yaman

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliđi Uyarınca
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi BAP Komisyonu tarafından 2017/19047 ve
201938D13 no'lu projeler çerçevesinde desteklenmiştir

Ekim 2019

Prof. Dr. Nazif KOLANKAYA'ya

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Belma NURAL YAMAN'ın Doktora tezi olarak hazırladığı “Asid Maden Drenaj Göllerindeki Prokaryotik Çeşitliliğin Geleneksel ve Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi ve Biyoteknolojik Uygulamaları” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

İkinci Danışman :

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Üye: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Üye: Prof. Dr. Semra İLHAN

Üye: Prof. Dr. Erkan ŞAHİNKAYA

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Ahmet ÇABUK danışmanlığında hazırlamış olduğum “Asid Maden Drenaj Göllerindeki Prokaryotik Çeşitliliğin Geleneksel ve Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi ve Biyoteknolojik Uygulamaları” başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 14/10/2019

BELMA NURAL YAMAN

ÖZET

Ülkelerin yeraltı zenginlikleri arasında maden yatakları yanında artık mikrobiyal çeşitlilik unsurları da değerlendirilmektedir. Mikrobiyal çeşitliliğe katkı sağlayacak her yeni veri, ekonomik bir değer olarak düşünülmektedir. Bu tez çalışmasının amacı mikrobiyal komunitesi belirlenen asidik çevreden elde edilecek izolatlar ile maden drenaj sahalarının ıslahına biyoteknolojik yaklaşım ile çözüm olabilmektir.

Tez çalışmasında asid maden drenajından 3 mevsimde yedi örneklem alanından su örneği alınmıştır. Alınan örneklerin pH ve sıcaklık değerleri ölçülmüş, kimyasal içeriği belirlenmesi amacıyla metal analizi yapılmıştır. Kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yöntemler birlikte uygulanmıştır. Kültürden bağımsız yöntemler arasında DGGE, 16S rRNA klon kütüphanesi, FISH ve metagenomik analiz yer almaktadır. Metagenomik ve diğer yöntemlerde elde edilen mikrobiyal komünite verilerine göre seçici besiyerleri de kullanılarak izolasyon çalışmaları devam ettirilmiştir. Elde edilen izolatlardan Fe⁺² oksidasyon seviyelerinin takibi yapılmıştır.

Alınan su örneklerinin demir, altın, alüminyum, manganez, sülfür ve çinkoca zengin olduğu tespit edilmiştir. Kültüre bağlı çalışmalar sonucunda *Acidiphilium*, *Acidithiobacillus* ve *Leptospirillum* cinsi bakteriler izole edilmiştir. DGGE ve klon kütüphanesi sonuçlarına göre baskın olarak *Acidiphilium*, *Metallibacterium*, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* cinsi bakteriler yer aldığı gösterilmiştir. 16S Amplikon dizileme ile elde edilen ham verilerin biyoinformatik analizi sonucunda baskın olan mikroorganizmaların *Acidiphilium*, *Metallibacterium*, *Aciditerrimonas*, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*; *Ferroplasma*, cinslerine ait olduğu tespit edilmiştir. Fe⁺² oksidasyon seviyelerinin belirlenmesi sonucunda, üçüncü sezon alınan örnekten izole edilen *Leptospirillum* sp.'nin %81 oranında oksidasyon yaptığı bulunmuştur. Bu tez çalışması ile heterotrof besiyerinde izole edilen yeni türe aday mikroorganizma izole edilmiş. Türkiye'de ilk kez asid maden drenajının prokaryotik çeşitliliği metagenom yaklaşımla belirlenmiş ve yüksek oranda Fe⁺² oksidasyon yeteneğine sahip *Leptospirillum ferrooxidans* ile biyomadencilik çalışmalarının devam edebileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Asidofil, metagenomik, mikrobiyal çeşitlilik, oksidasyon

SUMMARY

Microbial diversity elements have been evaluated among the underground riches of the countries like mineral deposits. New data related microbial diversity is thought as an economical value. The aims of this thesis are to be a solution in biotechnological approach of breeding of mine drainage sites and isolates from acidic environment.

In the thesis, acid mine drainage samples were taken in three seasons whose pH, temperature were measured and metal analysis were performed to determine the chemical content. Both culture-independent and culture-dependent analysis of the samples were performed. Culture independent techniques, DGGE, 16S rRNA clone library, FISH and metagenomics, were applied. According to the microbial community data obtained by metagenomics and other methods, isolation studies were continued by using selective media. Fe⁺² oxidation screening study was carried out among the isolates.

Water samples were rich in iron, gold, aluminium, manganese, sulphur and zinc. As a result of culture-related studies, *Acidiphilium*, *Acidithiobacillus* and *Leptospirillum* were isolated. The dominant bacteria are found to be *Acidiphilium*, *Metallibacterium*, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, according to the results of DGGE analysis and clone libraries. Metagenomics approach has been exhibited *Acidiphilium*, *Metallibacterium*, *Aciditerrimonas*, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Ferroplasma*. According to Fe⁺² oxidation screening, *Leptospirillum* was selected with 81% oxidation in reaction. The candidate microorganism grown on the heterotroph medium was isolated in this thesis. Prokaryotic diversity of the acid mine drainage in Turkey have been determined for the first time by metagenomics approach and an isolate with high oxidation of Fe⁺² has been shown to be ability for biomining studies.

Keywords: Acidophiles, metagenomics, microbial diversity, oxidation

TEŞEKKÜR

Akademik çalışma hayatımda ilerlemem için her zaman destek olan, fikir ve deneyimlerini paylaşan, akademik çalışma hayatım dışında da destek ve ilgisini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇABUK'a,

Tez sürecim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşan doktora tez izleme komitesi üyeleri saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK (YTÜ) ve Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya (ESTÜ),

Doktora eğitim dönemimde sağlamış oldukları destekten dolayı TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na,

Bu tez çalışmasına 2017/19047 ve 201938D13 no'lu projeler ile destek sağlayan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

Tez çalışmamın uygulama aşamasına katkı sağlayan saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Erkan ŞAHİNKAYA 'ya (İMÜ),

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen, Doç. Dr. Pınar AYTAR ÇELİK, Dr. Öğretim Üyesi Ferhan KORKMAZ, Dr. Serap GEDİKLİ, Uzm, Büşra KIZILKAYA, Uzm. Hakan ÇAKMAK ve Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmama sağladığı katkılar, bu süreçte göstermiş olduğu sabır ve desteğinden dolayı sevgili eşim Can YAMAN'a,

Hayatımın her anında olduğu gibi akademik hayatımın başlangıcından itibaren yanımda olan ve aldığım kararlarda desteklerini hiç esirgemeyen sevgili aileme,

Lisans hayatımdan bugüne dek her zaman yanımda hissettiğim çok kıymetli arkadaşlarım; Arş. Gör. Aygül ZENGİN, Dr. Benan İNAN, Bilge ARSLAN, Arş. Gör. Hati KÖSE-DUNN, Kezban KÜÇÜKTÜFEKÇİ, Doktora Öğrencisi Nilbeste BONCUKÇU, Özlem ERGÜN ve Dr. Öğr. Üyesi Sinem KOÇER'e,

Bana ve bu teze emeği geçen herkese çok teşekkür ederim.

BELMA NURAL YAMAN

Eskişehir, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1.Ekstrem Koşullar ve Ekstremofiller	3
2.2.Asidik Habitatlar	5
2.3.Asidofil Mikroorganizmalar	8
2.3.1.AMD sistemlerinde mikrobiyal çeşitlilik	8
2.3.1.1.Bakteri çeşitliliği	10
2.3.1.2.Arke çeşitliliği	16
2.3.2. AMD sistemlerinde metabolizma ve element dönüşümü	17
2.3.2.1. <u>Demir metabolizması</u>	19
2.3.2.2. <u>Sülfür metabolizması</u>	20
2.3.2.3. <u>Nitrojen metabolizması</u>	22
2.3.2.4. <u>Karbon metabolizması</u>	25
2.3.2.5. <u>Metan üretimi</u>	25
2.3.2.6. <u>Hidrojen metabolizması</u>	26
2.3.3. Asidofil mikroorganizmaların adaptasyon mekanizmaları	26
2.3.4. Ekstremofil mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamaları	33
2.4.Mikrobiyal Çeşitlilik	37
2.4.1. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan kültüre bağlı teknikler	38
2.4.2. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan kültürden bağımsız teknikler	39
2.4.2.1. <u>Klon kütüphanesi oluşturma</u>	41
2.4.2.2. <u>Genetik parmak izi teknikleri</u>	42
2.4.2.3. <u>DGGE ve TGGE</u>	43

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.4.2.4. Amplifiye ribozomal DNA restriksiyon analizi ve terminal restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi	44
2.4.2.5. <u>Fonksiyonel mikrobiyal çeşitlilik</u>	46
2.4.2.6. <u>Q-PCR</u>	47
2.4.2.7. <u>Fluoresans in situ hibridizasyon</u>	48
2.4.2.8. <u>Yeni nesil moleküler teknikler</u>	50
2.5. Biyoteknolojik Uygulamalar	54
3. MATERYAL VE YÖNTEM	59
3.1. Materyal	59
3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar, enzimler, vektörler	59
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar	60
3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri	61
3.1.3.1. Asidiofil mikroorganizmalar için kullanılan besiyerleri	61
3.1.3.2. Mikrobiyolojik ve moleküler çalışmalarda kullanılan besiyerleri	65
3.1.4. Çalışmada kullanılan stok ve çözeltiler	66
3.1.5. Moleküler çalışmalarda kullanılan primer ve oligonükleotid problemler	71
3.2. Yöntem	72
3.2.1. Örneklerin alınması	73
3.2.1.1. <u>Birinci sezon örnekleme</u>	73
3.2.1.2. <u>İkinci sezon örnekleme</u>	74
3.2.1.3. <u>Üçüncü sezon örnekleme</u>	74
3.2.2. Metal analizleri	75
3.2.3. Kültüre bağlı yöntemler ile mikroorganizma tanımlama çalışmaları	75
3.2.4. Kültürden bağımsız yöntemler ile mikroorganizma tanımlama çalışmaları	79
3.2.4.1. <u>Membran filtrasyon</u>	79
3.2.4.2. <u>DNA izolasyonu</u>	80
3.2.4.3. Klon kütüphanesi oluşturma ve amplifiye ribozomal DNA restriksiyonu analizi	82
3.2.4.4. 16S rRNA DGGE PCR ürünleri elde edilmesi ve DGGE analizi	87
3.2.5. FISH (Fluoresan in situ hibridizasyon) analizi	93
3.2.6. Metagenomik yaklaşımla çeşitliliğin belirlenmesi	95
3.2.7. Biyoinformatik analizler	96
3.2.8. İstatistiksel Analizler	97
3.2.9. Biyoteknolojik Uygulamalar	99
3.2.9.1. <u>Fe⁺² için standart eğri çizilmesi</u>	99

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.9.2. $Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$ reaksiyonunun taranması.....	99
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	101
4.1.Örneklem Alanlarının Metal İçeriklerinin Belirlenmesi	101
4.2.Kültüre Bağlı Yöntemler ile Mikroorganizma Tanımlama Çalışmaları.....	103
4.3.Kültürden Bağımsız Yöntemler ile Mikroorganizma Tanımlama.....	114
4.3.1.Membran filtrasyon ve DNA izolasyonu.....	114
4.3.2.16S rRNA PCR ürünleri ve klon kütüphanesi oluşturma	116
4.3.3.DGGE PCR ürünleri ve analizi.....	159
4.3.4.Metagenomik analiz.....	184
4.3.5.FISH.....	202
4.4.İstatiksel Analizler.....	204
4.5.Biyoteknolojik Uygulamalar	210
4.5.1. Fe^{+2} için standart eğri çizilmesi.....	210
4.5.2. $Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$ oksidasyon seviyelerinin belirlenmesi	211
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	223
KAYNAKLAR DİZİNİ	225
ÖZGEÇMİŞ	253

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Karakterize edilmiş AMD yerleşimleri ve jeokimyasal özellikleri	9
2.2. Türkiye’de yer alan işletilen ve işletme potansiyeli olan demir yatakları	9
2.3. Türkiye’de bulunan Maden Yatakları	10
2.4. AMD sistemlerindeki mikrobiyal çeşitliliğin 16S rRNA gen bölgesi tabanlı filogenisi	12
2.5. AMD mikrobiyal topluluklarında adaptasyonu düzenleyen metabolik ağlara genel bakış	19
2.6. AMD sistemlerindeki bakterilerin demir ve sülfür metabolizmalarının genel şeması	20
2.7. Asidofil mikroorganizmaların asidik çevrelerde adaptasyonu	28
2.8. Ekzopolifosfataz ve polifosfat kinazların çalışma prensibi	33
2.9. Mikrobiyal komünite içindeki ekolojik organizasyon.....	37
2.10. Biyoremediasyon stratejilerinin şematik gösterimi	41
2.11. Mikrobiyal topluluk analizi için klon kütüphanesi yöntemi	42
2.12. Denatüre gradyan jel elektroforezinin şematik gösterimi	44
2.13. Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon analizinin şematik gösterimi	45
2.14. Fonksiyonel gen dizisi için tipik bir iş akış gösterimi	47
2.15. QPCR analizinin şematik anlatımı	48
2.16. Floresan in situ hibridizasyon yönteminin şematik gösterimi	49
2.17. Metagenomik çalışmaların tasarımı	52
2.18. DNA dizilemenin yıllara göre maliyeti	52
2.19. Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları.....	54
3.1. Ekinözü-Maraş bölgesini Türkiye haritasındaki yeri	73
3.2. Birinci sezon örneklem noktaları.....	73
3.3. Elektroforez sıcaklık kontrol modülü.....	90
3.4. Cam plakalar, aralayıcı ve kısıkaçların pozisyonu	91
3.5. Sandviç birleşmesinde aralayıcıların dizilme şekli	91
3.6. Gradient oluşturma sistemi.....	91
3.7. Paralel gradient jel kaset sistemi	92
3.8. Çevresel faktör -klon sayıları ile hazırlanan veri tablosu (Birinci sezon).....	98
3.9. Çevresel faktör -okuma sayıları ile hazırlanan veri tablosu (Birinci sezon)	98
3.10. Çevresel faktör -klon sayıları ile hazırlanan veri tablosu (Birinci örneklem alanı)	98
3.11. Çevresel faktör -okuma sayıları ile hazırlanan veri tablosu (Birinci örneklem alanı).....	98
4.1. İnorganik demir besiyerinde büyüyen mikroorganizmaların mikroskop görüntüsü	103

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2. Heterotrofik besiyerinde büyüyen izolatlar	104
4.3. Birinci sezon Ye3 besiyerinde izole edilen mikroorganizmaların genomik DNA'ları	104
4.4. Birinci sezon Ye3 besiyerinde izole edilen mikroorganizmaların 16S rRNA PCR ürünü.....	105
4.5. Mikroorganizmaların 16S rRNA PCR ürünlerinin <i>Cfo</i> kesim profili	105
4.6. Mikroorganizmaların 16S rRNA PCR ürünlerinin <i>HinfI</i> kesim profili.....	105
4.7. Mikroorganizmaların 16S rRNA PCR ürünlerinin <i>AluI</i> kesim profili	106
4.8. Mikroorganizmaların 16S rRNA PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> kesim profili	106
4.9. Birinci sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	107
4.10. Birinci sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	107
4.11. Birinci sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	108
4.12. Birinci sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	108
4.13. İkinci sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	109
4.14. Birinci ve üçüncü sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....	109
4.15. <i>Leptospirillum</i> 'a özgü besiyeri ve bu besiyerinde geliştirilen K7 izolatı.....	110
4.16. <i>Leptospirillum</i> 'a özgü besiyerinde geliştirilen K7 genomik DNA ve 16S rRNA PCR ürünü..	110
4.17. Yarım filtre ile izole edilen çevresel DNA görüntüleri (1 µl).....	114
4.18. Çevresel DNA'ların elektroforez jel görüntüsü.....	115
4.19. İkinci ve üçüncü sezon örnekleri çevresel DNA jel görüntüsü.	115
4.20. K1 ve K2 için 6'şar tüp 16S rRNA PCR ürünleri	117
4.21. K3,K4,K5 için 6'şar tüp 16S rRNA PCR ürünleri	117
4.22. Saflaştırılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü	117
4.23. K5-klon kütüphanesindeki beyaz kolonilerin amplifikasyonu.....	119
4.24. K5 klonlarını <i>Hinf I</i> enzimi ile reaksiyonu sonucunda elde edilen kesim profili.....	120
4.25. K5 klonlarını <i>MspI</i> ve <i>HaeIII</i> enzim çifti ile kesim profili	121
4.26. K5 örneklem alanının klon kütüphanesi içi seçilen üç plazmidin jel görüntüsü.....	122
4.27. K3 klonlarını <i>Hinf I</i> enzimi ile kesildikten sonra elde edilen kesim profil	123
4.28. K4 klonlarını <i>Hinf I</i> enzimi ile kesildikten sonra elde edilen kesim profili	124
4.29. İkinci sezon çevresel DNA'dan amplifiye edilen K6 16S rRNA PCR ürünü	124
4.30. K6 klon kütüphanesindeki beyaz kolonilerin amplifikasyonu	126
4.31. K6 örneklem alanının klon kütüphanesinin <i>HaeIII</i> ile oluşturulan restriksiyon profili	127
4.32. K6 örneklem alanının klon kütüphanesinin <i>AluI</i> ile oluşturulan restriksiyon profili	127

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.33. Üçüncü örneklem alanı 16S rRNA gen bölgesi PCR ürünleri	129
4.34. K7 saf 16S rRNA gen bölgesi PCR ürünü	129
4.35. K5- klon kütüphanesindeki kolonilerin amplifikasyon ürünleri.....	130
4.36. K5 klon kütüphanesi restriksiyon analizi	131
4.37. K4 klon kütüphanesi mavi koloni PCR sonuçları	133
4.38. K4 klon kütüphanesi mavi koloni PCR ürünlerinin <i>HinfI</i> ile kesim profili	133
4.39. K7 klon kütüphanesinin kolon PCR jel görüntüsü	134
4.40. K7 klonlarının AluI restriksiyon enzimleri ile kesim profili.....	135
4.41. K7 seçilen klonlar ile amplifiye edilen koloni PCR ürünleri	135
4.42. 27F-1492R primer çifti ile amplifiye edilen PCR ürünleri.....	136
4.43. K1 Klon Kütüphanesi koloni PCR ürünleri -1	137
4.44. K1 Klon kütüphanesi koloni PCR ürünleri-2.	138
4.45. K1 Klon kütüphanesinin restriksiyon analizi (AluI kesim).....	139
4.46. K1 klon kütüphanesinden dizi analizine gönderilmek üzere izole edilen plazmidler.	140
4.47. K7 Klon Kütüphanesi koloni PCR ürünleri.....	142
4.48. K7 klon kütüphanesinin restriksiyon analizi	143
4.49. K7 klon kütüphanesinden dizi analizine gönderilmek üzere izole edilen plazmidler.	145
4.50. K2 Klon Kütüphanesi koloni PCR ürünleri.....	146
4.51. K2 Klon kütüphanesinin restriksiyon analizi	147
4.52. K2 klon kütüphanesinden dizi analizine gönderilmek üzere izole edilen plazmidler.	148
4.53. K4 klon kütüphanesinin restriksiyon analizi	150
4.54. K4 klon kütüphanesinden dizi analizine gönderilmek üzere izole edilen plazmidler.	152
4. 55. K3 Klon Kütüphanesi restriksiyon analizi	154
4.56. K3 klon kütüphanesinden dizi analizine gönderilmek üzere izole edilen plazmidler.	155
4.57. Bakteri DGGE PCR ürünleri.	159
4.58. Bakteri DGGE PCR ürünleri.	160
4.59. Saflaştırılmış Bakteri DGGE PCR ürünleri.....	161
4.60. Kalıp olarak 1 µl DNA kullanılan Arke DGGE PCR ürünleri jel görüntüsü.....	161
4.61. Kalıp olarak 2 µl ve 3µl DNA kullanılan Arke DGGE PCR ürünleri jel görüntüsü.....	162
4.62. Birinci sezon örneklerinin %60-40 konsantrasyon aralığında DGGE analizi.....	163
4.63. %50-30 denatüre edici konsantrasyonu ile hazırlanan jelde DGGE analizi.....	164

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.64. İki sezon çevresel DNA ile amplifiye edilen bakteri DGGE PCR ürünleri jel görüntüsü... ..	165
4.65. BY10 ve BY17 izolatların bakteri DGGe PCR ürünleri jel görüntüsü.	165
4.66. %60-%40 denatüre edici konsantrasyonu ile hazırlanan jelde DGGE analizi.	166
4.67. 1µl kalıp DNA kullanılarak amplifiye edilen Re-PCR ürünleri jel görüntüsü.....	167
4.68. 2µl kalıp DNA kullanılarak amplifiye edilen Re-PCR ürünleri jel görüntüsü.....	167
4.69. 3µl kalıp DNA kullanılarak amplifiye edilen Re-PCR ürünleri jel görüntüsü.....	167
4.70. Birinci sezon üç örneklem alanının bakteri DGGE PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....	168
4.71. Bakteri DGGE PCR amplifikasyon ürünleri.	168
4.72. İki sezon örneklerin DGGE jel görüntüsü.	169
4.73. DGGE bantlarından elde edilen DNA'ların Re-PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	170
4.74. Tekrar edilen Re-PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....	170
4.75. İkinci kez tekrar edilen Re-PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	171
4.76. Üçüncü sezon örneğinin DGGE PCR ürünleri jel görüntüsü.....	171
4.77.Üçüncü sezon örneğin DGGE analizi.....	172
4.78. DGGE bantlarından elde edilen DNA'ların Re-PCR ürünleri	173
4.79. K1 örneklem yerinin filogenetik analizi.....	177
4.80. K2 örneklem yerinin filogenetik analizi.....	178
4.81. K3 örneklem yerinin filogenetik analizi.....	179
4.82 K4 örneklem alanının filogenetik analizi	180
4.83. K5 örneklem alanının filogenetik analizi	181
4.84 K6 örneklem alanının filogenetik analizi	182
4.85. K7 örnekleme alanın filogenetik analizi	183
4.86. K1 örneklem alanının FASTQC analizi	185
4.87. K2 örneklem alanının FASTQC analizi	186
4.88. K3 örneklem alanının FASTQC analizi	187
4.89. K4 örneklem alanının FASTQC analizi	188
4.90. K5 örneklem alanının FASTQC analizi	189
4.91. K6 örneklem alanı FASTQC analizi	190
4.92. K7 örneklem alanının FASTQC analizi	191
4.93. K1, K6 ve K7 örnekleme alanının alfa çeşitliliği.....	192
4.94. K1, K6 ve K7 örneklem alanının beta çeşitliliği	192

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.95. K2, K3, K4 ve K5 sularının alfa çeşitliliği	193
4.96. K2, K3, K4 ve K5 sularının beta çeşitliliği	193
4.97.3 sezon örneklerinin Bakteri ve Arke domainindeki temsilcileri (16S Amplikon).....	194
4.98. K1 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları	194
4.99. K2 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları	195
4.100. K3 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları	195
4.101. K4 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları	196
4.102. K5 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları	196
4.103. K6 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları	197
4.104. K7 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları	197
4.105. FISH preparatlarının DAPI ve FISH görüntüleri	203
4.106. OTU sayıları ile elde edilen CCA analizi (Birinci örneklem alanı)	204
4.107 Birinci sezon örneklem alanının mikrobiyal çeşitliliğin (OTU sayısı ile) CCA analizi.....	205
4.108. Birinci örneklem alanının üç sezona ait mikrobiyal çeşitliliğin (klon sayısı) CCA analizi	206
4.109. Birinci sezon örneklem alanlarının mikrobiyal çeşitliliğin (klon sayısı) CCA analizi.....	207
4.110. Birinci örneklem alanlarının üç sezona ait PCA analizi.....	208
4.111. Birinci sezon örneklem alanlarının PCA analizi	208
4.112. Birinci örneklem alanlarının üç sezona ait PCoA analizi.....	209
4.113. Birinci sezon örneklem alanlarına ait PCoA analizi.....	209
4.114. Fe ⁺² standart eğrisi	211
4.115. K7- <i>Leptospirillum</i> Fe ⁺² oksidasyonu.....	212
4.116. K4- <i>Leptospirillum</i> Fe ⁺² oksidasyonu.....	212
4.117. K3- <i>Leptospirillum</i> Fe ⁺² oksidasyonu.....	213

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1. Mikrobiyal Çeşitliliğin Ölçüleri	38
2.2. Dizileme Platformları ve Özellikleri	53
3. 1. Tez çalışması sırasında kullanılan cihazlar	60
3. 2. Tez çalışmasında kullanılan oligonükleotid dizileri.....	71
3.3. Metagenomik analizde kullanılan indeks dizileri.....	72
3.4. Tez süresince takip edilen plan.....	72
3.5. Birinci dönem örneklem noktalarının özellikleri.....	74
3.6. İkinci dönem örneklem noktasının özellikleri.....	74
3.7. Üçüncü dönem örneklem noktasının özellikleri.....	75
3.8. 16S rRNA PCR için kullanılan bileşenler	77
3.9. Birinci sezon su örneklerinin filtre edilen hacimleri	79
3.10. İkinci sezon örneklem alanından alınan suyun filtreden geçirilen hacmi	80
3.11. Üçüncü sezon örneklem alanından alınan suyun filtreden geçirilen hacmi	80
3.12. 16S rRNA PCR bileşenleri (27 F ve 1387 R primer çifti için)	83
3. 13. 16S rRNA PCR bileşenleri (27 F ve 1492 R primer çifti için)	83
3.14. Ligasyon reaksiyonunda kullanılan bileşenler	85
3.15. Koloni PCR bileşenleri.....	85
3.16. Bakteri DGGE PCR Bileşenleri	88
3.17. Arke DGGE PCR Bileşenleri	88
3.18. DGGE Stok solüsyon-I.....	89
3.19. DGGE Stok solüsyon-II	90
3. 20. %60-%40 konsantrasyonda jel hazırlanması için gerekli hacimler.....	90
3. 21. %50-%30 konsantrasyonda jel hazırlanması için gerekli hacimler.....	90
3. 22. Re-PCR bileşenleri	92
3.23. Standart eğri için hazırlanan dilüsyonlar	99
4.1.Kahramanmaraş Ekinözü'ndeki örneklem bölgelerinin fizikokimyasal karakterizasyonu.....	102
4. 2. Kahramanmaraş Ekinözü'nden alınan su örneklerinden elde edilen izolatlar	103
4. 3. Heterotrof besiyerinde gelişen izolatların kesim sonrası profile ait izolatların dağılımı	106
4.4. İzole edilen mikroorganizmaların moleküler identifikasyon sonucu	111
4.5.Tez çalışmasında elde edilen ve tanımlaması yapılan izolatların kodları	112

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.6.Üç sezonda alınan örneklerden ekstrakte edilen çevresel DNA'ların konsantrasyonu	116
4.7.Beş farklı istasyonun 16S rRNA PCR ürünlerinin miktarları	118
4.8.Ligasyonda kullanılan DNA hacimleri.....	118
4.9. <i>Msp</i> I- <i>Hae</i> III İkili enzim kesim reaksiyon bileşenleri.....	119
4.10. <i>Hinf</i> I ile kesim reaksiyon bileşenleri	120
4.11. K5 örneklem alanının klonlarının enzimler ile kesiminden elde edilen profile ait klonlar...	121
4.12. K6 örneklem alanının 16S rRNA PCR ürününün NanoDrop ile belirlenen konsantrasyon .	125
4.13. K6-klon kütüphanesi kesim profiline göre klonların dağılımı	128
4.14. K6 örneklem alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları	128
4.15. K7-16S rRNA gen bölgesi PCR ürünün konsantrasyonu.....	129
4.16. K5 klonlarının ait olduğu profil numaraları	131
4.17. K5 Klon kütüphanesinde profillerin ait olduğu asidofil mikroorganizmalar	132
4.18. K1 klon kütüphanesi kesim profiline göre klonların dağılımı.....	140
4.19. K1 örneklem alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları	141
4.20. K7 klon kütüphanesinin kesim profiline göre klonların dağılımı.....	144
4.21. K7 örneklem alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları	145
4.22. K2 klon kütüphanesinin kesim profili göre koloni dağılımı	148
4.23. K2 örneklem alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları	149
4.24. K4 klon kütüphanesinin kesim profiline ait kolonilerin dağılımı	151
4. 25. K4 örneklem alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları	153
4.26. K3 klon kütüphanesinin kesim profiline ait kolonilerin dağılımı	155
4.27. K3 örneklem alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları	156
4.28. DGGE bantlarının örneklerle göre dağılımı	169
4.29. DGGE bantlarının eşleştiği türler ve izole edildikleri çevreler	174
4.30. Uygulanan yöntemlere göre örneklem alanlarında tanımlanan mikroorganizmaların listesi	200
4.31. Örneklerin DAPI boyamalarında hücre sayıları	202
4.32. Standart eğri noktalarının absorbans değerleri.....	210
4.33. Fe ⁺² oksidasyon tarama sonuçları.....	211
4.34. Fe ⁺² oksidasyonunda en iyi seçilen mikroorganizmanın besleme sonrası 4 gün süresince alınan ölçümleri	213

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.35. Besleme sonrası Fe ⁺² oksidasyon sonuçları.....	214
4.36. İki kat besleme sonrasında Fe ⁺² oksidasyon sonuçları	214
4.37.Literatürdeki asidik çevrelerde kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yapılan çalışmalarda belirlenen çevresel etmenler	216
4.38.Türkiye’de asidik çevrelerde kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yapılan çalışmalarda belirlenen çevresel etmenler	217
4.39.Literatürdeki asidik çevrelerde kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yapılan çalışmalarda belirlenen mikrobiyal komünite.....	218
4.40.Türkiye’de asidik çevrelerde kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yapılan çalışmalarda belirlenen mikrobiyal komünite.....	219
4.41.Literatürdeki metagenomik çalışmaları ile bu tez çalışmasında sonuçları karşılaştırılması ..	221

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat Derece
α	Alfa
A	Adenin
β	Beta
C	Sitozin
Fe ⁺²	Ferröz
Fe ⁺³	Ferrik
G	Guanin
K	Potasyum
SO ₃ ⁻²	Sülfit
O ₂	Oksijen gazı
S	Elementer Kükürt
S ⁻²	Kükürt
H ₂ S	Sülfidogenez
SO ₄ ⁻²	Sülfat
N ₂	Azot gazı
CO ₂	Karbondioksit
Mo	Molibden
NO ₃ ⁻	Nitrat
NO ₂ ⁻	Nitrit
pI	İzoelektronik nokta
Ni	Nikel
Mn	Manganez
Cd	Kadmiyum
Zn	Çinko
Co	Kobalt
Pb	Kurşun
g	Gram
L	Litre

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Simgeler

T	Timin
v/v	Hacim/hacim
μL	Mikrolitre

Açıklama

Kısaltmalar

ABC	ATP bağlayıcı kaset
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>
AMD	Asid Maden Drenaj
APS	Adenosin fosfosülfat
ARD	Asid Rock Drenaj
ASS	Acid sulphate soils
ATP	Adenozin trifosfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Blue Selection Agar- Mavi Seçim Agar
BsuRI	<i>Bacillus subtilis</i> R
CARD-FISH	Catalyzed reporter deposition Fluoresans In Situ Hibridizasyon
CBB	Calvin-Benson-Bassham
CCA	Kanonikal Korrespondes Analiz
CDF	Kasyon difüzyon kolaylaştırıcı
DNA	Deoksiribonükleit asit
DGGE	Denatüre edici gradient jel elektroforezi
FeS	Demir Kükürt
FISH	Fluoresans In Situ Hibridizasyon
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>
<i>Hinfl</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
iFe	İnorganik demir ortamı
PMF	Proton Motiv Güç
MAR	Mikroatoradiografi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
<i>MspI</i>	Moraxella species
NAD	Nikotinamiddinükleotit
NGS	Yeni Nesil Sekanslama
OTU	Operasyonel Taksonomik Birim
PAP	3'-fosfoadenosin-5p-fosfosülfat
PASS	Potansiyel asit sülfat toprakları
PAST	Paleontoloji İstatistik
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
polyP	polifosfat
ppk	Polifosfat kinazlar
ppx	Ekzopolifosfataz
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology)
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluğu Polimorfizmi
RISC	İndirgenmiş inorganik kükürt bileşikleri
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RND	Direnç Nodülasyon Bölümü
rTCA	İndirgeyici trikarboksilik asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Sqr	Sülfid/kinon oksidoredüktaz
Sor	Kükürt oksijenaz redüktaz
SSU	Küçük alt-birim
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris Aseta EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
TGGE	Sıcaklık gradienti jel elektroforezi
T-RFLP	Terminal Restriksiyon Fragment Uzunluğu Polimorfizmi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikroorganizmaların çeşitliliğini belirlemek için yapılan çalışmalarda ekstrem (aşırı) çevrelere olan ilgi artmıştır. Bu durumu yaratan sebepler arasında gezegenimizde yaşamın git gide genişlemesi, biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda ekstremofil mikroorganizmaların enzim ya da diğer hücre ürünlerinin kullanımı yer almaktadır. Ekstremofil (aşırı seven) mikroorganizmalar, bir veya daha fazla kimyasalın varlığında veya düşük/yüksek sıcaklık ya da pH koşullarında metabolik olarak aktif olabilmektedirler. Bakteri (*Bacteria*), Arke (*Archaea*) ve Ökarya (*Eukarya*) domainlerinde temsil edilmektedirler.

Ekstremofillerin ilgi çeken sınıflarından biri olan asidofiller pH 3 ya da daha düşük ortamlarda optimal olarak gelişebilen mikroorganizmalardır. Kemolitotrof olan ve CO₂'i karbon kaynağı olarak kullanan asidofil mikroorganizmalar, enerjisini indirgediği inorganik ve/veya organik bileşiklerin oksidasyonundan temin etmektedir. Asidofil mikroorganizmaların asit maden drenajı proseslerindeki madencilik ile ilgili çevre sorunu sürecinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Kimyasal kirleticiler dere yatağı, nehir ve yer altı sularının yakınındaki drenajlar ve maden bölgelerini kontamine etmektedir ve bazı mikroorganizmalar bu metal madenlerinde bulunan kükürtü, sülfirik asite dönüştürmek için kükürt döngüsünü kullanmaktadır. Sülfirik asit üretimi bitki, hayvan ve diğer mikroorganizmalara zararlı olabilirken, asidofil mikroorganizmalar asidik koşulların sonucu olarak bu durumu tolere edebilmektedir. Asidik ortamlarda bulunan mikroorganizmaları belirlemek, uygulamalı biyoteknolojide kullanılacak mikroorganizmaların biyomateryallerini açığa çıkarmak açısından önemlidir.

Ülkelerin yeraltı zenginlikleri arasında maden yatakları yanında artık mikrobiyal çeşitlilik unsurları da değerlendirilmektedir. Mikrobiyal çeşitliliğe katkı sağlayacak her yeni veri, ekonomik bir değer olarak düşünülmektedir. Asidik çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar da önemli bir grubu temsil etmektedir. Buna karşın, ülkemizde asidik çevreler ve asidofil mikroorganizmalar konulu çalışmalar sınırlı iken çok sayıda asidik çevre bulunmaktadır. Bu alanların farklı asidofil mikroorganizmaları barındıracağı düşünülmektedir. Önerilen tez çalışması aynı zamanda da Avrupa Birliği Çerçeve

Programları'nda öncelikli olarak belirlenmiş olan alanlardan “Biyoçeşitliliğe” katkı sağlayacaktır.

Önerilen tez çalışması kapsamında Kahramanmaraş Ekinözü bölgesinde yer alan asid maden drenaj gölünden alınan su örneklerinin kültüre bağlı ve kültürden bağımsız teknikler kullanılarak mikrobiyal çeşitliliği belirlenmiş, kültüre edilebilen mikroorganizma komünitesinden en yüksek verimde Fe^{+2} okside eden izolat belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Ekstrem Koşullar ve Ekstremofiller

Mikroorganizmalar, her yerde yaşamalarına imkân veren özelliklere sahip oldukları için doğada çok çeşitli habitatlarda bulunabilmektedir (Srilatha, 2011). Yaşamın devamlılığı için önemli olan çevreler ılımlı olarak tanımlanmaktadır. İlimli terimi, nötre yakın pH değeri, 20 °C- 40 °C arasındaki sıcaklık, 1 atm hava basıncı ile yeterli seviyelerde su, besin ve tuza sahip olan çevreler için kullanılmaktadır. Pek çok asidik ya da sıcak su kaynakları, tuzlu ve/veya alkali göller, çöller ve okyanus yatakları gibi ekstrem çevreler normal bir yaşamın var olması için oldukça sert koşullar olarak tanımlanmaktadır. Herhangi bir çevresel koşulun normal koşulların ötesinde olduğu düşünülürse ekstrem koşul olarak ifade edilebilmektedir (Satyanarayana vd., 2005). Ekstrem çevreler, sıcaklık, radyasyon ve basınç gibi fiziksel çevreleri; tuzluluk, pH oksijen türleri ve redoks potansiyeli gibi jeokimyasal çevreleri içermektedir (Tse ve Ma, 2016).

Çeşitli mikroorganizmalar bu gibi çevrelerde hayatta kalarak büyüyebilmekte ve ekstremofil olarak bilinmektedirler (Satyanarayana vd., 2005). Ekstremofil, Latince, *extremus-extrem*, aşırı; Yunanca, *philia-aşk*, sevmek kelimelerinin birleşimi ile oluşturulmuştur (Shrestha vd., 2019). Ekstremofil mikroorganizmalar ekstrem çevrelerde optimal olarak büyüyen organizmalardır ve spesifik ekstrem koşulları yalnızca tolere etmekle kalmayıp hayatta kalmaları ve büyümeleri için bu koşullara ihtiyaç duymaktadır. Bu organizmalar birden fazla ekstrem çevrede hayatta kalmaya devam edebilmektedir (Satyanarayana vd., 2005; Tse ve Ma, 2016; Gontaales ve Aguvere, 2019 Shrestha vd., 2019;). Mikroorganizmalar tarafından tolere edilen çevresel ekstrem aralık diğer yaşam formlarından daha geniştir. Mikroorganizmaların büyüme ve yeniden üretilme limiti sıcaklık için -12 °C ve 100 °C'den daha fazla olabilirken, pH 0 ve 13 arasında değişmekte, hidrostatik basınç 1400 atm'ye kadar çıkabilmektedir (Satyanarayana vd., 2005; Shrestha vd., 2019).

Çoğu ekstremofil, mikrobiyal dünyada bulunurken; yaşamın üç domaininde de temsilci bulundurmaktadır (Satyanarayana vd., 2005; Shrestha vd., 2019).

Mikroorganizmalar yalnızca mikroskop altında görünür olabilen organizmaların topluluğu olarak tanımlanırken (Rybicki, 1990; Tse ve Ma, 2016); çıplak gözle fark edilebilecek 55 µm boyutunda olan nesnelere bile küçük boyutta olan bakteri, protoza, alg, mantar türlerini içermektedir (Keller ve Friedli, 1992; Tse ve Ma, 2016). Bu mikroorganizmalar düşük su aktivitesi ve yüksek radyasyon ya da ağır metal seviyesi gibi ekstrem koşullara dirençli olabilmekte ya da bu koşulları tolere edebilmektedir. Bu koşullar altında optimal olarak büyüyemeyenler ekstremotolerant ya da ekstremoresistant olarak ayrılmaktadır. Ekstremofiller şu gruplarda sınıflandırılmaktadır:

- Asidofiller (optimum büyüme pH 3 ve altı) (Johnson vd., 2006; Tse ve Ma, 2016),
- Alkalifiller (optimum büyüme pH 9 üzerindedir. Çoğunlukla pH 10 ve 12 arasındadır. Nötral pH ya da yakınında büyüyemez veya yavaş büyürler (Zhilina vd., 2004; Tse ve Ma, 2016),
- Psikrofiller (optimal büyüme sıcaklığı 15 °C ve altındadır. Maksimum büyüme sıcaklığı 20 °C altındadır) (Morita, 1975; Tse ve Ma, 2016),
- Termofiller (optimal büyüme sıcaklığı, 45 °C ve 80 °C arasındadır) (Kristjansson, 1991; Tse ve Ma, 2016),
- Hipertermofiller (optimal büyüme sıcaklıkları 80 °C üzerindedir. 90°C üzerinde büyüebilme yeteneğine sahiptirler) (Blumer-Schuetz vd., 2008; Tse ve Ma, 2016),
- Halofiller (0,3 M NaCl varlığının üzerinde optimal büyüme göstermektedirler) (DasSarma ve DasSarma 2012; Tse ve Ma, 2016),
- Piezofiller (optimal büyümeleri yüksek basınç altındadır, atmosferik basınçta büyüme hızlarının %30 daha fazlasında 50MPa basınç altında büyüebilmektedirler) (Abe, 2007; Tse ve Ma, 2016),
- Xerofiller (su aktivitesinin 0,85'in altında olduğu çevresel koşullarda optimal büyüme göstermektedirler) (Pitt ve Hocking, 2009; Tse ve Ma, 2016),
- Osmofiller (organik çözenlerin özellikle şekerlerin yüksek konsantrasyonunda optimal büyüme göstermektedirler) (Baross ve Lenovich, 1992; Tse ve Ma, 2016),
- Oligotroflar (aynı kültürde altkültür adilebilen ve 1-15 mg organik karbon/litre içeren kültür kullanılarak izole edilen organizmalardır.) (Poindexter, 1981; Tse ve Ma, 2016).

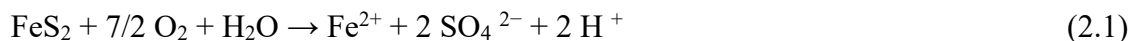
Ekstremotolerant ve ekstremoresistant olarak sınıflandırılan gruplar:

- Metallotolerantlar (kendi çevrelerinde yüksek konsantrasyondaki (>1mM) ağır metalleri tolere edebilmektedir) (Carapito vd., 2006; Tse ve Ma, 2016);

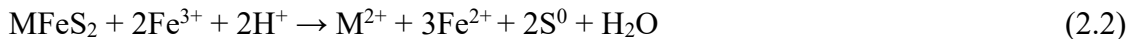
- Radyoresistantlar (sitosolik proteinleri spor formasyonsuz oksidasyondan koruyabilirler, yüksek iyonize radyasyondan sonra DNA çift zincir kırıklarını tolere edebilirler) (Sghaier vd., 2008; Tse ve Ma, 2016).

2.2. Asidik Habitatlar

Asit kaya drenajı (Acid Rock Drainage=ARD) asit ve ağır metallerin çevreye salınmasına neden olan doğal işlemlerin sonucudur. Kükürlü minerallerin atmosfere maruz kaldığı ve bu nedenle su ve oksijenle temas ettiği bölgelerde oluşmaktadır (Dold, 2017; Warren, 2011; Christel, 2018). Bu minerallerin bazılarının, örneğin piritin (FeS_2 , “yalancı altın-fool’s gold”) oksidasyonu ekzotermiktir ve ek bir enerjiye ihtiyaç duymadan kendiliğinden ilerlemektedir (Santos vd., 2016). Reaksiyonun nihai ürünü demir ve sülfürik asittir (Denklem 2.1).



Kireç, silikatlar veya karbonatlar minerallerin varlığıyla yeterince tamponlanmamışsa (Dold, 2017; Christel, 2018), çözünme reaksiyonu tarafından salınan protonlar güçlü bir asitleşmeye neden olarak çevreyi etkilemekte ve daha ciddi takip reaksiyonlarının yanı sıra çok çeşitli asidofillerin büyümesi için doğru koşulları sağlamaktadır. Bu mikroorganizmalar, ARD’nin en zararlı sonucu olan toksik ağır metallerin salınımını teşvik etmektedir. Asidofil Bakteri ve Arkelerin çoğu demir ve/veya kükürt bileşiklerinin oksidasyonu ile enerji açığa çıkarmaktadır. ARD bölgelerinde mineralden salınan ferröz demiri güçlü bir oksidan olan ferrik demire dönüştürdüğü için bu alanlar bu tür mikroorganizmalar için idealdir. Ferrik iyonlar, arsenik, bakır, çinko, kobalt vb. gibi çeşitli ağır metaller içerebilen daha stabil sülfür minerallerinin (Vera vd., 2013; Christel, 2018) sülfid kısmına saldırılmaktadır. Oksidasyona benzer şekilde, bu işlem mineralin kimyasal bağını kırmakta ve bileşenlerini iyon halinde bırakmaktadır. Reaksiyon sırasında, tüketilen her bir ferröz iyon için bir veya daha fazla ferrik demir iyonu üretmektedir ve mevcut asidofillerin sırayla tekrar oksitlenerek bir zincir reaksiyonu başlatarak asit ve metallerin salınımını kuvvetlendirmektedir (Denklem 2.2).



“Asit Maden Drenajı” (AMD), madencilik esnasında mikrobiyal kaynaklı piritin oksidatif ayrışarak diğer kükürtlü mineralleri ile birlikte su ve havaya karışması sonucunda dünya genelinde çevresel bir problem olarak öne çıkmaktadır. Drenaj suları, ekstrem asitlik, toksik metal ile sülfatların yüksek konsantrasyonda olması ile karakterizedir ve yaşam için ekstrem çevreler arasında sınıflandırılmaktadır. Buna karşın, çoklu çevresel streslere adapte olan asidofil mikroorganizmalar için metabolik olarak aktif olabilecekleri tek habitat olarak bilinmektedir. AMD çevrelerin önemi, iyi tanımlanacak mikrobiyal konsorsiyumların çalışmaları için model sistem olmalarıdır. Özellikle, nispeten düşük tür zenginliği, sınırlı kaynak çeşitliliği ve AMD sistemlerinin biyolojik ve jeokimyasal süreçleri arasındaki sıkı bağlanma, mikrobiyal ekoloji ve topluluk işlevinin niceliksel, genomik tabanlı analizleri için asidik habitatları ideal hedefler haline getirmektedir. Dahası, AMD’de oluşan mikroorganizmalar genel olarak doğasında olan mikroçeşitlilikle birlikte yaşayan popülasyonlar olarak ortaya çıkmaktadır (klonal popülasyon değildir, doğal ekosistemdeki tipik olgudur). Bu azaltılmış karmaşıklıkta sistemler, yakından ilişkili suşlar içinde genomik heterojenliği çözmek ve ekolojik ve evrimsel süreçler, daha karmaşık mikrobiyal topluluklardaki modelleri tahmin edebilmek için özel bir fırsat sunmaktadır (Huang vd., 2016). AMD ilişkili mikroorganizmalar asit drenaj suları, sedimentler, mikrobiyal makroskopik oluşumları içeren mikroçevrelerde gelişmektedir (Mendez-Garcia vd., 2015; Huang vd., 2016). Mikrobiyal makroskopik oluşumlar AMD bölgelerinin %30’unda görülen karakteristik bir özelliktir (Mendez-Garcia vd., 2015). AMD ilişkili mikrobiyal komünitenin şekillenmesinde en etkili çevresel faktörler arasında pH sıcaklık, çözünmemiş metal konsantrasyonları, diğer çözülmüş maddeler, toplam organik karbon ve çözünmemiş oksijen yer almaktadır (Mendez-Garcia vd., 2015).

AMD, genellikle terk edilmiş maden bölgelerinden çıkan asit ile ilgilidir. AMD’ye neden olan kimyasal reaksiyonlar kapsamlı olarak tanımlanmış ve kendi içinde gelişen kemolitotroflar, maden ilişkili sızıntı suların asidifikasyonunda birinci derece sorumlu tutulmaktadır. AMD’deki mikrobiyoya iyi belirlenmiş sınırlara ihtiyaç duymaksızın nişlerde bulunmaktadır (Mendez-Garcia vd., 2015).

Günümüzde, bu asit madeni drenajının (AMD) (Hoffert, 1947; Younger, 2017; Christel 2018) çevresel etkisi, doğal ARD'nin (Quatrini ve Johnson, 2018; Christel, 2018) büyümesini engellemekte ve daha önce yeraltındaki mineral içeriğinden etkilenmeyen bölgeleri kirletmektedir (Blowes vd., 2003; Christel, 2018).

Asit sülfat toprakları (Acid sulphate soils=ASS), genellikle büyük cevher kütlelerine bağlı olmamalarına rağmen, ARD ile aynı kimyasal prensipte olan sülfür taşıyan minerallerin oksidasyonu ile oluşmaktadır. ASS'ler, anaerobik sediment bölgelerinde demir oksitlerle birlikte sülfürün deniz suyundan mikrobiyal reaksiyonu sonucunda oluşan, pirit gibi ince metal sülfür taneleri içeren eski deniz sedimentlerinden meydana gelmektedir (Bloomfield ve Coulter, 1974; Christel, 2018). Bu tür birikintiler potansiyel asit sülfat toprakları (PASS'ler) olarak tanımlanmakta ve sadece küçük alanları işgal etmektedir. Dünya genelinde yaygındır ve Antartika hariç tüm kıtalarda pek çok alçak kıyı bölgeleri içermektedir (Michael, 2013; Christel, 2018). PASS'ler su altında kaldıklarında ve hava ile temasta olmadıkları sürece çevresel bir problem oluşturmazlar. Sulak alanların drenajı veya büyük kazılar gibi insan faaliyetleri de ASS'den etkilenen alanları önemli ölçüde genişletmiştir (Minh vd., 1997; Christel, 2018). Antropojenik iklim değişikliğinin neden olduğu öne sürülen kuraklık oluşumunun artması, aynı zamanda topraklardan mevsimsel asit salınmasına da katkıda bulunmaktadır (Fitzpatrick vd., 2017; Christel, 2018).

Kıtasal fay hatları, gezegensel kabuğun kalınlığı azaltılmış veya parçalanmış diğer yerleri yalnızca görkemli volkanlar olarak ortaya çıkarmaz, aynı zamanda derin yeraltı suyunun magma ve sıcak ana kaya ile temas etmesine izin vermektedir. Bu, daha sonra fumarol olarak adlandırılan jeotermal faaliyetlerle yüzeye çıkarılabilen aşırı ısıtılmış su ve buhar oluşumuna yol açmaktadır. Sülfür mineral içeriği yüksek alanlardaki fumarol alanları genellikle aşırı ısıtılmış su ile birlikte sülfür gazları yaymakta ve sonuç olarak kükürt kaynağı olarak adlandırılmaktadır. H_2S ve SO_2 gibi volkanik gazlar yüksek oranda reaktiftir ve birbirleriyle reaksiyona girdiklerinde temel sülfür üretebilmektedir (Dopson ve Johnson 2012). Kükürt oksitleyici Bakteriler veya Arkeler varlığında, oluşan S^0 biyolojik olarak sülfürik aside oksitlenmektedir. Ayrıca, SO_2 'nin su içinde çözünmesi sülfüroz asit (H_2SO_3) oluşturmaktadır. Her iki işlem de güçlü çevresel asitleşmeye yol açabilmekte, bazı yerlerde pH değerleri 1'den düşük olmaktadır (Schleper vd., 1995; Seegerer vd., 1986; Christel, 2018). Bu durum, en fazla 100 ° C'lik yüksek sıcaklıktaki kaynakları, kükürt kaynaklarına özellikle

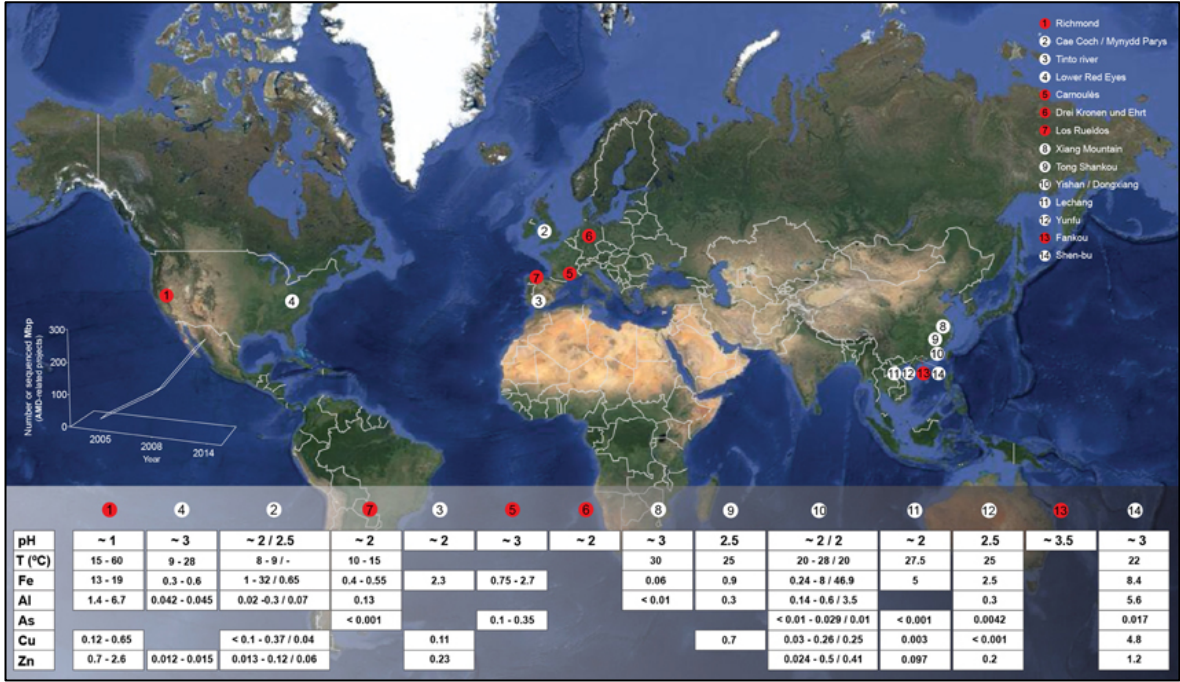
(hiper)termofilik asidofil Arkelere ve optimum düşük sıcaklıklı bakterilere ideal yaşam yapmaktadır (Hedrich ve Schippers, 2016; Christel, 2018)

2.3. Asidofil Mikroorganizmalar

2.3.1. AMD sistemlerinde mikrobiyal çeşitlilik

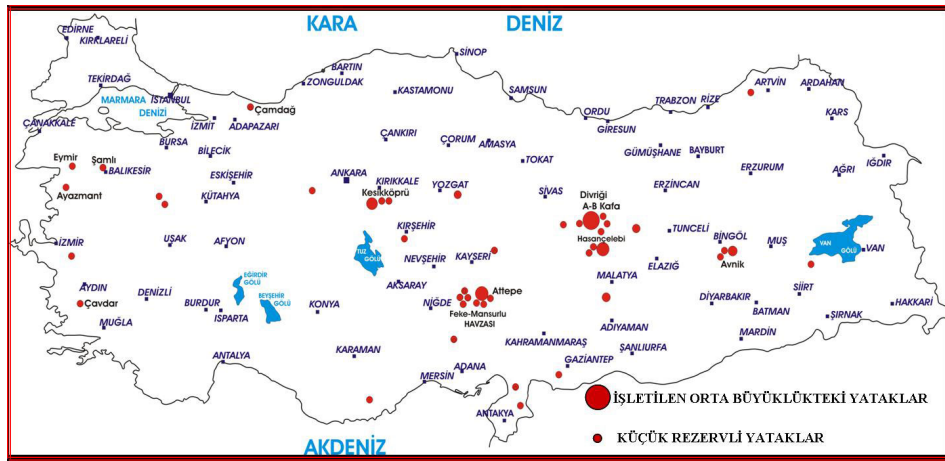
Asidofil bakteriler ve arkelerin tanınmış çeşitliliği, Waksman ve Joffe (1922) tarafından *Acidithiobacillus thiooxidans*'ın keşfedilen ilk asidofil olmasından bu yana istikrarlı bir şekilde artmıştır. 1990'ların ortasından bu yana, çeşitli coğrafi bölgelerdeki asidik ortamlardaki mikroorganizmaların topluluk yapısı ve çeşitliliği, 16S rRNA gen klon kütüphaneleri ve gruba özel floresan in situ hibridizasyon (FISH) dahil olmak üzere kültürden bağımsız yaklaşımlar kullanılarak araştırılmıştır (Goebel ve Stackebrandt, 1994; Edwards vd., 1999; Bond vd., 2000; Gonzalez-Toril, 2003). Daha ileri çalışmalar, özellikle yüksek çıktılı dizileme teknolojilerini uygulayarak AMD mikroorganizmalarının ekolojik dağılımını incelemiş ve kontrol etmişlerdir (Kuang vd., 2013; Liu vd., 2014; Volant vd., 2014). Komünite genomik ve postgenomik yöntemlerin ve ilgili biyoinformatik araçların geliştirilmesi ve uygulanması, bu olağanüstü mikrobiyal topluluklar içindeki genetik ve işlevsel dinamiklerin araştırılmasında yeni bakış açıları getirmiştir. Bu araştırmalar, ekstrem AMD bölgelerinde gelişen mikroorganizmaların topluluk yapısını, işlevini ve evrimini daha iyi anlamalarına yardımcı olmuştur (Huang vd., 2016).

Çalışılan AMD bölgelerindeki gözlemlenen mikrobiyal çeşitlilik, öncelikle Bakteri, Arke ve daha az ölçüde Ökaryot (baskın olarak mantar ve alg) domainlerine ait organizmaları içermektedir. AMD yaşam alanlarının mikrobiyal ekolojileri açısından kapsamlı olarak incelendiği araştırma alanları arasında Tinto Nehri (SW İspanya), Iron Mountain'daki Richmond Madeni (CA, ABD), İngiltere'de Cae Coch (pirit) ve Mynydd Parys (bakır) madenleri, Fransa'daki Carnoulès (kurşun-çinko) madeni, Almanya'daki Drei Kronen ve Ehrt (pirit) madeni, ve İspanya'daki Los Rueldos civa madeni sayılmaktadır. Diğerleri mikrobiyolojilerinin tanımlayıcı bir özetini oluşturmak için araştırılmıştır. Dünyada çok sık çalışılan yukarıda isimleri verilen maden bölgeleri ve özelliklerinin gösterildiği harita Şekil 2.1'de verilmektedir.



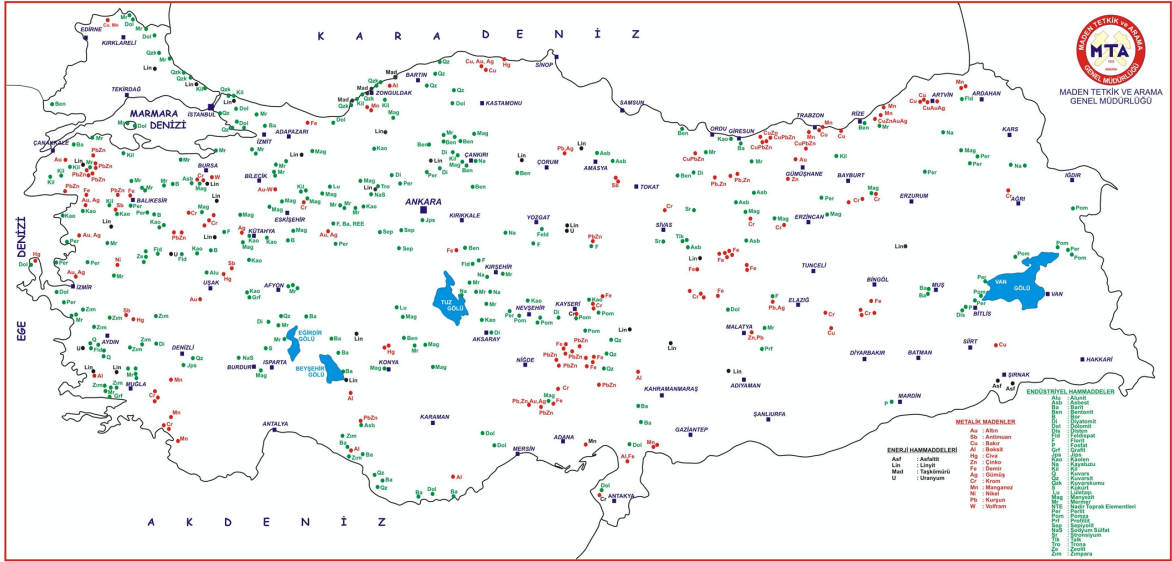
Şekil 2.1. Karakterize edilmiş AMD yerleşimleri ve jeokimyasal özellikleri (Mendez Garcia vd., 2015)

Ülkemiz demir rezervleri, Sivas, Malatya, Bingöl, Adana, Kayseri illerinin yer aldığı bölgede daha yoğun olarak yer almaktadır. Ankara, Balıkesir ve Adapazarı bölgelerinde yer yoğun bulunan bölgelerin yanında alan değişik büyüklüklerde demir cevheri rezervleri bulunmaktadır (Şekil 2.2) (MTA, 2017).



Şekil 2.2. Türkiye’de yer alan işletilen ve işletme potansiyeli olan demir yatakları

Demir rezervleri dışında ülkemizde bulunan metalik madenler, enerji ve endüstriyel hammaddelerin yer aldığı maden yataklarının gösterildiği bölgeler Şekil 2.3'te gösterilmektedir. Metalik madenler arasında, altın antimuan bakır civa asfaltit linyit taşkömürü uranyum çinko demir gümüş krom manganez nikel kurşun volfram madenleri kırmızı ile belirtilmiştir.



Şekil 2.3. Türkiye’de bulunan Maden Yatakları (MTA, 2017)

Türkiye’de bu maden yataklarının mikrobiyal komünite belirleme çalışmaları Kastamonu-Küre bakır madeni, Balıkesir-Balya Çinko ve Kurşun Madenler, Çan-Çanakkale Demir madenleri, İzmir-Halıköy Civa madenlerinde yapılmıştır.

2.3.1.1. Bakteri çeşitliliği

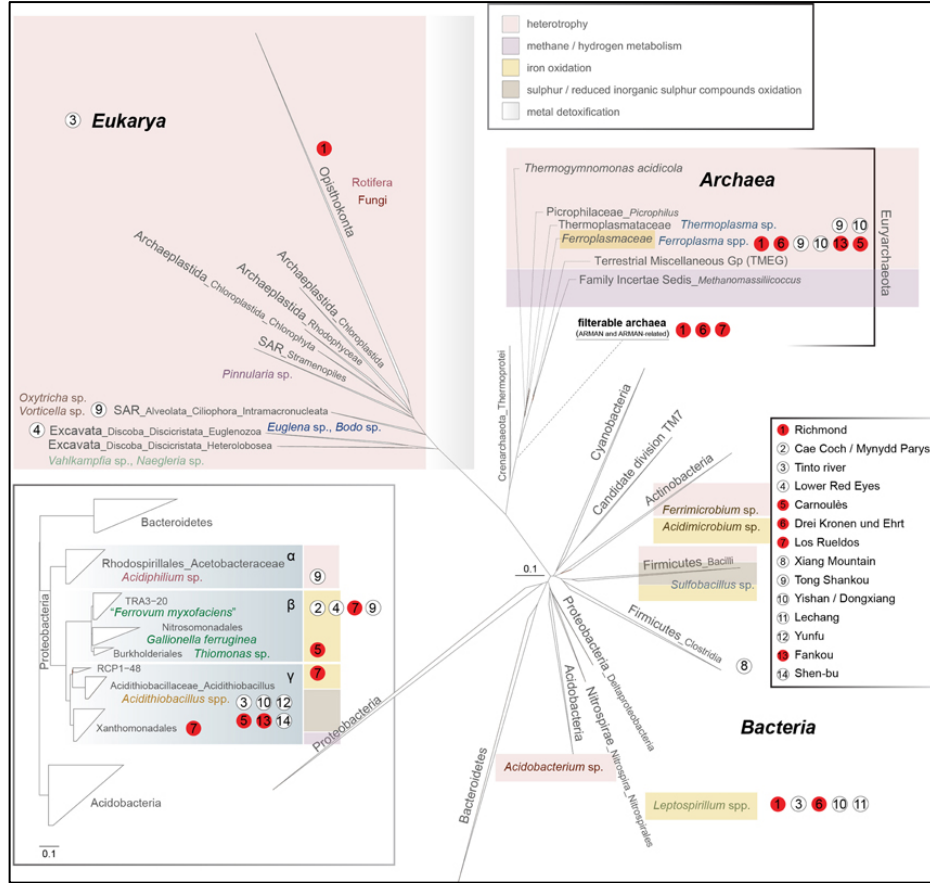
Şekil 2.1’de verilen çevrelerdeki asid drenaj suları, sedimentler ve AMD sistemleri ile ilişkili makroskopik oluşumlarda yaşayan bakteriler *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, ve *Acidobacteria*, *Aquificae* veya *Verrucomicrobia* filumlarında yer aldığı belirtilmiştir (Dopson, 2016; Mendez Garcia vd., 2015). Bu çevrelerde yaşadığı tespit edilen türlerin ayrıntılı dağılımı Şekil 2.4’te verilmektedir (Mendez Garcia vd., 2015).

Proteobacteria, asidik çevrelerde geniş dağılım göstermektedir (Mendez Garcia vd., 2015). En önemli asidofil mikroorganizmalardan biri, *Proteobacteria* şubesindeki

Acidithiobacillia sınıfındaki (Williams ve Kelly 2013; Christel, 2018), şimdiye kadar izole edilmiş ilk asidofili içeren *Acidithiobacillus* cinsidir. Bu tür başlangıçta *Thiobacillus thiooxidans* olarak tanımlanmış, ancak o zamandan beri yeniden sınıflandırılmıştır (Kelly ve Wood, 2000; Christel, 2018). Yoğun bir şekilde araştırılmasına rağmen, en belirgin şekilde incelenen asidofillerin çoğu dahil olmak üzere, cins içinde şu anda yedi ayrı tür tanımlanmıştır: *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus ferridurans*, *Acidithiobacillus ferriphilus*, ve *Acidithiobacillus albertensis* (Nuñez vd., 2017; Christel, 2018). Kemolitotrof metabolizmasına sahip olan bu bakteriler oksik koşullar altında Fe^{+2} ve sülfür bileşenlerini (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferridurans*, ve *Acidithiobacillus ferrivorans*) ya da yalnızca sülfür bileşenlerini (*Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, ve *Acidithiobacillus albertensis*) okside edebilme yeteneğine sahiptir. *Acidithiobacillus ferrooxidans* CO_2 ve atmosferik nitrojen fiksasyonunda rol oynamaktadır (Valdes vd., 2008; Mendez Garcia vd., 2015). Bu türlerin tümü, enerji üretimi için oksijenin azalmasına bağlı elementel kükürt ve diğer inorganik kükürt bileşiklerini (ISC'ler) oksitleyebilen gram negatif, çubuk şeklinde ototroflardır (Christel, 2018).

Acidiphilium, α -Proteobacteria içinde bulunmakta ve *Acidocella*'yı (Kishimoto vd., 1995; Christel, 2018) oluşturmak için iki üyenin yeniden sınıflandırılmasıyla bölünmesine rağmen Proteobacteria filumundaki ikinci en büyük asidofil mikroorganizmadır. Cinsin kalan türleri arasında *Acidiphilium acidophilum*, *Acidiphilium cryptum*, *Acidiphilium angustum* ve *Acidiphilium rubrum* bulunmaktadır. *Acidiphilium* spp., elektron alıcı olarak hem oksijen hem de ferrik demir kullanarak enerjilerini oksitleyici organik substratlardan veya bazı durumlarda ISC'lerden elde eden gram negatif, hareketli çubuklardır. *A. Acidophilum* bu cinsin ototrofik olarak karbon elde edebilen tek üyesidir (Coupland ve Johnson 2008; Guay ve Silver 1975; Christel, 2018). Bu tür daha önce *Thiobacilli*'ye (şimdi *Acidithiobacilli*) atanmıştı, çünkü ayırt edilemez bir sembiyozda her iki türün çoğaldığı daha önce tamamen *Acidithiobacillus ferrooxidans*'tan oluşan bir kültürden izole edilmiştir (Harrison, 1984; Liu vd., 2011; Christel, 2018). *Acidiphilium* spp. Diğer pek çok organoheterotrofik asitofilin gibi hafif asitli nişlerle sınırlı değildir (Jones vd., 2013; Christel, 2018). Optimum 3,5 olarak rapor edilen ancak nötral pH 6'dan ekstrem asidik pH 1 aralığına kadar yaklaşık $25^{\circ}C - 40^{\circ}C$ sıcaklıklar arasında sınıflandırılmaktadır (Delabary

vd., 2017; Kishimoto vd., 1995). Bu değişkenlik onları çok çeşitli asidik ortamlarda en sık karşılaşılan organoheterotroflar yapmaktadır (Hamamura vd., 2005; Kay vd., 2013; Wichlacz vd., 1986; Christel, 2018).



Şekil 2.4. AMD sistemlerindeki mikrobiyal çeşitliliğin 16S rRNA gen bölgesi tabanlı filogenisi (Mendez Garcia vd., 2015)

Spesifik taksonomik bağlantılara sahip olmayan *Betaproteobacteria*, daha az kısıtlayıcı pH ve ağırlıklı olarak sıcaklık koşullarında bulunmaktadır. Demir okside eden *Betaproteobacterium* "*Ferrovum myxofaciens*" yüksek miktarda ekzopolisakkarit üretmektedir (Johnson vd., 2014). North Wales'deki iki maden bölgesinde (Hallberg vd., 2006; Kimura vd., 2011) ve Königstein uranyum madenlerinde (Brockmann vd., 2010) *Ferrovum myxofaciens* 'in şerit tip makroskopik oluşumda ağırlıklı olarak bulunduğu rapor edilmiştir.

Ferrovum myxofaciens P3G draft genomu glikoliz ve TCA döngüsünden sorumlu enzimleri kodlayan gen dizilerini içermektedir ve fakültatif heterotorof olabileceği önerilmektedir. *Nif* genlerinin tüm setlerinin varlığı atmosferik nitrojeni fikse edebileceği fikrini doğurmuştur (Moya-Beltran vd., 2014). Karbon fiksasyonu için RuBisCO ve fosforibulokinaz (*prkB*) enzimlerini kodlayan genlerin, “*Ferrovum* spp.” Popülasyonunda yüksek oranda eksprese olduğu gözlenirken, nitrojen fiksasyonu ile ilişkili genler saptanmamıştır. Bununla birlikte, üre yıkımı ve nitrat redüksiyonu ile ilgili genlerin ekspresyonu, alternatif azot kaynaklarının kullanıldığı bilgisini önermektedir (Hua vd., 2014). Carnoulès kurşun-çinko madeninde bulunan bazı *Betaproteobacteria*, nötrofilik demir oksitleyici *Gallionella ferruginea* ile yakından ilişkilidir. *Gallionella* ilişkili demir oksitleyiciler de, Almanya'nın Ronneburg kentindeki eski uranyum madenciliği bölgesinde (Fabisch vd., 2013) ve Çin'in Yunfu (He vd., 2007) sülfür madenindeki metalle kirlenmiş derelerde yaygın olarak gözlemlenmiştir. Diğer madenlerde *Thiomonas* sp. (Storwartz, Ynysarwed ve Parys Mountain madenleri), *Ralstonia* sp. (Tinto River, Shen-bu mine), ve *Acidovorax* sp. (Tong Shankou ve Yinshan madenleri) gibi heterotrof kabul edilen mikroorganizmaları içermektedir.

Thiomonas spp. fakültatif kemolitotroftur, optimal büyüdükleri mikstrotrofik kültür ortamı indirgenmiş sülfür bileşenleri ve organik katkılar içermektedir. *Acidiphilium* (demir indirgeyen *Alphaproteobacterium*) cinsi bakterilere sıklıkla AMD ortamlarında rastlanmaktadır. *A. Acidophilum*, *At. ferrooxidans* ile heterotrofik büyüebilmekte ve onun büyümesini desteklemektedir. AMD sistemlerindeki heterotroflar, birincil üreticilere toksik olabilecek organik bileşenleri (lizat, ekzodat) gidererek demir okside eden bakterilerin büyümesi için uygun çevre yaratmaktadır (Mendez Garcia vd., 2015).

Ayrıca bakteriyel asidofiller içindeki büyük öneme sahip olanlar, sarmal şekilleriyle nitelenen Nitrospirae cins *Leptospirillum*'un üyeleridir. *Acidithiobacilli*'ye benzer şekilde, gram negatif, ototroftiktir ve çoğu suş azot fiksasyon yeteneğine sahiptir (Christel vd., 2017; Parro ve Moreno-Paz, 2004; Christel, 2018; Mendez Garcia vd., 2015). Ayrıca, yaklaşık 30° C -45 ° C arasında biraz daha yüksek sıcaklık aralıkları olmasına rağmen, benzerlerini tercih etmektedir (Schrenk vd., 1998). Leptospirilli genellikle, pH'ı, *Acidithiobacilli*'ye (Hippe 2000) kıyasla 1-1.6 arasında düşüktür ve enerjisini yalnızca demirin aerobik oksidasyonu ile kazanır (Coram ve Rawlings, 2002; Christel, 2018). Demir oksidasyon sistemleri oldukça

etkilidir ve diğer demir oksitleyicilerin çoğu ile rekabet etmelerini sağlamaktadır (Rawlings vd., 1999). Bu nedenle, *Leptospirillum* spp. Genellikle, çok düşük pH ve yüksek metal konsantrasyonlarına sahip ortamlarda mikrobiyal popülasyonun büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Tanınan üç tür cins içinde bulunmaktadır; *Leptospirillum ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum* ve *Leptospirillum rubarum* (Mendez-Garcia vd., 2015).

Demir oksitleyebilen, heterotrofik *Actinobacteria* (*Ferrimicrobium* spp. ve *Acidimicrobium* spp.), bu ortamlarda yaygın olarak gelişen mikroorganizmalar arasındadır. *Ferrimicrobium acidiphilum*, çözülmüş organik karbonu metabolize ederek bu tür sistemlerde mevcut ototrofların gelişmelerini sağlamaktadır (Mendez-Garcia vd., 2015).

Her yerde bulunan *Acidobacteria* (esas olarak topraklarda bulunmaktadır) nispeten ılımlı asidik maden drenajı ile etkilenen ortamlarda gelişmektedir. Bu şubeye ait analiz edilen birkaç izolat, ağırlıklı olarak heterotroftur. Fototrofi ve sıkı anaerobiyoz da bu grupta ortaya çıkmaktadır (Ward vd., 2009; Mendez-Garcia vd., 2015). AMD sistemlerinde bulunan en yaygın cins, mezofildir (2 ila 42 °C sıcaklık aralığı, optimum 30–35 °C), zorunlu heterotrof *Acidobacterium*'dur.

Sulfobacillus cinsi, filum Firmicutes'da bulunmakta ve tanımlanmış beş tür içermektedir: *Sulfobacillus acidophilus*, *Sulfobacillus sibiricus*, *Sulfobacillus benefaciens*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* ve *Sulfobacillus thermotolerans*. Bu organizmaların tümü, 45° C -55° C büyüme sıcaklıklarını ve 1.5 ila 2.5 arasında bir pH'ı tercih ettikleri için orta derecede termofiliktir (Golovacheva ve Karavaiko, 1978; Christel, 2018).

Sülfat indirgeyen bakteriler (SRB), sülfatı son elektron alıcısı olarak kullanan ve ATP sentezine anaerobik elektronun taşınmasını sağlayan fizyolojik olarak eşsiz kemoorganotrof veya kemolitotrof mikroorganizmalardır (Barton ve Fauque, 2009; Mendez-Garcia vd., 2015). Optimum pH'ı 5'ten büyük olan AMD çözeltilerinde kısmen asidofil bakterilerin sınırlı varlığı, bu ortamlara özgü yüksek asitlik ve metal konsantrasyonları ilişkilidir (Cabrera vd., 2006; Mendez-Garcia vd., 2015). AMD ile etkilenen bölgelerdeki uzun dönemli AMD (Moreau vd., 2010), sülfidik maden atıkları (Wielinga vd., 1999; Fortin vd., 2000; Bruneel vd., 2006; Diaby vd., 2007; Mendez-Garcia

vd., 2015), asidik maden suları ve sedimentlerinden (Rowe vd., 2007; Sanchez-Andrea vd., 2012; Giloteaux vd., 2013; Mendez-Garcia vd., 2015) asidofil veya asit toleranslı SRB izole edilmiştir. SRB, *Deltaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Thermodesulfobacteria* ve bazı arkael taksona ait olabilir, ancak AMD bölgelerindeki varlıkları, demir indirgeme yeteneğine de sahip *Deltaproteobacteria* ve *Firmicutes* ile sınırlıdır (Bond vd., 2000; Baker ve Banfield, 2003; Mendez-Garcia vd., 2015).

Yakın ilişkili bir diğer cins, iki üyesi orijinal olarak Sulfobacilli olan (*Alicyclobacillus disulfidooxidans* ve *Alicyclobacillus tolerans*) *Alicyclobacillus*'tur. *Alicyclobacilli*, meyve suyu endüstrisinde en yaygın gıda bozulma nedeni olan 22 gram pozitif endospor oluşturunun büyük bir topluluğudur (Silva ve Gibbs 2004; Christel, 2018). *Alicyclobacilli* farklı pH değerlerinde çoğalır, en uç *Alicyclobacillus disulfidooxidans* için 0.5-6 arasındadır (Karavaiko vd., 2005; Christel, 2018). Aynı şekilde, cins, geniş sıcaklık aralıklarında yaşamakta ve çoğu orta derecede termofilik koşullarda en iyi şekilde yetişmesine rağmen soğuk adapte edilmiş, mezofil ve termofil türlerinden oluşmaktadır (Ciuffreda vd., 2015; Christel, 2018). Birçok *Alicyclobacillus* spp zorunlu organoheterotrof iken., bazıları Sulfobacilli'ye benzer metabolik özellikler göstermektedir. Örneğin, *Alicyclobacillus aeris*, *Alicyclobacillus ferrooxidans* ve *Alicyclobacillus contaminans* tümü, organik substratlarda daha hızlı büyümesine rağmen, demir ve ISC oksidasyon yeteneğine sahiptir (Goto vd., 2007; Guo vd., 2009; Jiang vd., 2008; Christel, 2018)

Asidofilleri içeren son iki bakteri filumunun her biri, bilinen tek bir termofilik asidofilden oluşmaktadır. *Hidrojenobaculum acidophilum* filum Aquificae'ye aittir ve 65 °C sıcaklıklarda en iyi şekilde büyümektedir. Elementel kükürt varlığında H₂'nin oksidasyonundan enerji alan zorunlu bir aerobik ototrofidir. pH 3-4'te optimum özellik göstermesi ekstrem bir asitofil tanımından biraz daha yüksektir (Stohr vd., 2001; Christel, 2018). İkinci tür ise, Tikitere, Yeni Zelanda'daki jeotermal bölgesinden izole edilen *Methylacidiphilum infernorum*'dur. 60 ° C'lik alışılmadık derecede yüksek büyüme sıcaklığı olan asidofiller için ek olarak, bu tür aynı zamanda tek asidofil metanotroftur (Dunfield vd., 2007; Christel, 2018).

2.3.1.2. Arke çeşitliliği

Düşük ve orta sıcaklıktaki ortamlarda genellikle Bakteriler dominant hale geldiği için, yüksek sıcaklıklar çoğunlukla Arkelerin yaşam alanıdır. Bu alanın bazı mikroorganizmaları, suyun kaynama noktasına yakın veya hatta yukarısında optimum büyüme sergilemektedir ve dünyanın en pH toleranslı yaşam formlarının çoğu Arke domaininde bulunmaktadır (Baker-Austin vd., 2010; Futterer vd., 2004). Optimum yaşama koşullarını bu kadar ekstrem olması bakterilerden farklı olarak sahip oldukları yüksek derecede geçirgen olmayan hücre zarları gibi ayırt edici özel adaptasyonlara atfedilmektedir. (Baker-Austin ve Dopson, 2007; Macalady vd., 2004). Halen tanınmış olan arkeal asidofiller, domainin iki düzeninde, sırasıyla Crenarchaeota ve Euryarchaeota'ya ait olan *Sulfobales* ve *Thermoplasmatales*'te bulunur (Golyshina vd., 2016). Crenarchaeota asidofiller sadece termo ve hipertermofiller olsa da, Euryarchaeota orta dereceli termofil sınırları içerisinde düşük sıcaklıkları tercih etmektedir. Her iki filumun üyeleri, Yellowstone Milli Parkı (ABD), Pozzuoli (İtalya) veya Krisuvik (İzlanda) gibi volkanik veya jeotermal faaliyetlerle şekillendirilen ortamlardan ve ayrıca deniz jeotermal alanlarından izole edilebilmektedir.

Euryarchaeota filumuna ait *Thermoplasma* cinsi tarif edilen iki üyeyi içermektedir: *Thermoplasma acidophilum* ve *Thermoplasma volcanium*. Her iki tür de pH 2'de en uygun şekilde büyümekte, ancak 60 °C sıcaklıklarda pH değerlerini 0.5 kadar düşük pH'ları tolere edebilmektedir (Seegerer vd., 1988). Enerji metabolizması, oksijenin azalmasına bağlı kompleks organik moleküllerin oksidasyonunu içermektedir. Ek olarak, *Thermoplasma* spp. elektron alıcısı olarak elementel sülfür kullanılarak fakültatif anaerobik büyüme kabiliyetine sahiptir. İlginç bir şekilde, cinsin her iki üyesi bir hücre duvarına sahip değildir ve sadece tek bir üç katmanlı tetraeter membranı ile örtülür (Langworthy, 1982). Ek olarak, 1.56 Mbp ile *Thermoplasma acidophilum*, serbest yaşayan bir organizma için dizilenmiş en küçük genomlardan birini sergilemektedir (Ruepp vd., 2000).

AMD bölgelerinde *Thermoplasmatales* şubenin en bol bulunan cinsi optimum sıcaklığı yaklaşık 40 °C, optimum pH'sı ise 1,2-1,7 arasında olan demir okside eden hiper asidofil mikroorganizmalardan *Ferroplasma* 'dır. *Acidiplasma* ve *Ferroplasma* cinsleri çok benzer özellikler göstermektedir. Büyüme aralığı, optimum pH 1-1.5 ile pH 0-4 arasındadır.

Termoplasma'ya benzer şekilde, bu cinsin hiçbir üyesi hücre duvarı oluşturmaz, ancak yalnızca tetraetherlipid membranlara dayanmaktadır. *Ferroplasma acidophilum* ve *Ferroplasma acidarmanus*, ferröz demiri organik bileşiklerle birlikte oksitleyen ve elektron alıcısı olarak oksijen veya ferrik demir kullanan fakültatif anaeroblardır (Dopson vd., 2004).

Ferroplasma acidiphilium Y suşunun demir protein baskın hücresel organizasyon içerdiği rapor edilmiştir (Ferrer vd., 2007; Ferrer vd., 2008). Benzer şekilde, Asidiplazma *cupricumulans* ve *Acidiplasma aeolicum*, ferrik demir kullanarak anaerobik büyüme kabiliyetine sahiptir, ancak hücre büyümesi, ferröz demir veya organik substratların aerobik olarak oksitlenmesi sırasında oldukça hızlıdır (Golyshina vd., 2009). *Acidiplasma* spp. 35-45 °C 'deki *Ferroplasma*'ya kıyasla 45-55 ° C gibi biraz daha yüksek sıcaklıkları tercih etmektedir. Her iki cins de yalnızca organik karbon kaynaklarını özümseyebilmektedir (Christel, 2018).

Crenarchaeota'lar içerisindeki *Sulfolobus* cinsi keşfedilen asidofil arkeal klavuzlar içinde en iyilerinden biridir. Sekiz adlandırılmış türü (Quehenberger vd., 2017) ve sayısız tanımlanamayan suşları içermektedir. Tüm *Sulfolobus* spp termo veya hipertermofillerdir, 65 °C'den (*Sulfolobus metallicus*), 75 °C üzerine (*Sb. acidocaldarius*) ve 85 °C üzeri (kalan türler) optimum sıcaklık olarak kullanılmaktadırlar. *Sb. yangmingensis* büyüme sıcaklığı olarak 95 °C yi, cinsin kalan üyeleri için optimal pH 2-3 aralığında olsa da 4'ü optimum pH olarak tercih etmektedir (Ren-Long vd., 1992). Sulfolobi'nin çoğu (*Sb. metallicus*, *Sb. shibatae* veya *Sb. tokadaii*) ama tümü değil, kükürt bakımından zengin solfatarik ortamlarda yaşamakta ve mevcut ISC'leri oksijeni azaltmak için bir enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Birçok asidofil bakteriye benzer şekilde, moleküler hidrojen bu türler için bir elektron donörü olarak da işlev görebilmektedir (Huber vd. 1992). Bununla birlikte, *Sulfolobus* spp. *Sb. metallicus* hariç organik moleküllere tamamlayıcı enerji için ve bir karbon kaynağı olarak ihtiyaç duymaktadır. *Sb. metallicus* zorunlu kemolitototroftur ve sadece ferröz demirlerin ve ISC'lerin oksidasyonu ve inorganik CO₂'nin sabitlenmesi yeteneğine sahiptir (Huber ve Stetter, 1991).

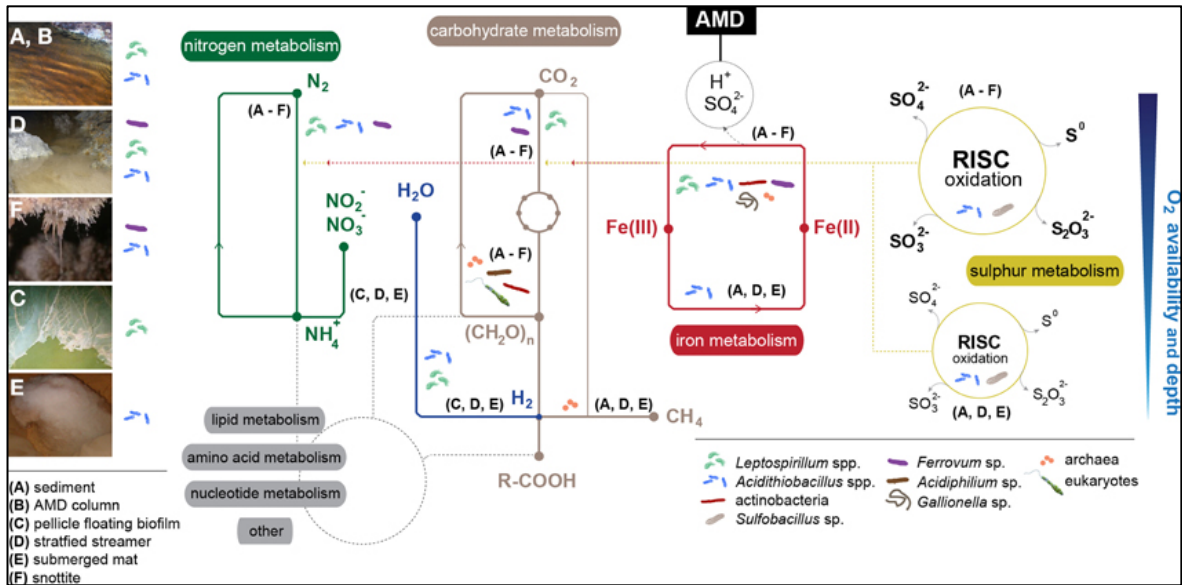
2.3.2. AMD sistemlerinde metabolizma ve element dönüşümü

Genel metabolizması demir ve kükürt oksidasyonu/indirgenmesi olan kemolitotrofik mikrobiyal topluluğun varlığı AMD'lerin kimyasal içeriği ile desteklenmektedir (Şekil 2.5).

Makroskobik mikrobiyal büyüme geliştiğinde, sistemin genel metabolizmasında heterotrofi de önem kazanmaktadır. Mikroorganizmaların metabolik yeteneklerine dayanarak yapılan AMD çalışmalarında mikrobiyal türlerin demir, kükürt, azot, karbon ve oksijeni metabolize etme kapasiteleri araştırılmıştır. Bununla birlikte, sadece birkaç çalışma, AMD sistemlerinde bu elementlerin alt döngüsünü tanımlamıştır. Önemli örnekler, biyomoleküler ve kültürasyon temelli metodolojiler kullanılarak ve daha yakın zamanlarda omik temelli yaklaşımların da eklenmesi ile demir ve kükürt döngüsü için çeşitli modeller önerilmektedir (Mendez Garcia vd., 2015).

Asidofil mikroorganizmalar enerji ihtiyaçlarını yalnızca ferröz demiri (Fe^{2+}), indirgenmiş ISC'ler, H_2 ve / veya organik karbon bileşiklerini (Quatrini ve Johnson 2018; Christel, 2018) oksitleyerek kemotrofik olarak karşılamaktadır. Bu moleküllerden veya iyonlardan ekstrakte edilen elektronlar, şimdiye kadar O_2 , ferrik demir (Fe^{3+}) ve sülfat içeren ISC'ler ile sınırlı görünen son elektron alıcılarına aktarılmaktadır. Bir elektron vericinin oksidasyonu ve bir elektron alıcısının indirgenmesinden elde edilen enerji miktarı, bir galvanik (redoks tepkimesi ile elektrik akımı sağlayan bir elektrokimyasal hücre) hücrenin iki yarısı olarak kendi standart redüksiyon potansiyelleri kullandığı tahmin edilebilmektedir. İki yarım hücre arasındaki voltaj farklılığından ATP elde etmek için proton motiv güç (PMF) olarak toplanabilen iki reaksiyonun birleştirilmesiyle salınan serbest enerji ile orantılıdır veya ATP elde etmek için kullanılan NADH üretimi ile hücre içinde çok sayıda reaksiyonda. PMF, elektronların substrattan son elektron alıcısına taşınmasıyla protonların sitoplazmadan çıkması ile birleştirilerek üretilmektedir. Böylece hücre zarının dış tarafında, transmembranal ATPazlar tarafından kullanılacak bir potansiyel yaratılmaktadır. Bu proteinler, protonların sitoplazmaya geri akışına izin vermekte ve potansiyellerini ADP'den ATP üretimi için kullanmaktadır. İkinci hücresel enerji birimi, NADH'dır, substrattan NAD⁺ 'ya doğru organotrofik organizmalarda glikoliz sırasında veya litotroflarda NADH-dehidrojenazlar tarafından. Litotrofik asidofiller'de, bu işlem, hem birçok substratın indirgeme potansiyelinin pH bağımlılığı hem de hücre zarı boyunca büyük bir pH gradyanının varlığı ile karmaşıklaşmaktadır (Ingledew, 1982; Christel, 2018). Düşük pH'da, çoğu substrat, elektronları doğrudan, sitoplazmada nötr pH'a yakın bir yerde bulunan NAD⁺ 'ya aktarmak için yeterli indirgeme gücü içermez (yani, standart redüksiyon potansiyelleri çok fazladır). Bu nedenle, ters veya yokuş yukarı elektron taşınımında PMF'nin azaltılması sırasında üretilen bu şartlar altında endergonik NADH üretimine yardımcı olmak için bir son

elektron alıcısı tüketilmektedir (Ingledeu, 1982; Nitschke ve Bonnefoy, 2016; Christel, 2018). Bu sınırlamalara rağmen, asidofiller, çok çeşitli kimyasal reaksiyonlardan yararlanmak için mekanizmalar geliştirmiş ve gezegendeki en zorlu ortamların bazılarında başarılı olmak için yeterli enerji kazanmayı başarmışlardır.



Şekil 2.5. AMD mikrobiyal topluluklarında adaptasyonu düzenleyen metabolik ağlara genel bakış (Mendez Garcia vd., 2015)

2.3.2.1. Demir metabolizması

AMD sistemlerinde, demir içeren birincil biyokimyasal transformasyon ferröz demir (Fe^{+2}) oksidasyonudur. Ferrik demir (Fe^{+3}) redüksiyon yeteneğine sahip türler ile kıyaslandığında ferröz demir-oksidasyonu yapan bakteriler daha baskın olduğu bilinmektedir (Tan vd., 2007; Mendez Garcia vd., 2015). Oksidasyon ile ilgili enzimler elektron taşıma zincirinde bulunmaktadır. Elektronlar demiri indirgeyen türlerde birinci bileşene (büyük olasılıkla bir dış zar sitokrom c) transfer edilmektedir (*Acidithiobacillus ferrooxidans* veya *Leptospirillum ferrooxidans* gibi türler) (Şekil 2.6). Diğer (periplazmik veya membran periferik) proteinler sadece ferröz demir oksidasyonu ile ilişkilidir: mavi bakır proteinleri rusticyanin, RusA (Amouric vd., 2011; Mendez Garcia vd., 2015), *Ferroplasma* spp. İçindeki sülfosiyenin (Dopson vd., 2005; Mendez Garcia vd., 2015) ve Iro (demir-oksidad) proteini (Amouric vd., 2011; Mendez Garcia vd., 2015) bu proteinler arasındadır. *Acidithiobacillus ferrooxidans*'dan elde edilen süper kompleksin, ayrıntılı

RISC'leri (tiyosülfat ve tetratiyonat gibi politiyonatlar), kükürt (S) ve sülfid (S^{-2}) ile oksitleyebilmektedir (Johnson ve Hallberg, 2008; Dopson ve Johnson, 2012; Mendez Garcia vd., 2015). İndirgenmiş inorganik kükürt bileşikleri, indirgenmiş demirden daha enerjik olduğu için uygun substrattır. RISC oksidasyonu prosesi, sülfitin (SO_3^{-2}) bir ara ürün olarak üretilmesine bağlı olarak farklı enzimatik işleyiş gerektirmektedir. Sülfid üretimi yoluyla RISC oksidasyonu sırasında, sülfid/kinon oksidoredüktaz (Sqr) ile oksitlenen sülfid elektronları ubikinona transfer etmekte ve sülfür oluşmaktadır [*At. thiooxidans*, *At. ferrooxidans*, *At. caldus*, *At. ferrivorans* genomlarında bulunan]. Oluşan sülfür periplazmik sülfür dioksijenaz tarafından sülfite okside olmaktadır (Rohwerder ve Sand, 2003; Mendez Garcia vd., 2015). Sülfid, sülfid oksidoredüktaz enzimi ile veya adenosin fosfosülfat (APS) redüktaz (aprAB ile kodlanmış) aktivitesi ile sülfata oksitlenmektedir. Benzer bir enzim birleşmesi, politiyonatların (tritiyonat, tetratiyonat ve tiyosülfat) oksidasyonunda kullanılmaktadır. Tritiyonat dehidrojenaz (tiosülfat üretir) ve tiyosülfat dehidrojenaz (*At. ferrooxidans* ve *At. ferrivorans*'ta bulunan tetratiyonat üretir). Tetratiyonat hidrolizi tetratiyonat hidrolaz (TetH) ile gerçekleştirilmekte ve üretilen tiyosülfat tiyosülfat kinon oksidoredüktaz (DoxDA) tarafından oksitlenmektedir (Quatrini vd., 2009;). RISC'lerin bazı asiditiobasillideki oksidatif metabolizmasında heterodisülfid redüktaz enziminin (HDr) rolü, farklı kükürt bileşiklerindeki büyüme sırasında gen ekspresyonu analizi ile kuvvetle desteklenmektedir. Sox sistemi (*At. thiooxidans*, *At. caldus*), indirgenmiş sülfür bileşiklerini, bir ara ürün olarak sülfid oluşumu olmadan doğrudan sülfata oksitlemektedir. Bu sistem, indirgenmiş kükürt bileşiklerinin doğrudan sülfatın oksidasyonu için gerekli olan çeşitli sitokromları ve diğer proteinleri kodlayan 15'den fazla gen ile ifade edilmektedir. Üç son elektron alıcının varlığı, RISC enerji korunumu ile ilgilidir: *bd* ubiquinol oksidaz (*cydAB*, *At. thiooxidans*, *At. ferrooxidans*, *At. caldus*), *bo3* oksidaz (*cyoABCD*) ile *petII* operonu tarafından kodlanan *bcl* kompleksi ve sitokrom *c4* (*At. ferrooxidans*, *At. ferrivorans*) olarak sınıflandırılmaktadır (Quatrini vd, 2005; Mendez Garcia vd., 2015) (Şekil 2.5).

Sulfolobales takımına ait Arke RISC-metabolize eden enzimlerin birçoğu karakterize edilmiştir (Rohwerder ve Sand, 2007). RISC'leri içeren diğer kimyasal dönüşümlere kıyasla en önemli fark, sürecin ana enziminin sülfürün eşzamanlı oksidasyon ve indirgemeyi katalize eden bir kükürt oksijenaz redüktaz (Sor) olmasıdır. Termoasidofil arke RISC

oksidasyona bağlı proteinlerin arasında *Sor*, *TetH* ve *DoxDA* enzimleri bulunmaktadır (Auernik ve Kelly, 2010 Mendez Garcia vd., 2015).

RISC oksidasyonu, Sqr'yi içerebilen bir süreç olan ferrik demir redüksiyonuna (Şekil 2.4) bağlanmaktadır (Pronk vd., 1990, 1991). Elementer kükürdün indirgenmesi yoluyla anaerobik büyüme, dört asidofil arke cinsinde tanımlanmıştır: termoasidofil crenarchaea *Acidianus*, *Stygiolobus* ve *Sulfurisphaera*, ılımlı termoasidofil euryarchaea *Thermoplasma* 'ydı. Ayrıca bir bakteri suşu olarak *Acidithiobacillus ferrooxidans* tanımlanmıştır (Ohmura vd, 2002; Kucera vd., 2012; Osorio vd., 2013 Mendez Garcia vd., 2015).

H₂S (sülfidogenez) oluşumuyla sona eren sülfatın indirgenmesi (Şekil 2.6), asidofil veya asit toleranslı SRB ile gerçekleştirilmektedir. Bu grup, kükürt ve chalcophilic metal (loid) 'in eşleşmiş biyojeokimyasal döngüsünde önemli bir rol oynamaktadır (Moreau vd., 2010). Prosesin ana enzimleri, sülfiti sülfide indirgeyen altı elektronu katalize eden çok altbirimli enzimler arasında katabolik sülfid redüktazlardır (Mendez Garcia vd., 2015).

Sülfür asimilasyonu (genellikle sülfat (SO₄²⁻) olarak), hücresel zar üzerinde, bir ABC alım sistemi veya *Acidithiobacillus ferrooxidans* içindeki SulP sülfat permeaz (Valdes vd., 2003) yoluyla gerçekleştirilmektedir. Sülfat, demir-sülfür merkezleri ve diğer metabolitlerin metiyonin ve sistein amino asitlerine eklenmiştir (Aguilar-Barajas vd., 2011). Sistein üretimi, adenosin-5p-fosfosülfat (APS), sülfid ve sülfid ara maddeleri yoluyla meydana gelmekte ve *cysJIHDNG* operonu tarafından kodlanmaktadır. Metabolitlerin sülfasyonu için potansiyel bir yol, iki eşdüzey olmayan *cysNC* kopyasıyla kodlanabilen PAPS (3'-fosfoadenosin-5p-fosfosülfat) yoludur (Valdes vd., 2003). APS redüktaz ve sülfat adenil transferaz (SAT), ATP üretmek için sülfat asimilasyonuna kıyasla ters yönde etki etmektedir (Auernik vd., 2008 Mendez Garcia vd., 2015).

2.3.2.3. Nitrojen metabolizması

AMD sahalarında meydana gelen ana nitrojen dönüşümleri azot fiksasyonu, amonifikasyon, nitrifikasyon ve denitrifikasyon reaksiyonlarından oluşmaktadır. AMD sistemlerinde, atmosferik N₂'yi fikse eden türler arasında: *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Valdes vd., 2008), *Leptospirillum ferrooxidans* (Norris vd, 1995; Parro ve Moreno-Paz,

2003), *Leptospirillum ferrodiazotrophum* (Tyson vd., 2005) ve *Ferrovum myxofaciens* (Johnson vd., 2014) bulunmaktadır (Mendez Garcia vd., 2015) (Şekil 2.5).

Carnoulès AMD'deki ana prokaryotik birimlerin metagenomik rekonstrüksiyonu, *Gallionella* ve *Thiomonas*'ın azot fiksasyonunda da rol oynayabileceğini gözlemlenmiştir (Bertin vd., 2011), ancak *nif* operonu *Thiomonas* sp. 3As genom dizisinde belirlenmemiştir (Arsene-Ploetze vd., 2010). Genellikle, bu sistemler dış kaynaklardan sınırlı sabit karbon ve azot almakta ve atmosferdeki CO₂ ve N₂'nin (Tyson vd., 2005) mikroorganizmalar tarafından sabitlenmesi çok önemlidir. Tyson vd. (2005) "*Leptospirillum ferrodiazotrophum*" un Richmond madeninde büyüyen asidik biyofilmden elde edilen *Leptospirillum ferriphilum*-ilişkili bakteriler ("grup II"), nitrojen fiksasyonuna bağlı çeşitli genleri barındırmaktadır (Tyson vd., 2005). *Leptospirillum* "grup IV" (Goltsman vd., 2013) tarafından yapılan son önerme, bu grupta karbon ve nitrojen fiksasyonu için genomik potansiyelin varlığını ve bir elektron donörü olarak hidrojen kullanarak anaerobik büyüme olasılığını ortaya koymaktadır (Mendez Garcia vd., 2015).

N₂ fiksasyonu, aktivitesi oksijen varlığına karşı hassas olan Mo-Fe nitrojenaz enzim kompleksinin aracılık ettiği birkaç istisnadır. Enzimatik yapısal bileşenler *nif* operonu (*nifHDKENX* genleri) tarafından kodlanmaktadır. Bu operonda yer alan genler (düzenleyiciler, taşıyıcılar, oksijen / redoks sensörleri) azot fiksasyonunda da rol oynamaktadır (Parro ve Moreno-Paz, 2004; Tyson vd., 2005; Mendez Garcia vd., 2015).

Amonyum formundaki azot, ya nitrifikasyon yoluyla ya da biyokütleyle doğrudan asimile edilerek oksitlenmektedir (Şekil 2.5). Azotlayıcılar, son elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanmakta ve bu pH değerlerinde substratların eksikliği ve / veya toksisitesi nedeniyle düşük pH'ya (Hankinson ve Schmidt, 1988; Jiang ve Bakken, 1999) duyarlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, AMD sahalarında azotlayıcıların oluşumu kesinlikle O₂'nin varlığına bağlıdır. Amonyum oksidasyonu, amonyum monoksijenaz ve hidroksilamin oksidoredüktaz ile ilgili iki ana enzim, sırasıyla *amoCAB* operonu (*AmoA*, varsayılan enzim aktif bölgesini içerir) ve *hao* geni tarafından kodlanmaktadır. *Leptospirillum* spp. "grup II" ve "grup III" denilen grupta, metagenomlarında *amoA* gene

bulunmakta, ancak operonun geri kalanı olmadığı için, bu da AmoA'nın metan oksidasyonu ve/veya hidrokarbon degradasyonu gibi diğer aktivitelere dahil olabileceğini düşündürmektedir. (Goltsman vd., 2009; Mendez Garcia vd., 2015).

Nitrat (NO_3^-) veya nitrit (NO_2^-) iyonları, anoksik veya düşük oksijen koşullarında (denitrifikasyon) son elektron alıcıları olarak kullanılmaktadır Baeseman ve diğ. (2006), asidik ve ağır metal yüklü ortamlarda azot metabolizmasını incelemiştir. Bununla birlikte, asidik sulardan elde edilen tortuların mikrokozmosik çalışmasında, denitrifikasyonun meydana geldiği ve asitliği azaltabileceği öne sürülmüştür.

Amonifikasyon, nitrit amonifikasyonu ve arasında *Nas*, *Nar* ve *Nap* (nitrat reduktazları), *Nir* ve *Nrf* (nitrit redüktaz) bulunan enzimlerin ardından nitrat redüksiyonu ile gerçekleşmektedir. AMD sistemlerinde, bu aktivitenin *Leptospirillum ferriphilum* “grup II” ile ilişkili bakterilerin kabul edilen varlığı, solunumsal nitrit amonifikasyonunda rol oynayan bir sitokrom c NapC / NirT ailesi proteini önermiştir. *Leptospirillum* spp. Nitrit / sülfid redüktazı için genler içerdiği rapor edilen “grup II” ve “grup III” ün, aminoasit biyosentezine doğrudan kanalize edilen son ürün, amonyum ile asimilasyon nitrit amonizasyonu için gereklidir (Simon, 2002; Goltsman vd 2009). Amonyum hücrelere girdiğinde, *Leptospirillum*'da bulunmayan glutamin sintaz / glutamat sentaz yolağı (GS / GOGAT) ile asimile edilir, burada *At. ferrooxidans* için önerilene benzer bir GS yolu ile amonyak asimilasyonu meydana gelebilir (Tyson vd., 2005; Mendez Garcia vd., 2015).

Çoğu AMD topluluğu üyesi nitrojeni fikse etmez ve amonyum alımı yoluyla elde etmelidir. Örneğin, *Leptospirillum ferriphilum* ile ilgili bakteriler (“grup II”), azot düzenleyici PII proteinlerini kodlayan genlerle kümelenmiş üç amonyum taşıyıcıyı kodlayan genlere sahiptir. Bu gen düzenlemesi oldukça korunmuş görünmektedir ve düzenleyici proteinlerin amonyum alımıyla ilişkili olduğunu öne sürmektedir (Ninfa ve Jiang, 2005; Goltsman vd., 2009). *At. ferrooxidans* genomunda amonyum alımında (sırasıyla amt1, amt2 ve amtB, AFE2916, AFE2911 ve AFE1922) bulunduğu tahmin edilen genler ve glutamine (glnA-homolog gen) amonyum katan proteini kodlayan bir gen bulunmaktadır (Valdes vd., 2008; Mendez Garcia vd., 2015).

2.3.2.4. Karbon metabolizması

Karbon kaynakları asidik sularda oldukça sınırlı olduğu için, mikrobiyal karbon döngüsü AMD ekosistemlerinde büyük ilgi çekmektedir. Özellikle, AMD topluluklarının bazı tipik üyeleri, farklı yollarla CO₂'yi fikse etmelerini sağlayan genler içermektedir. *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *At. caldus* (Valdes vd, 2008), “*Ferrofum myxofaciens*” (Johnson vd, 2014), *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Sb. acidophilus* ve *Acidimicrobium ferrooxidans* (Caldwell vd, 2007), Calvin-Benson-Bassham (CBB) döngüsünde karbon fiksasyonu yapabilmektedirler (Şekil 2.5). Ek olarak, CBB döngüsü yoluyla CO₂ fiksasyonu için metagenomik tanımlamalar, Carnoulès kurşun/çinko madenindeki *Gallionella* ve *Thiomonas* cinsleri ile de ilişkilendirilmiştir (Bertin vd., 2011). Richmond madeninin metagenomik analizi, topluluk içinde “*Leptospirillum rubrum*”, “*L. Ferrodiazotrophum*” (grup III) ve kültüre edilemeyen *Leptospirillum* spp. (grup IV) gibi *Leptospirillum*-ilişkili üyelerin (Tyson vd., 2004; Ram vd., 2005; Goltsman vd., 2009, 2013) indirgeyici trikarboksilik asit (rTCA) döngüsü yoluyla inorganik karbonu fikse edebileceği tahmin edilmektedir (Mendez Garcia vd., 2015).

Bazı *Ferroplasma* suşları, karbon fiksasyonu için indirgeyici asetil-koenzim A yolağında bulunabilecek genetik belirteçler içermektedir (Tyson vd., 2004). Asidofil Arkeelerde CO₂ fiksasyonu 3-hidroksipropionat/4-hidroksibutirat çevrimi (*Acidianus* ve *Metallosphaera* cinsi) veya indirgeyici asetil-CoA yoluyla meydana gelebilmektedir (Mendez-Garcia vd., 2015).

2.3.2.5. Metan üretimi

Makroskopik oluşum ve Mynydd Parys madeni içinde yer alan yeraltı gölü, metanojenlerinkine benzer taksonomik işaretleyiciler (SSU rRNA dizileri) içermektedir. Johnson (2012), bu “muhtemel” metanojenlerin ekolojik etkisinin belirsiz olduğunu gözlemlemiştir. Sanz ve diğ. (2011), Tinto Nehrinin sedimentlerinin zenginleştirme kültürlerinde metanojenlerin var olduğunu gözlemlemiştir. Carnoulès madeninin arsenik bakımından zengin dere sedimentlerinin arkaplan çeşitliliği üzerine bir araştırmada, Volant vd. (2012), diğer türler arasında *Methanomassiliococcus luminyensis*'i içeren metanojenik arke ile ilgili mikroorganizmaları gözlemlemiştir. Aynı türlere ait Arke de, Los Ruedos

madenindeki düşük pH'lı suboksik makroskopik büyümelerde tespit edilmiştir (Mendez-Garcia vd., 2014). Bununla birlikte, 3'ün altındaki pH seviyelerinde büyüme yeteneğine sahip metanojenler veya metanojenez için en önemli enzimler, AMD sistemlerinde izole ya da tespit edilememiştir (Johnson, 2012).

2.3.2.6. Hidrojen metabolizması

Hidrojen (H_2), mikrobiyal metabolik dönüşümler ve fermentasyonlar sırasında üretilen yaygın bir üründür ve birçok kimyasal metabolizmada kemolitotroflar tarafından kullanabilmektedir. Hidrojen oksidasyonunu gerçekleştiren bakteri ve arkeler son elektron alıcılarında, örneğin nitrat, oksijen, sülfat, ferröz demir gibi farklılık göstermektedir. Proses içindeki anahtar enzimler, H_2 'nin protonlara geri dönüşlü oksidasyon reaksiyonunu katalize eden hidrojenazlardır. Bu enzimler çok yönlüdür, çeşitli substratları kullanabilir ve hidrojen üretimi sırasında elektron araçları olarak işlev görebilmektedir. Bu nedenle, hidrojenazlar, doğrudan H_2 transformasyonlarla değil, elektron taşınmasına bağlı olan çeşitli fonksiyonlara sahiptir (Mendez- Garcia, 2015).

Asidofil mikroorganizmalar için elektron verici olarak hidrojenin varlığını göstermek için yapılan çalışmada dizi analizi yapılmış birkaç asidofil genomunda (örn., *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Valdes vd., 2008) hidrojenaz genlerinin varlığı ve asidofil türlerinin asidik sularda hidrojen üzerinde ototrofik olarak büyüyebildiği gözlemlenmiştir (Drobner vd., 1990). Bu bakteriler için hidrojenin elektron vericisi olarak önemini göstermektedir (Johnson, 2012). Dahası, *Leptospirillum* spp. 'De Carnoulès tortullarının (Bertin vd., 2011) metagenomunda hidrojenazları kodlayan genler de gözlenmiştir. "Grup IV" (Goltsman vd., 2013) ve hidrojenazlar, Los Ruedos makroskopik büyümelerinin metaproteomunda da tanımlanmıştır (Mendez-Garcia vd., 2014; Mendez Garcia vd., 2015).

2.3.3. Asidofil mikroorganizmaların adaptasyon mekanizmaları

Ekstremofiller, ekstrem koşullarda hayatta kalmak için aşağıdaki stratejileri kullanmaktadır:

- Homeostazisi korumak için ekstremolitler salgılamak;

- Birleşik direnci, amino asit birikmesi ve hücrel bölümlendirme ile ilgili mekanizmalar geliştirmek;
- Nükleer faktörleri harekete geçirmek;
- Evrimsel süreçlerle savunma yeteneklerini kazanmak;
- Katalitik aktiviteyi arttırmak ve hücre ölümüne direnç kazanmak;
- Termostabil proteinler kullanmak (Shrestha vd., 2019).

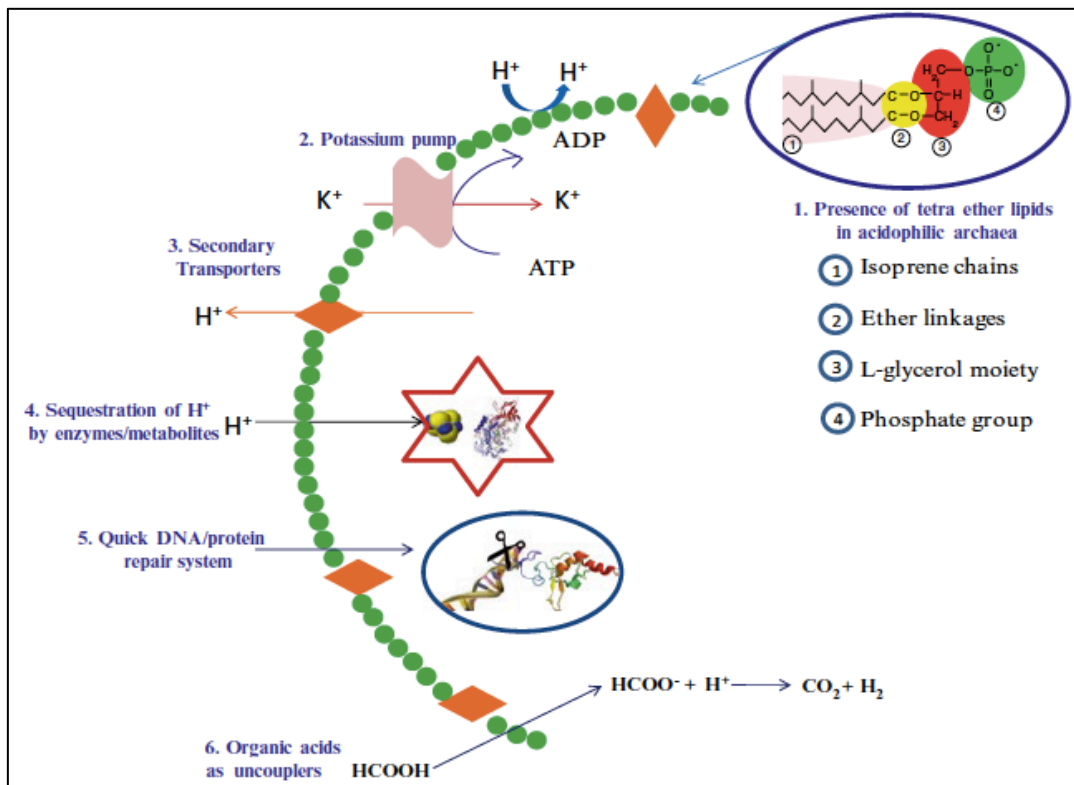
Organizmalar ekstremler pH'larda hayatta kalmak için, farklı ekofizyolojik problemleri çözme adına hücrel adaptasyonlara ihtiyaç duymaktadır. pH düzenlemesi için kendine özgü yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahiptir (Sharma vd., 2012).

Asidofil mikroorganizmalar hücre zarı boyunca nötral hücre içi pH'ı sağlamak için özelleşmiş adaptasyon mekanizmalarına sahiptir (Satyanarayana vd., 2005; Sharma vd., 2012; Sharma vd., 2016). Organizmaların, metabolik özelliklerinin, genetik özelliklerinin, makromoleküllerinin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin, pH'ın korunmasında ve nötrofilik muadillerinden ayırt edilmesinde yardımcı oldukları görülmektedir. Teorik olarak bu mekanizma, F₀F₁ ATPaz pompası yardımı ile yüksek miktarda ATP üretmek için kullanılmaktadır, ancak aşırı asidik koşullarda hayatta kalabilmesine rağmen hücre ölümüne neden olan hızlı asidifikasyondan dolayı sitoplazmaya kontrol edilemeyen proton akışı olması, nükleik asit ve proteinlerin normal fonksiyonlarını (DNA gibi makromoleküller düşük pH'da kararsız hale gelmektedir) olumsuz etkilemektedir (Sharma vd; 2012; Sharma vd., 2016). DNA transkripsiyonu, protein sentezi ve enzim aktivitesi gibi hücre içi proseslerde karışıklığı önlemek için, eş zamanlı dışa akış ile proton akışını dengeleyecek mekanizma gerekmektedir. Asidofil mikroorganizmaların proton geçirmez hücre zarları, ters membran potansiyeli ve sitoplazmik tamponlama gibi mekanizma kombinasyonlarını kullandığı düşünülmektedir (Baker-Austin ve Dopson, 2007; Sharma vd., 2012; Sharma vd., 2016) (Şekil 2.7).

Bunun yanı sıra asidik aralıkta iç pH'ya sahip diğer organizmalar da rapor edilmiştir (Vossenber vd., 1998; Macalady vd., 2004; Sharma vd., 2012). *Ferroplasma acidiphilum*'un hücre içi ve hücreye bağlı enzimlerinin genleri klonlanmış ve *Escherichia coli*'de ifade edilen ürünleri saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Golyshina vd., 2006; Sharma vd.,

2012). Karakterize edilen enzimlerin pH'sının 1.7-4.0 aralığında fonksiyonel ve kararlı olduğu bulunmuştur.

Asidofil mikroorganizmaların asidik çevre koşullarında gelişebilmesi için düşük pH'ya karşı diğer savunması hücre zarı etkileridir. Hücre zarları lipid ve yağ asidi bakımından nötrofillerden oldukça farklıdır. Asidofil mikroorganizmalar arasında arkelerin membranları protonlara düşük geçirgenliğe sahiptir. Arkeal membranlar tetraeter lipidlerin varlığı ile karakterizedir (Batrakov vd., 2002; Pivovarova vd., 2002; Shimada vd., 2002; Macalady vd., 2004). Ökaryotik ve bakteriyel membran lipidlerdeki ester bağları ile karşılaştırıldığında eter bağları asit hidrolizine daha az duyarlıdır (Golyshina ve Timmis, 2005; Sharma vd., 2016).



Şekil 2.7. Asidofil mikroorganizmaların asidik çevrelerde adaptasyonu (Sharma vd., 2016)

Asidofil mikroorganizmalar ters membran potansiyelini (pozitif membran potansiyeli) nötrofillerde görülen negatif membran potansiyelinin aksine pH homeostazi mekanizması olarak kullanmaktadır. Asidofil mikroorganizmalar pozitif yüklü iyonların Donnan potansiyeli ile pozitif membran potansiyelini üretmektedir (Sharma vd., 2016). Donnan potansiyel mekanizması; kemiosmotik gradyan (K⁺ iyonlarının akışını artırarak

hücrelerde pozitif koşulları destekler) ile sitoplazmada proton akışını azaltarak asidik koşulların tolere edilmesini sağlamaktadır (Shrestha vd., 2019). Potasyum hüre içine proton girişini engellemektedir. *P. torridus* (Futterer vd., 2004), *F. Acidarmanus*, *S. solfataricus* (Jeffries vd., 2001) ve *Leptospirillum* (Tyson vd., 2004) gibi asidofil mikroorganizmaların genom analizi, Donnan potansiyelinin üretiminde yer aldığı kabul edilen katyon taşıyıcıların bu mikroorganizmalarda yüksek sayıda var olduğunu önermektedir (Dopson vd., 2004; Shatma vd., 2016).

Asidofil mikroorganizmaların yüksek geçirgen olmayan hücre membranları yerine eğer ani bir proton akışı varsa, sitoplazmanın tamponlama kapasitesi bu protonları ayırabilir ve daha sonra hasarı önleyebilir. Tüm asidofil mikroorganizmalarda lizin, arjinin, histidin gibi aminoasitler ve proton yakalama yeteneğinde olan sitoplazmik tampon moleküllere sahiptir. Ektremofil *A. acidophilum* ve nötrofil *E.coli* 'nin sitoplazmik tamponlama kapasitesi karşılaştırıldığında ikincisinin daha fazla tamponlama kapasitesi olduğu öne sürülmüştür. Bu öneri ile asidofil mikroorganizmalardaki sitoplazmik tampon vasıtasıyla pH homeostasisinin nötrofillerden daha yüksek tamponlama kapasitesi olmadığını belirtmektedir. Diğer tamponlama molekülleri arasında, dihidrojen fosfat iyonu ve potasyum yer almaktadır. *Ferroplasma*, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *A. caldus* gibi asidofil mikroorganizmaların çoğunun genom dizileme analizleri, ATPaz, antiportör ve simportörleri içerdiği varsayılan proton akış sistemlerinin varlığını doğrulamaktadır (Tyson vd., 2004). Asidofil mikroorganizmalarda ikincil transportörlerin yokluğu rapor edilmiştir. Aktif ikincil transportörler membran proteinleri, transportu sağlayan sodyum, potasyum iyonlarının transmembran elektrokimyasal gradientlerini kullanmaktadır. *P. torridus* ve *T. acidophilum*'da asidofil mikroorganizmaların düşük pH'ya adaptasyonunu sağlayan bu ikincil transportörlerin yüksek miktarda var olduğu bilinmektedir (Sharma vd., 2016).

Genellikle heterotrofik asidofil mikroorganizmalar asetik asid, laktik asit gibi organik asitleri parçalama yeteneğindedirler. Bu asitler asidik pH'ta solunum zincirinin ayırıcısı olarak davrandığı için asidofil mikroorganizmalara zararlıdır. Protonlanmış asid/konjuge baz çiftleri olan bu yapılar hücre zarı boyunca ayrılabilen protonların kolay geçmesine yardımcı olurlar. Organik asit degradasyon yollarının enzimlerini kodlayan genler ekstrem asidofil mikroorganizmaların genomlarında vardır, kesin olmamasına karşın düşük

pH ile ilişkilendirilmiştir. İlginç bir şekilde ekstrem asidik pH'da büyüme yeteneğinde olan tüm asidofil mikroorganizmalar heterotroftur ve organik asitleri parçalamada etkilidir. Diğer proteinlerin uygun katlanmasını sağlayan proteinler şaperonlardır. İlginç bir şekilde asidofil mikroorganizmalarda ısı şok proteinleri/şaperonların yüksek düzeyde ifade edildiği rapor edilmiştir. Bu şaperonlar zarar gören proteinlerin hızlı ve etkili tamir edilmesini sağlamaktadır (Sharma vd., 2016).

Asidofil mikroorganizmaların enzimleri uygun katlanmış yapılara sahiptir ve asidik karakterdeki çevrelerde kararlı yapıdadır. 1 gibi düşük pH'larda katalitik olarak aktiftirler. Düşük pH'da fonksiyon göstermesi için proteinlerin adaptasyonları olmalıdır. Acid amino asit rezidülerindeki yüklerine engel olarak protein doğal yapılarının bozulmasına neden olmaktadır. Asidstabil proteinlerin var olan adaptasyonları kesin olarak analılamamıştır ama enzimlerin yüzeyindeki asidik amino asitlerin (nötral pH'da negatif yüklü) varlığı düşük pH'daki çalışmalarını sağladığını göstermektedir. *S. solfataricus*'tan modellenmiş endo- β -glukanaz üzerinde çok sayıda glutamik ve aspartik yüzey kalıntısının varlığı, nötr pH'ta yüksek bir negatif yüzey yükü üretmesi, düşük pH'ta asitstabil enzimler için önemli bir adaptasyondur. Çok sayıda asidik rezidü endo- β -glukanaz için daha düşük bir izoelektrik noktaya (pI) karşılık gelmektedir. Buna karşın, *S. solfataricus*'tan gelen nötr β -glukanazlar, aynı zamanda, nötr ile daha az asidik pH'ta optimal aktivite sergilemelerine rağmen, aynı zamanda, asitlendirilebilir β -glukanazlarınkine benzer bir izoelektrik noktaya sahiptirler. Bu durum, çok sayıda asidik yüzey kalıntısının varlığının, endo- β -glukanazın asit stabilitesini belirlemede tek faktör olamayacağını gösterir (Sharma vd., 2016).

A. acidocaldarius'tan elde edilen asidstabil α -amilaz enzimi yüzeyinde az yoğunlukta hem pozitif hem de negatif yükler taşımaktadır. Bu durum, asidik pH'ta yüklü grupların elektrostatik itilmesini önler ve asit stabilitesi için bir adaptasyon olarak kabul edilebilir. *F. acidiphilum*'un birkaç proteininin analizi ile sitoplazmik pH'dan daha düşük pH'da aktif olan enzimlerin varlığını göstermiştir. Bu oluşan durum bu enzimlerin hücre içi bölümlere ayrılmasından ve sitoplazma içinde mevcut olan pH gradyanından dolayı olabilir. Bunun bir başka nedeni bu enzimlerin, sitoplazmaninkine daha yakın pH optimasını daha artıran çok enzim kompleksleri oluşturmasıdır. *F. Acidiphilum*'un proteomik analizi, enzimlerin pH stabilitesine katkıda bulunan yüksek oranda demir proteinlerinin varlığını

göstermiştir. Bu demir, proteinin 3 boyutlu yapısını sabitleyen bir “demir perçin” işlevi görmektedir (Sharma vd., 2016).

Asidofil mikroorganizmalar nötrale yakın iç pH sağlamaktadır ve bu yüzden hücre zarı boyunca geniş kimyasal proton gradienti sağlamaktadır. Hücre içine proton hareketi hücre içi net pozitif yük ile en aza indirilmektedir. Hücreler titre edilebilir gruplar gibi hareket eden proteinlerin amino asit yan zincirleri, nükleik asitlerin fosforlanmış grupları ve metabolik ara maddelerin neden olduğu pozitif iç membran potansiyeline sahiptirler. Sonuç olarak, düşük hücre içi pH titre edilebilir grupların protonasyonuna yol açmakta ve net hücre içi pozitif yük üretmektedirler. *Dunaliella acidophila*'da yüzey yükü ve iç zar potansiyelinin pozitif olması ile protonların hücrelere akışının azaltması beklenmektedir. Ayrıca, hücreden dışarı akışı kolaylaştırmak için güçlü bir sitoplazmik membran H^+ -ATPaz'ı da aşırı ifade etmektedir. *T. Ferrooxidans*'ın rustisiyanin (asit-kararlı elektron taşıyıcısı)'in asit kararlılığı, hücre içinde yer alan yüksek dereceli içsel ikincil yapı ve hidrofobik ortama dayandırılmaktadır. Elektrostatik itme ve protein katlanmasını en aza indirerek, nispeten düşük bir pozitif yük seviyesi termopsin (*Sulfolobus acidocaldarius*'un bir proteazı) ve *Alicyclobacillus acidocaldarius*'un bir amilazı gibi salgılanmış proteinlerin asit stabilitesine bağlanmıştır (Satyanarayana vd., 2005).

Birçok metal, düşük pH'da nötr pH ortamlarında olduğundan daha fazla çözünür olmaktadır ve asidofillerin yüksek metal konsantrasyonlarına maruz kalmasına neden olmaktadır. Metal direnci, pasif (metal sülfat komplekslerinin oluşumu, iç pozitif membran potansiyeli, proton ve metaller arasında bağlanma alanları için rekabet, biyofilmler / hücre dışı polimerik maddeler üretimi) ve aktif sistemler (atık su pompaları / taşıyıcılar) kombinasyonu ile sağlanabilmektedir (Gumulya vd., 2018).

İnorganik polifosfatlar veya şaperonlar kullanılarak metal sekestrasyonu, bir metal iyonunun daha az toksik bir forma enzimatik dönüşümü. Metal iyonlarının taşınmasını katalize eden başlıca protein aileleri tanımlanmıştır (Gumulya vd., 2018):

- P tipi ATPazlar (Cd^{2+} ve Cu^{2+} için),
- ATP bağlayıcı kaset (ABC) tipi taşıyıcılar (Ni^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} ve Mo^{2+} için),
- Direnç Nodülasyon Bölümü (RND) taşıyıcılar (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} ve Zn^{2+} için)
- Katyon difüzyon kolaylaştırıcı (CDF) ailesi (Zn^{2+} , Cd^{2+} ve Co^{2+} için).

Ağır metaller insan sağlığına zarar veren yaygın çevre kirlenici maddelerdir. Toksik metal iyonlarına maruz kalma, büyüme durması, apoptoz ve birçok mikroorganizmanın hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Mikroorganizmaların ağır metal direncinin incelenmesinin önemi aşağıda verilen maddeler ile belirtilebilmektedir (Kulakovskaya, 2018):

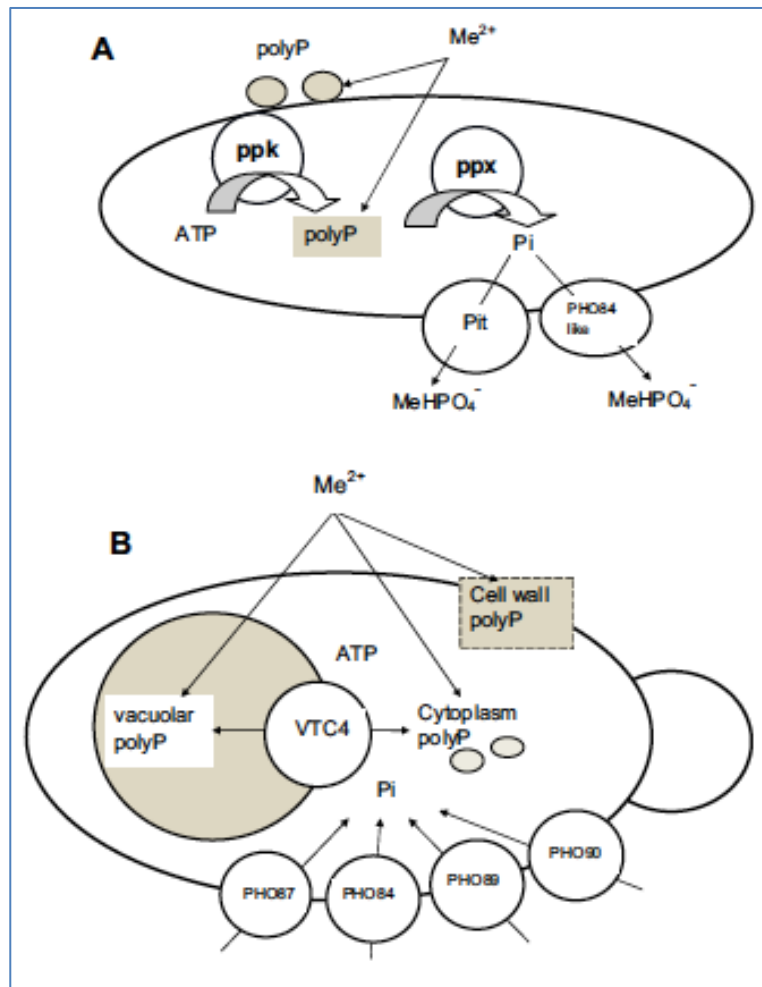
- Mikroorganizmaların su, besin, toprak ve atıkların iyileştirilmesi için biyosorbentler olarak kullanılması (Bayat ve Sari, 2010; Monachese vd., 2012; García-García vd., 2016; Hansda vd., 2016; Kulakovskaya, 2018);
- Ağır metal kirliliğinin izlenmesi için mikrobiyal biyosensörlerin geliştirilmesi (Gutiérrez vd., 2015; García-García vd., 2016; Kim vd., 2018; Kulakovskaya, 2018).

Mikroorganizmalar, toksik ağır metallerin neden olduğu stresin üstesinden gelmek için çeşitli yollar gerçekleştirmektedir. Doğrusal bir ortofosforik asit polimeri olan inorganik polifosfat (polyP), bu adaptasyona katılan bileşiklerden biridir. PolyP, metal iyonları için oldukça etkili bir kompleks yapıcıdır ve basit bir şekilde fosfatların yüksek sıcaklıkta kaynaştırılmasıyla elde edilmektedir. Evlerde ve endüstride ölçek oluşumunu kontrol etmek için filtrelerde yaygın bir bileşiktir. PolyP içeren yeni sorbentlerin çalışmaları, Ni^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} (Tarasevich ve Klimova, 2001), Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} (Amer vd., 2010)'un sulu çözeltilerden uzaklaştırılması için bir adsorban olarak sodyum polifosfat modifiyeli kaolinit kilinin yüksek potansiyelini ortaya koymaktadır. Mikrobiyal hücreler sıklıkla büyük miktarda polyP içermektedir. PolyP'nin ağır metal iyonlarının detoksifikasyonunda yer aldığı açıkça ifade edilmektedir (Kulakovskaya, 2018).

Ağır metal iyonlarında PolyP rolü bakterilerde (Keyhani vd., 1996; Keasling ve Hupf, 1996; Gonzales ve Jensen, 1998) ve mayalarda (Okorokov vd., 1983) toleransı rapor edilmiştir. Metallerin fosfat aracılı iyileştirilmesi üzerine yapılan incelemede (Martinez vd., 2014), “metallerin ve radyonüklidlerin hücre içine girmesi veya hücre dışından ayrılmasını teşvik eden polifosfat metabolizması, kirlenmiş ortamlardaki mevcut mikroorganizmaların fizyolojilerini kullanan bir iyileştirme yaklaşımını temsil etmektedir” demiştir. PolyP'in ağır metal direncindeki rolünü göz önüne alındığında, fosfat alma sistemlerinde ve polyP metabolizma yollarında prokaryotlar ve ökaryotlar arasındaki büyük fark olduğu

bildirilmiştir. Bakterilerdeki poliP metabolize edici enzimler şunlardır (Şekil 2.8) (Kulakovskaya, 2018):

- Polifosfat kinazlar (ppk): Enerji bakımından zengin fosfat kalıntılarını ATP'den polyP'ye ve poliP'den ADP'ye geri transfer etmektedir (Rao vd., 2009; Kulakovskaya, 2018);
- Ekzopolifosfatazlar (ppx): PoliP zincirinin sonundan fosfat ayırmaktadır (Rao vd., 2009; Kulakovskaya, 2018).



Şekil 2.8. Ekzopolifosfataz ve polifosfat kinazların çalışma prensibi (Kulakovskaya, 2018)

2.3.4. Ekstremofil mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamaları

Ekstremofiller gelişmeleri için bazı fiziksel yapılarla ve/veya metabolik kapasitelere sahiptirler ve sınırları geniş ekstrem koşullarda yaşayabilmektedir. Ekstremotolerantlar ve

ekstremoresistantlar da hayatta kalmaları için benzer özelliklere sahiptirler. Tüm organizmalar, yaşamlarında gerekli iki ana besin kaynağı karbon ve azota kendi çevrelerinde farklı form ve konsantrasyonlarda erişebilmektedir. Bu mikroorganizmaların hayatta kalmaları ve gelişmeleri için çeşitli substratları ve metabolik yolları nasıl kullandıklarını anlamaya çalışmak oldukça ilgi çekici bulunmaktadır. Buna karşın büyümeleri için heterotrofi ve ototrofi olmak üzere iki model sunulmaktadır (Tse ve Ma, 2016)

Doğal ekstrem çevrelerin yanında, insan eliyle oluşturulmuş asit maden suları, buhar ısıtmalı yapılar ve soğuk hava depoları da ekstrem çevreler arasında yer almaktadır. Ekstrem çevrelerdeki organizmaların çeşitliliği, moleküler ve düzenleyici mekanizmaları ile ilgili çalışmalar yoğun olarak yapılmaktadır. Proteinler, enzimler (ekstremozim), uyumlu çözünenler gibi ekstremofillerden elde edilen ürünler biyoteknolojinin ilgi alanları içindedir. Bu alanlarda yapılan çalışmalar diğer gezegenlerde de yaşamın olabileceğine dair kanıt olabileceği düşünüldüğü için de oldukça ilgi çekicidir (Satyanarayana vd., 2005).

Yüksek aktivite ve stabiliteye sahip enzim ve/veya biyolojik olarak aktif madde üretmesi, kimyasal maddelerin (ksenobiyotik) yıkımı ve/veya elimine edilmesi, ağır metal iyonları ve radyonuklidlerin biriktirilmesi için ekstremofiller biyoteknolojik ve ticari uygulamalarda yarışta yer almaktadır. Pek çok ekstremofilin enzimlerinin geniş pH aralığında yüksek aktivite ve kararlılık göstermesi, organik çözücü varlığında, iyonik güçler ve yüksek sıcaklık altında kararlı kalması tercih edilme sebeplerindedir (Morozkina vd., 2010).

Buna karşın, enzimlerin ve biyolojik olarak aktif maddelerin üreticileri ekstremofil mikroorganizmaların kültürasyonu sırasında düşük verimlilik gözlenmektedir (Srilatha, 2011). Aynı zamanda izole edilen asidofil mikroorganizmaların da uzun gelişme süreleri nedeniyle endüstriyel uygulamalarda kısıtlamalara neden olduğu rapor edilmiştir (Jerez, 2008; Nicolaidis, 1987). Üretilebilirliğin artması amacıyla, çeşitli mezofil bakteriyel sistemlerde ifade edilmek üzere ekstremofillerin gerekli genleri klonlanmaktadır. Klonlama ve ifade edilmenin örnekleri arasında *Rhodothermus marinus*'dan termostabil xylanase enziminin *E. coli*'de klonlanması ve *Desulfurococcus mucosus*'dan pullulanase enziminin *Bacillus subtilis*'de klonlanması gösterilebilmektedir. Üretilebilirliğin artması amacıyla kullanılan yöntemler arasında yeni kültürasyon metodları da yer alabilmektedir. Bu yaklaşımın örnekleri arasında *Sulfolobus shibatae*'nin biyokütle verimini arttırmak için

diyaliz biyoreaktörün kullanılması verilebilir. Genelde kullanılan fermentör ile kıyaslandığında verimi 30-40 kat daha arttırdığı görülmektedir. Diyaliz biyoreaktörde sentezi inhibe eden sekonder metabolitlerin eliminasyonu yapılmaktadır.

Endüstriyel uygulamalarda en çok katkı termofil enzimlerden sağlanmaktadır. Onların kültürasyonu sırasında mikrobiyal kontaminasyon riski azalmakra, substrat çözünürlüğü artmakta ve kültür besi ortamının viskozitesi azalmaktadır. Termofil enzimlerin üstünlüğü çok yüksek termostabilite göstermeleri ve 70 °C ve 125 °C sıcaklık değerlerinde optimum pH değerine sahip olmalarıdır. Ekstremofil mikroorganizmalardan termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalar yüksek termostabil hidrolazları üretmekte ve çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. termostabil hidrolazlar arasında selülaz, ksilinaz, pektinaz, kitinaz, amilaz pullulanaz, lipaz, proteaz, glukoizomeraz, alkol dehidrogenaz ve esteraz yer almaktadır. Psikrofil mikroorganizmalar da hidrolaz üreticisi olarak kullanılmaktadır. β -glukanaz, selülaz, pektinaz ve proteinaz gıda endüstrisi ve endüstriyel atık arıtımında tercih edilmektedirler. Alkalofilik mikroorganizmalardan, özellikle *Bacillus* türü bakterilerin enzimleri pek çok endüstride yüksek sıcaklık ve alkali pH değerlerini içeren uygulama alanında kullanılmaktadır. Bu nedenle elastaz ve keratinaz kozmotik endüstrisinde uygulamalarına sahipken; selülaz, proteinaz, amilaz, lipaz gibi hidrolitik enzimler deterjan üretiminde kullanılmaktadır.

Nüklein metabolizmasının termostabil enzimleri -DNA polimeraz, DNA ligaz, restriktaz ve fosfatazlar- moleküler biyoloji ve tıp alanında geniş kabul görmüş uygulamalara sahiptir. Ekstremozimlerin en iyi çalışılmış enzimlerinden biri olan DNA polimeraz (*Taq*), hipertermofilik bakteri izolatu olan *Thermus aquaticus*'dan izole edilmiştir. Yüksek termostabilitesi ile polimeraz zincir reaksiyonunda DNA amplifikasyon işleminin yapımını kolaylaştırmaktadır. Son zamanlarda ekstremofillerden elde edildiği bilinen 13 tane DNA polimeaz vardır, buna karşın hala *Taq* polimeraz kataliz etkisi ve hızıyla kullanılan en yaygın enzimdir. *Pyrococcus furiosus*'un DNA polimerazı bakteriyel ve viral enfeksiyon teşhislerinde *Taq* DNA polimeraz ile karşılaştırmalı kullanılmaktadır. DNA dizileme için ise temostabil enzimlerin karışımı kullanılmaktadır. *Thermus aquaticus*'ın termosekans DNA polimerazı ve *Thermoplasma acidophilum*'den TAP pirofosfotaz kombinasyonu yöntemin duyarlılığını arttırmaktadır. Son zamanlarda termostabil DNA ligazın araştırılması ve aktivite çalışması yer almaktadır. En çok ilgi çeken enzimler

Thermus, *Bacillus*, *Rhodothermus*, ve *Hydrogenobacter* türleri tarafından üretilmektedir. Ekstremofil organizmaların enzim uygulamalarının en çok katkı sağlayan yönlerinden biri biyosensör bileşeni olarak kullanımudur. Enzim oda sıcaklığında herhangi bir transformasyon olmadan substrata bağlanmaktadır. Enzim ve substrat bağlanma prosesinin gözlemi floresan yöntemi ile yapılmaktadır. Bu yöntem basit ve oldukça duyarlıdır. *Bacillus stearothermophilus*'un termostabil glukokinaz enzimi, ters glukoz biyosensör olarak kullanılmaktadır (tekrar kullanılabilir) (D'Aurina vd., 2002; Morozkina vd., 2010). Termofil ve asidofil *Thermoplasma acidophilum*'un glukoz dehidrogenazının uygulamaları biyosensörün oluşturulması sırasında alternatif çözüm olabilmektedir.

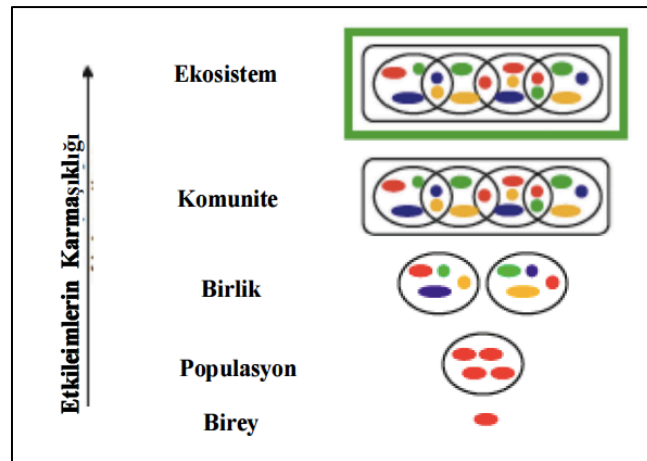
Bacillus acidocaldarius'ın pirüvat kinazının kullanımı ile kan, potasyum ve sodyum iyonlarının değerlendirilmesi için biyosensör sistemlerin üretim yapılma olasılığı gösterilmiştir (D'Aurina vd., 2000; Morozkina vd., 2010). Enzimle substrat bağlanması biyosensör oluşturulması için önemli reaksiyon olduğu için apoenzim bile sensör olarak kullanılabilir. Termostabil enzimlerin (apoenzimleri içeren) kullanımı, ekstremofil mikroorganizma uygulamalarını modern alanlarını aktif olarak geliştirmektedir. Bu gelişmeler, metod duyarlılığını geliştirmeye, çeşitli bileşenlerin analizini kolaylaştırmaya, hızlı sonuca varmaya ve maliyeti düşürmeye izin vermektedir. Ekstremozimlerin ilgileri yalnızca endüstriyel uygulamalarıyla sınırlı değildir, model sistem olarak da araştırma çalışmalarında kullanılmaktadır.

Biyolojik olarak aktif maddeler literatürde ekstremolit olarak adlandırılmaktadır. Ekstrem koşulların etkisinden hücreyi korumak için ekstremofiller tarafından sentezlenen organik osmolitler ekstremolitlerdir (Lentzen vd., 2006; Morozkina vd., 2010). Gliserin, betain, ektoin, hidroksiektoin, ekstremofiller tarafından üretilmekte ve geniş çapta gıda sanayii, kozmetik sanayii, farmasötik sanayii ve moleküler biyolojide kullanılmaktadır. Hidrokarbonlar için ihtiyaç son yıllarda büyümektedir. Psikrofil ve psikrotolerant mikroorganizmalar yağ ile kirli su ve toprak biyoremediasyonu için çeşitli hidrokarbonları yıkabilme yeteneğindedirler (Aislabie vd., 2006; Morozkina vd., 2010). Hidrokarbondan toprak biyoremediasyonunun iki yeni stratejisi bulunmuştur. Biri *ex-situ* diğeri *in-situ* olarak adlandırılmaktadır. *Ex-situ* stratejide biyolojik muamele yer almaktadır, *in-situ* stratejide ise kirli tabaka hareket ettirmeden muamele edilir. İn-situ remediasyon daha ucuz ve ekolojik olarak güvenlidir (Delille vd., 2003; Morozkina vd., 2010).

2.4. Mikrobiyal Çeşitlilik

Çoğu çevresel mikroorganizma bir topluluğun bir parçası olarak bulunmaktadır. Bu topluluk, bir fomitte bir arada bulunan iki popülasyon kadar basit olabilirken; tabakalı, mikrobik bir mattaki siyanobakteriler, sülfat indirgeyen bakteriler ve diğer mikroorganizmalar gibi biraz daha kompleks olabilmekte veya gram başına binlerce tür içerebildiği gibi; toprak gibi çok karmaşık da olabilmektedir. Toprağa ek olarak, karmaşık mikrobiyal topluluklar, bitkiler, yüzey ve/veya yer altı suları dahil olmak üzere diğer doğal ekosistemlerde de bulunmaktadır (Gentry vd., 2015).

Ekolojistler, organizmaları ve topluluklarını tanımlamak için hiyerarşik bir sınıflandırma sistemi (Şekil 2.9) kullanmaktadır. Genetik olarak ilişkili olan ve aynı işlevi yakın bir yerde gerçekleştiren (yani aynı nişi işgal eden) mikroorganizmalar topluca bir popülasyon olarak adlandırılmaktadır. Aynı kaynaklar için rekabet eden popülasyonlar gruplara ayrılmaktadır. Belirli bir ortamda bulunan bütün gruplar (ve böylece topluluklar) mikrobiyal topluluğu oluşturmaktadır. Çevresindeki diğer biyotik ve abiyotik bileşenlerle birlikte mikrobiyal topluluk ekosistemini oluşturmaktadır (Gentry vd., 2015).



Şekil 2.9. Mikrobiyal komünite içindeki ekolojik organizasyon

Topluluk açısından bakıldığında, mikrobiyal çeşitlilik, belirli bir çevrede bulunan mikrobiyal popülasyonlardaki varyasyon miktarı (yani, genetik, morfolojik ve fonksiyonel farklılıklar) olarak tanımlanmaktadır. Mikrobiyal toplulukları karakterize etmek için yaygın olarak farklı çeşitlilik ölçümleri kullanılmaktadır (Çizelge 2.1). Bu tespitlerin temeli,

örnek(ler)deki farklı organizmaların (yani türlerin) sayısı (zenginlik), dağılımın eşitliği (eşitlik) ve kimliğidir (topluluk bileşimi). En sık bildirilen mikrobiyal çeşitlilik verileri, tür zenginliği ve/veya eşitliği (genellikle Shannon_Wiener; α çeşitliliği gibi çeşitlilik endekslerini kullanarak) ve topluluk kompozisyonu (β çeşitliliği) gibi ölçütleri içermektedir. rRNA genlerine dayalı olanlar da dahil olmak üzere herhangi bir çeşitlilik tahmininin birçok sınırlamaya tabi olduğunu belirtmek önemlidir. Ayrıca, bir numunedeki tüm mikrobiyal topluluk sıralanmadıkça, sekans verileri tüm topluluğun sadece bir kısmını (bazen çok küçük) temsil etmektedir (Gentry vd., 2015).

Çizelge 2. 1. Mikrobiyal Çeşitliliğin Ölçüleri

Ölçü	Tanım
Alfa Çeşitlilik	Örnekteki tür çeşitliliği. Sıklıkla tür zenginliği ve çeşitlilik indeksi kullanılarak karar verilir.
Beta Çeşitlilik	Örnek ya örnek topluluğunda kompozisyon varyasyonunun miktarı
Gama Çeşitlilik	Örnek birimlerinin toplamındaki tüm çeşitlilik
Tür Zenginliği	Örnekteki tür sayısı
Tür Aynılığı	Örnekteki tür fazlalığının eşitliği
Çeşitlilik İndeksi	Tür zenginliği ve aynılığı gibi

2.4.1. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan kültüre bağlı teknikler

AMD de dahil olmak üzere, mikrobiyal toplulukların en uzun süre çalışmaları, doğal ortamlarından izole edilmiş ve laboratuvar ortamında tanımlanmış koşullar altında yetiştirilen mikroorganizmalarla sınırlıdır. Geleneksel olarak, asidofilik mikroorganizmaların kültürle edilmesi ve izole edilmesinin çeşitli zorlukları ortaya koyulmuştur. Ancak, bunların üstesinden, farklı asidofil grupları için spesifik ve seçici büyüme ortamlarının formülasyonu, alternatif jelleştirici maddelerin yanı sıra overlay kültürleme protokolü üzerine uzmanlaşmış bir seçici seçmenin benimsenmesi ile gelinmiştir. Son yirmi yılda kültüre bağlı çalışmalar fenotipik özelliklerin anlaşılması, asidofillerin metabolizması ve biyoteknolojik potansiyelinin anlaşılması yönünde birçok katkıda bulunmuştur (Lukhele vd., 2019).

Bununla birlikte, yalnızca kültürle sınırlıysa, AMD mikrobiyotasının ekolojisi ve fizyolojisi hakkındaki görüşler kısmi olabilir ve büyük olasılıkla kültüre edilemeyen mikroorganizma havuzunu yakalamak için in vitro kültürleme yetersizliği nedeniyle

önyargılı olabilirdi. Üstelik, kültüre bağımlı yaklaşımlar, doğal ortamda önemli tür-tür, tür-habitat ve topluluk-habitat etkileşimlerinin hassas bir şekilde ayarlanmasını sağlayan çevrenin doğru ve derinlemesine açıklanması için uygulanacak kadar güçlü değildir. Buna göre, AMD sistemlerinde mikrobiyal topluluk yapısını ve çeşitliliğini hızlı ve ayrıntılı bir şekilde incelemenin aracı olarak kültürden bağımsız yöntemlere geçiş yapılmasını gerektirmiştir (Lukhele vd., 2019).

2.4.2. Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan kültürden bağımsız teknikler

Kültüre bağlı yöntemler, doğal ve kontamine olmuş ortamların mikrobiyal ekolojisinin araştırılmasında önemlidir, ancak mikrobiyal genetik çeşitliliğin değerlendirilmesinde son derece önyargıyla yaklaşılmaktadır. Genellikle, organizmanın tanımlanması geleneksel olarak plak sayımı gibi kültürasyon teknikleri ile gerçekleştirilmektedir. Çevresel toplulukların moleküler analizleri, kültüre edilemeyen fraksiyonun herhangi bir örnekte mevcut olan toplam prokaryot sayısının % 99'un üstünde olduğunu ortaya koymuştur (Hugenholtz, 2002; Panigrahi vd., 2019).

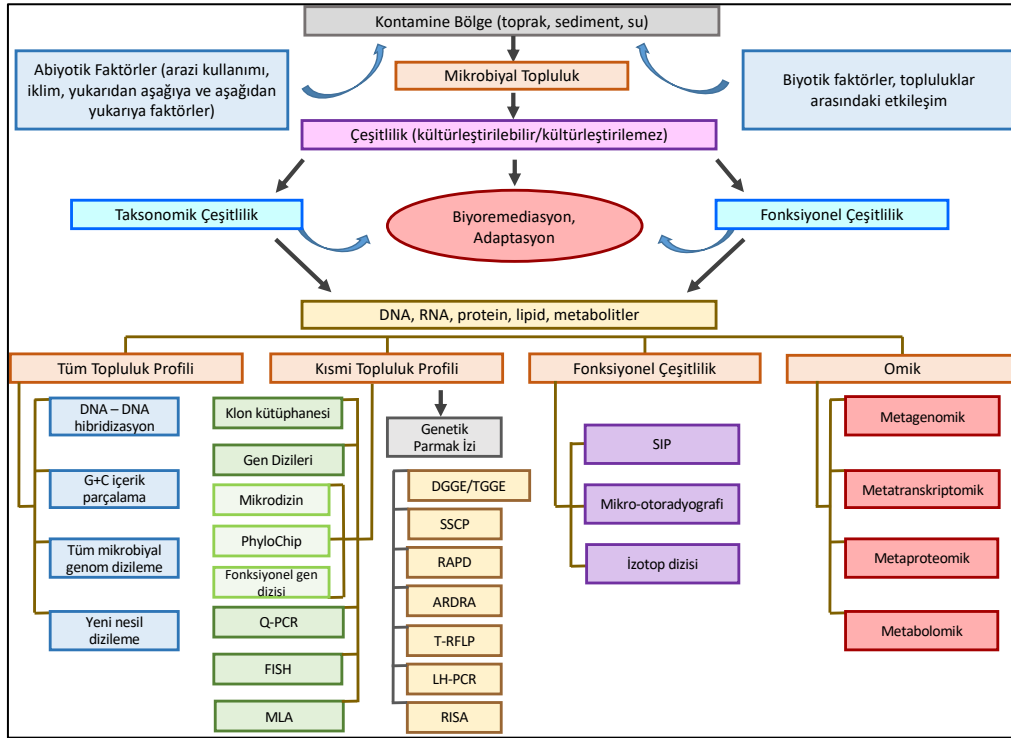
Çevresel değişimlere bir cevap olarak zamansal ve mekansal ölçekte mikrobiyal topluluk bileşimini anlamak için çeşitli ve en yeni biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılmıştır. Bu yeni yaklaşımlar, ortamdaki ekolojik süreçler arasında belirli mikrobiyal popülasyonlarla bağlantıya izin vermekte ve hangi faktörlerin ve kaynakların bir ortamdaki geniş genetik ve metabolik çeşitliliği yönettiği gibi mikrobiyal ekolojideki önemli soruları cevaplamamıza yardımcı olmaktadır (Rastogi ve Sani, 2011; Panigrah, vd., 2019).

Mikrobiyal ekolojideki geleneksel standart kültür teknikleri, mikroorganizmaların karakterizasyonu için Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar, vb. kolayca bulunan ticari besiyerlerini kullanmaktadır. Bununla birlikte kültür bazlı teknikler herhangi bir ortamda bulunan mikroorganizmaların yalnızca küçük bir kısmını (%1) karakterize etmekle sınırlı kalmaktadır. İhtiyaç duyulduğunda, mikrobiyal toplulukların kültüre edilebilen kısımlarını arttırabilmek için besinler, oksijen gradyanı, pH, vs. gibi çeşitli bileşenleri ya da faktörleri geliştirilmiştir. Kültür sürecindeki çeşitli önlemlere ve değişikliklere rağmen, organizmaların tümü kültüre edilememiş olabilmektedir. Doğal ortamda yaşama kabiliyetine sahip, ancak laboratuvar koşullarında yetişmeyen mikroorganizmalar yaşayabilir ancak

kültüre edilemez (VBNC viable but nonculturable-YAKE) olarak adlandırılmaktadır (Oliver, 2005; Panigrahi vd., 2019). VBNC organizmaları tamamen yeni bir grubu temsil eder ve biyoremediasyonda bol veya çok aktif olabilir, ancak standart kültür yöntemleri ile kullanılmaya devam edemez (Rastogi ve Sani, 2011; Panigrahi vd., 2019). Mikroorganizmaların çoğunluğu laboratuarda geliştirilememekte ve bunlarla ilgili temel bilgi kaynağı nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi biyomoleküllerinde bulunmaktadır. Nükleik asit yaklaşımları, prokaryotlar ve ökaryotlar için sırasıyla tüm genomların veya 16S ve 18S rRNA (ribozomal RNA) gibi seçilmiş genlerin analizini içermektedir. Filogenetik markırlar, moleküler çeşitliliğine dayanan kültürden bağımsız topluluk analizi için oldukça güçlü bir ilerlemeye neden olmuş ve mikrobiyal ekolojide çok çeşitli moleküler tekniklerde kullanılmıştır. Çevresel bölgelerdeki mikrobiyal ve işlevsel çeşitlilikteki mikroorganizmaların anlaşılmasında yaygın olarak kullanılmıştır (Nocker vd., 2007; Panigrahi vd., 2019).

Biyolojik bozulma potansiyelini artıran bazı fizyolojik özelliklere sahip olan bir topluluk içindeki belirli alt popülasyonları saptamak için bazı katabolik genler de moleküler belirteçler olarak kullanılmıştır (Torsvik ve Øvreas, 2002; Panigrahi vd., 2019). Klon kütüphaneleri, genetik parmak izi, vb. gibi mevcut tekniklere (Şekil 2.10) ve in situ hibridizasyon, DNA mikroarray, izotop dizisi ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Q-PCR) gibi ileri tekniklere dayanarak araştırılmaktadır. Daha kesin bir şekilde metaproteomik, proteogenomik ve metatranscriptomik gibi post genomik yaklaşımlar, mikrobiyal ekolojisi araştırmalarına, mikrobiyal çeşitliliği ve kontamine olmuş bir bölgenin topluluk kompozisyonunu değerlendirmesine yardımcı olmaktadır.

Şekil 2.10'da fonksiyonel mikrobiyal çeşitliliğin karakterizasyonu ve izlenmesi için kontamine bölgelerdeki biyoremediasyon stratejilerinin şematik gösterimi verilmektedir. Asdofil mikroorganizmaların yaygın olarak kullanıldığı biyoremediasyon yaklaşımında kullanılan teknikler herhangi bir çevredeki komünite belirleme çalışmalarında da uygulanabilmektedir (Panigrahi vd., 2019).



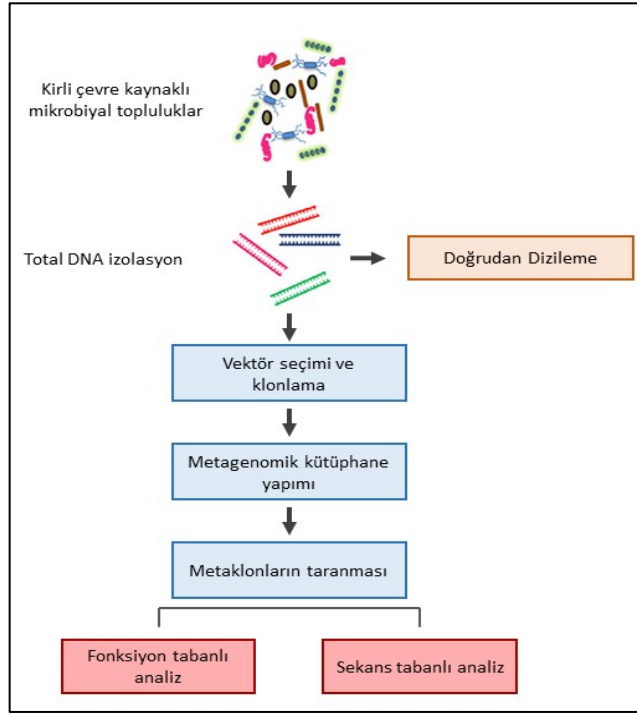
Şekil 2.10. Biyoremediasyon stratejilerinin şematik gösterimi (Panigrahi vd., 2019).

Kültürden bağımsız teknikler tüm topluluk profili oluşturma, kısmi topluluk profili oluşturma, fonksiyonel çeşitlilik belirleme, omik teknolojileri olarak sınıflandırılabilir (Panigrahi vd., 2019).

2.4.2.1. Klon kütüphanesi oluşturma

Klon kütüphanesi oluşturma kısmi topluluk analizi yaklaşımı olarak adlandırılmakta ve genellikle bir çevresel numunenin toplam DNA/RNA'sının mikroorganizmaların karakterizasyonu için kullanıldığı PCR-bazlı yöntemleri takip etmektedir (Şekil 2.11). Bu şekilde üretilen PCR ürünü, VBNC kısmı dahil tüm organizmalardan gelen mikrobiyal gen imzalarının bir karışımıdır. Tüm prokaryotlarda, 16S rRNA gibi korunmuş genlerin PCR amplifikasyonu yapılmaktadır. Yapısal ve işlevsel olarak korunmuş (Hugenholtz, 2002; Panigrahi vd., 2019) ve genellikle mikrobiyal ekolojideki filogenetik analizler için "altın standart" olarak kabul edilmektedir. 16S rRNA dizisinin termolojisinden de anlaşıldığı gibi, bilinen kaydedilmiş mikroorganizmalar ile filogenetik benzerliklere dayanarak, yeni izolatlara bir moleküler dizilim atanmaktadır. RNA polimeraz beta alt birimi (rpoB), giraz beta alt birimi (gyrB), rekombinaz A (recA) ve ısı şok proteini (hsp60) gibi diğer korunmuş

genler de bakteri türlerinin alt popülasyonlarını ayırt etmek için kullanılabilir (Ghebremedhin vd, 2008; Panigrahi vd., 2019). Klon kütüphanesi yöntemleri, genetik parmak izi ve DNA mikroarrayleri, çevresel DNA'nın PCR ile büyütülmüş ürünlerini analiz etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.11. Mikrobiyal topluluk analizi için klon kütüphanesi yöntemi (Panigrahi vd., 2019).

2.4.2.2. Genetik parmak izi teknikleri

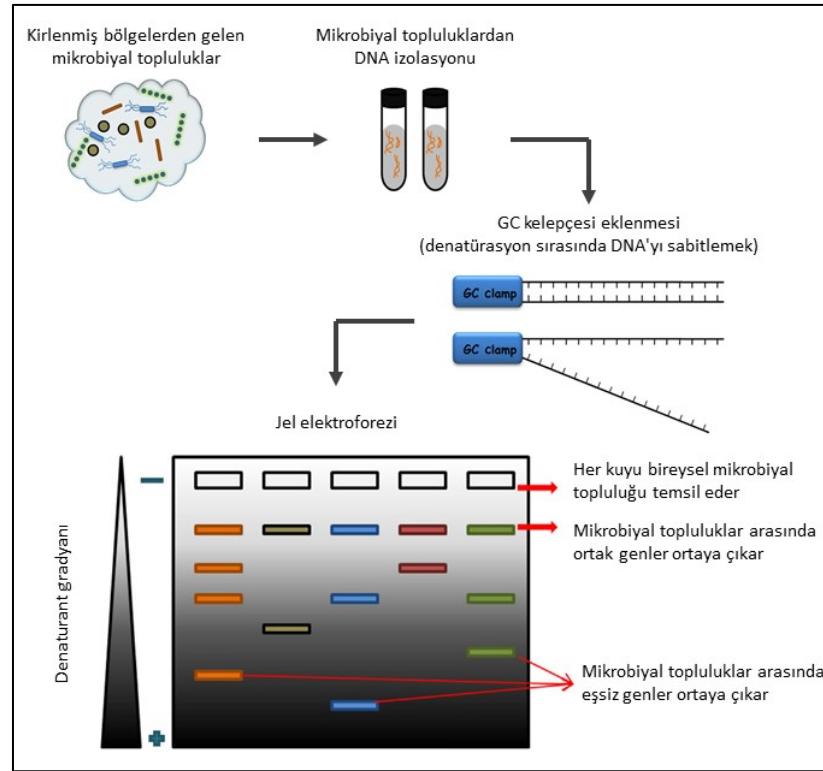
Genetik parmak izi tekniği, PCR ile çoğaltılmış ürünlerin çevresel DNA'nın doğrudan analizine dayanan mikrobiyal toplulukların belirli bir desenini veya profilini sağlamaktadır (Muyzer, 1999; Panigrahi vd., 2019). Bunlar, filogenetik (16S rRNA) PCR amplifikasyonundan sonra ampliconların veya evrensel veya spesifik primerlerin kullanıldığı fonksiyonel genlerin ayrılmasını temel almaktadır. Bu teknikler hızlıdır ve birden fazla örneğin eşzamanlı analizine izin vermekte ve doğrudan taksonomik kimlikler sağlamamaktadır. Mikrobiyal topluluklar arasındaki benzerlik ve farklılıklar, farklı mikrobiyal örneklerin "parmak izlerine" dayanan bilgisayar destekli küme analizi (örneğin GelCompar) kullanılarak karşılaştırılmaktadır.

2.4.2.3.DGGE ve TGGE

Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE), PCR ile güçlendirilmiş spesifik moleküler marker (16S rRNA fragmanları) elektroforezinin, üre ve formamid karışımını içeren DNA denaturantın doğrusal gradientinden oluşan bir poliakrilamid jel üzerinde ayrılmasına dayanmaktadır (Muyzer vd, 1993; Panigrahi vd., 2019) (Şekil 2.12). Fragmanların ayrılması, doğrusal bir DNA denaturant gradienti (DGGE) veya bir lineer sıcaklık gradienti jel elektroforezi (TGGE) içeren iki boyutlu (2B) poliakrilamid jellerinde kısmen erimiş çift sarmallı DNA moleküllerinin elektroforetik hareketliliğinin azalmasına bağlıdır (Muyzer ve Smalla, 1998; Panigrahi vd., 2019). TGGE’de, kimyasal bir denaturant yerine bir sıcaklık gradyanı kullanılmaktadır. Farklı PCR ampliconları arasındaki sekans değişimi, erime davranışında belirleyicidir ve bu nedenle farklı sekanslara sahip ampliconlar, jelde farklı pozisyonlarda göçü durdurmaktadır. Hem DGGE hem de TGGE’de, iki DNA şeridinin tamamen ayrılmasını önlemek için, PCR aşaması sırasında bir 5’-GC kuyruklu (30-50 nükleotit) ileri primer kullanılmaktadır. Amplifiye edilmiş DNA fragmanları genellikle 500 bp boyutunda sınırlıdır ve dizi farklılıkları tarafından yönetilen erime davranışlarına dayanılarak ayrılmaktadır. DGGE veya TGGE sırasında üretilen bantların sayısı, genellikle numunedeki baskın mikrobiyal takson sayısı ile ilişkilidir. Böylece, karışık ampliconların karmaşık bir topluluktan denatüre gradyanlar aracılığıyla elektroforezi, jelde farklı göç mesafelerinde bantlardan oluşan bir parmak izi ile sonuçlanmaktadır (Chakraborty ve Das, 2014; Panigrahi vd., 2019) Tek tek bantlar, spesifik taksonomik grupları tanımlamak için jelden çıkarılabilir, yeniden çoğaltılabilir ve nihayetinde moleküler problemlere dizilebilir veya hibritlenebilir. Bu özel özellik, mikrobiyal çeşitliliğin büyük oranda bilinmediği çevresel örnekler açısından son derece önemlidir (Chakraborty ve Das, 2014; Panigrahi vd., 2019; Lukhele vd., 2019). AMD'deki sınırlı takson baskınlığı nedeniyle, DGGE baskın topluluk üyelerine yönelik bir sayımı sağlamak ve zamanla ölçekler üzerinde çevresel parametrelerle nasıl ince ayar yapıldığını belirlemek için başarıyla uygulanmaktadır (Lukhele vd., 2019).

Bununla birlikte, DGGE / TGGE ile ilgili belirli sınırlamalar vardır : 1) sınırlı dizi bilgisi sağlanması (<500 bp), 2) çoklu rRNA operatörleri arasında sekans heterojenliği şansı, 3) farklı DNA fragmanları benzer erime noktalarına sahip olması 4) poliakrilamid jel

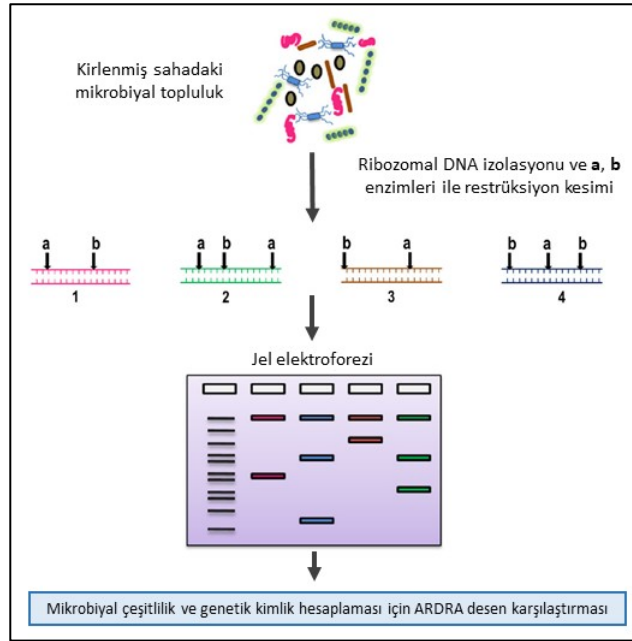
elektroforezi ile ayrılabilen farklı DNA fragmanlarının sınırlı sayıda olması (Rastogi ve Sani, 2011; Panigrahi vd., 2019).



Şekil 2.12. Denatüre gradyan jel elektroforezinin şematik gösterimi (Panigrahi vd., 2019).

2.4.2.4. Amplifiye ribozomal DNA restriksiyon analizi ve terminal restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi

ARDRA, bakterilerin 16S rRNA'sını kodlayan genine RFLP'nin (Restriction Fragment Length Polymorphism), uzantısıdır (Smit vd, 1997; Panigrahi vd., 2019). Teknik, 16S rRNA geninin ucundaki korunmuş bölgelere yönelik primerleri kullanan bir enzimatik amplifikasyon ve dörtlü kesen restriksiyon enzimleri (örn., *AluI* ve *HaeIII*) kullanılarak gerçekleştirilen kesimi içermektedir. Kesilen fragmanlar agaroz veya poliakrilamid jel üzerinde ayrılmaktadır. Elde edilen profillerin analiz edilen türlerin temsilcisi olduğu öngörülmektedir. Çeşitli enzimlerinden elde edilen profiller, kültürlü izolatları ve topluluk DNA'sından klonlama yoluyla elde edilen 16S rRNA genlerini filogenetik olarak karakterize etmek için kullanılabilir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Amplifiye edilmiş ribozomal DNA restriksiyon analizinin şematik gösterimi (Panigrahi vd., 2019).

T-RFLP'de, mikrobiyal topluluk yapısı ve çeşitliliği, flüoresan boyalarla etiketlenmiş ve kısıtlama endonükleazlarıyla kısa parçalara sindirilen kısa PCR ampikonlarının çözünürlük modellerinden çıkarılmaktadır (Lukhele vd., 2019).

AMD sistemlerindeki T-RFLP uygulamaları çoğunlukla prokaryotik topluluklar üzerindeki mekansal-zamansal değişikliklerin incelenmesi ve genetik yapıdaki değişimlerin çevresel parametreler veya olaylar ile korelasyonu ile sınırlı kalmıştır (Lukhele vd., 2019).

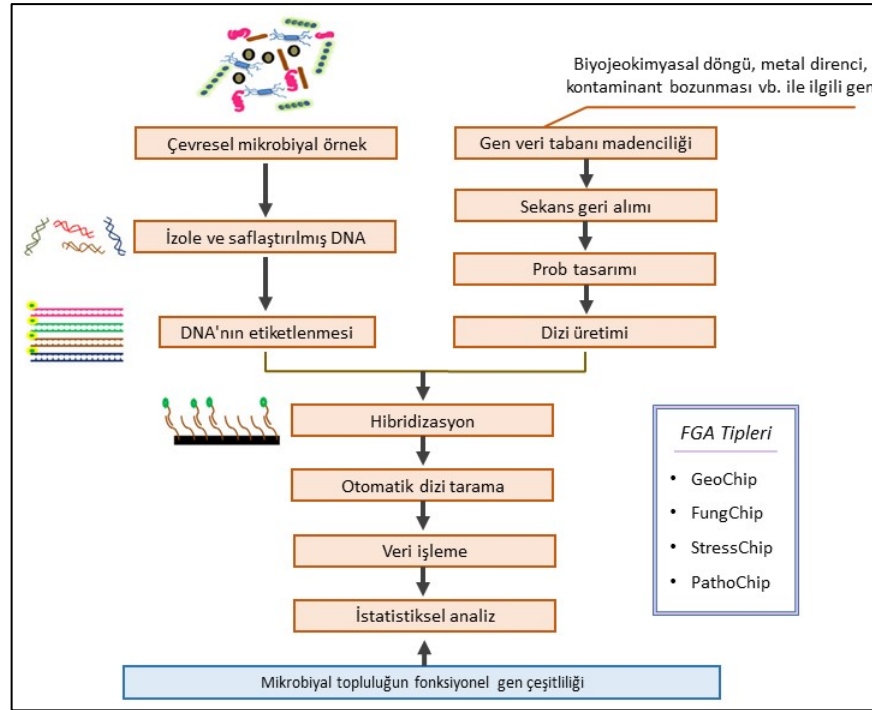
Uygulamaları ve geçici veya mekansal olarak çözülebilen birden fazla AMD mikrobiyal topluluğunun hızlı karşılaştırmalı analizi için uygulamalarına ve kullanımına rağmen, parmak izi teknikleri mikrobiyal toplulukların kapsamlı analizi için daha az idealdir. Bunlar, taksonomik bağlantılar için düşük çözünürlük ve düşük hassasiyete sahip emek yoğun olmaktan muzdariptir. Parmak izi tekniklerinin, esas olarak DNA ekstraksiyonu ve genlerin amplifikasyonu sırasında ortaya çıkan yanlılığa sahip olduğu da belirtilmelidir. DNA ekstraksiyonu özellikle düşük mikrobiyal biyokütle ve metal iyonları gibi olası kirletici maddelerin yüksek içeriği nedeniyle AMD sistemlerinde zordur. Bununla birlikte, bu teknikler daha derinlemesine analiz için başlangıç, temel bilgi olarak algılanabilen

mikrobiyal topluluk yapısının bir görüntüsünü sağlamada daha yararlıdır (Lukhele vd., 2019).

2.4.2.5.Fonksiyonel mikrobiyal çeşitlilik

Fonksiyonel mikrobiyal çeşitlilik ve mikrobiyal fonksiyonları etkileyen faktörler ile ilgili bilgiler, kirlenmiş (kontamine) alanların biyolojik olarak düzeltilmesi (biyoremediasyon) için çok önemlidir. Yerli mikrobiyal popülasyon, kontaminant azaltma sürecinde önemli bir role sahiptir. Mikrobiyal topluluk, belirli bir alanda kontaminant artışı ile önemli ölçüde değişmektedir. Genellikle, toleranslı türler, kontaminant maddelerin baskısından kaynaklanan doğal seleksiyon nedeniyle baskın hale gelmektedir (Margesin vd., 2003; Head vd., 2006; Panigrahi vd., 2019). Diğer çevresel değişkenler ayrıca bölgesel iklim (Bhattacharya vd., 2003; Maila vd., 2006; Panigrahi vd., 2019), toprak tipi ve özellikleri (Hamamura vd., 2005; Panigrahi vd., 2019), ile bitki örtüsü (Joner vd., 2001; Panigrahi vd., 2019) gibi faktörler mikrobiyal dağılımı etkilemektedir. Çalışmaların çoğu filogenetik kompozisyon üzerinde durmakta, bununla birlikte, mikrobiyal fonksiyonel yapılar hakkında bilgi ve kirlenmiş sahalardaki çevresel değişkenlerle olası ilişkisi yetersizdir. Çevresel numunelerden ekstrakte edilen RNA, aktif mikrobiyal toplulukları ve uykuda olan mikrobiyal toplulukları ortaya çıkarmak için DNA'dan daha değerli bilgiler sağlar (Torsvik ve Øvrea 2002; Panigrahi vd., 2019). Bu, rRNA ve mRNA'nın fonksiyonel olarak aktif mikrobiyal popülasyonların göstergeleri olarak kabul edilmesinden kaynaklanmaktadır. Bir hücredeki rRNA'nın miktarı, bakterilerin büyüme aktivitesi ile kabaca ilişkilidir ve fonksiyonel genlerin mRNA'sı, spesifik koşullar altında anahtar enzim aktivitelerini gerçekten eksprese eden bakterilerin saptanmasına ve tanımlanmasına izin verir (Wellington vd., 2003; Panigrahi vd., 2019). Anahtar mikrobiyal süreçler hakkında bilgi edinmek için izole edilen *amoA* (amonyak oksidasyonu), *nifH* (azot fiksasyonu), *nirK* ve *nirS* (denitrifikasyon) ve *dsrA* (sülfat indirgemesi) gibi birçok gen, mikrobiyal toplulukların DNA / RNA'sından çoğaltılmıştır (Hansel vd., 2008; Panigrahi vd., 2019). Mikrobiyal katabolik çeşitlilik ayrıca, kitin, selüloz ve lipitler gibi spesifik karbon substratlarının kullanımında yer alan enzim kodlayan genler tarafından da incelenebilmektedir (Torsvik ve Øvrea, 2002; Panigrahi vd., 2019). Buzul topraktaki lipaz üreten mikroorganizmaların çeşitliliği, lipaz genlerinin PCR amplifikasyonu ile araştırılmış ve sekans analizi, toprakta birkaç yeni lipaz üreten organizmanın varlığını göstermiştir (Yuhong vd., 2009; Panigrahi vd., 2019). Stabil

izotop problama (SIP), mikroatoradiografi-FISH (MAR-FISH) ve Raman-FISH gibi stabil izotopları kullanan daha ileri yöntemler, mikrobiyal toplulukların metabolik aktiviteleri hakkında daha ayrıntılı bilgiler sunmaktadır (Şekil 2.14).

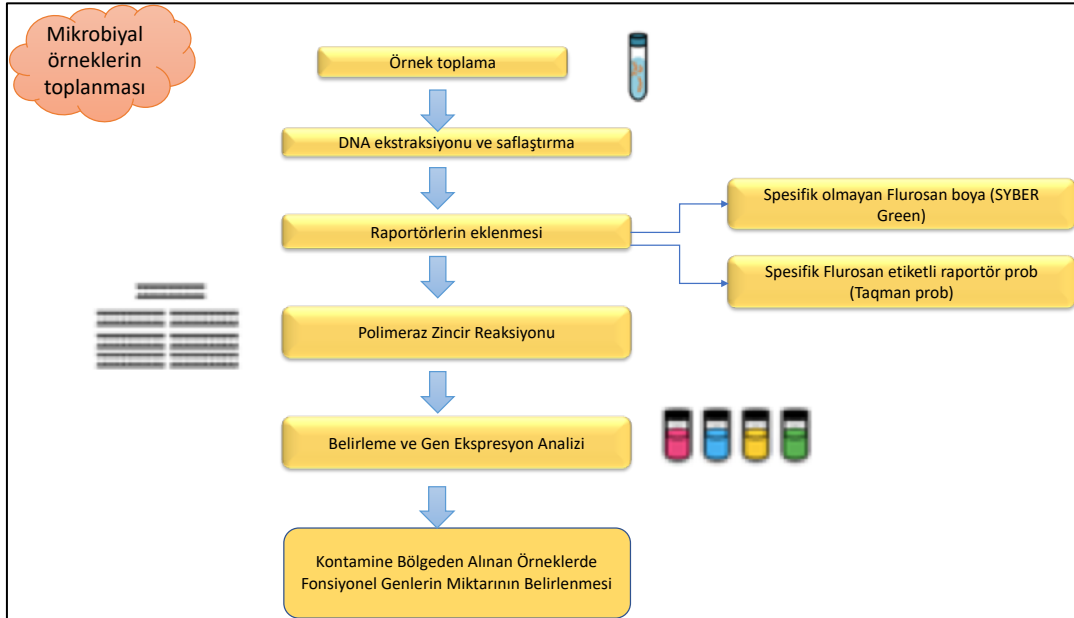


Şekil 2.14. Fonksiyonel gen dizisi için tipik bir iş akış gösterimi (Panigrahi vd., 2019)

2.4.2.6. Q-PCR

Q-PCR veya gerçek zamanlı PCR, taksonomik ve fonksiyonel gen markerlerinin bolluğunu ve ekspresyonunu ölçmek için mikrobiyal araştırmalarda kullanılan doğru ve hızlı bir yöntemdir (Bustin vd., 2005; Smith ve Osborn, 2009). Geleneksel PCR, amplifiye edilmiş genlerin uç nokta tespitine dayanır, ancak Q-PCR, PCR'nin her döngüsü sırasında gerçek zamanlı olarak ampliconların birikimini ölçmek için ya SYBR GREEN ya da 47opluyum probları (TaqMan) gibi birbiriyle ilişkili boyaları kullanmaktadır (Rastogi vd, 2009). Üstel fazda her döngüde yayılan flüoresans miktarını izleyerek, hedef şablonun başlangıç miktarını hesaplamak mümkündür. Gerçek zamanlı PCR, nicelik sınırı tipik olarak bir ila iki genom kopya olduğundan oldukça hassastır (Inglis ve Kalischuk, 2004). Hangi genin araştırıldığına bağlı olarak, Q-PCR analizi, kirlenmiş bölgelerdeki numunelerin fonksiyonel genlerini ölçebilmektedir. Milyonlarca başka gen içeren doğal numunelerdeki özel düşük-bol (low-abundance) genlerin seçerek büyütülmesi (ve tespit edilmesi) için

spesifik primerler gerekir (Şekil 2.15). Mikroarray-tabanlı bir yaklaşım PCR'den 100 ila 10,000 kat daha az hassas olabilir (Eyers vd., 2004). Amplikonların miktarı gerçek zamanlı olarak izlendiğinden, PCR ürünlerinin ölçümü için herhangi bir PCR sonrası adım gerektirmez.



Şekil 2.15. QPCR analizinin şematik anlatımı (Panigrahi vd., 2019)

2.4.2.7. Fluoresans in situ hibridizasyon

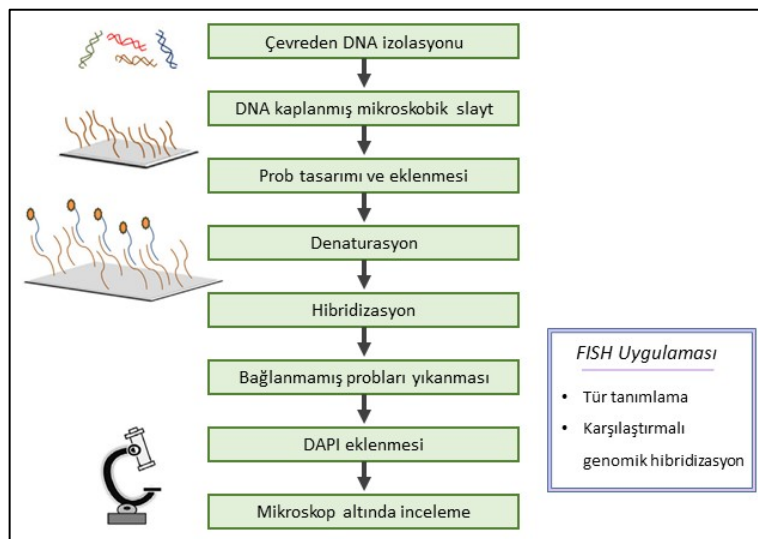
Fluoresans In Situ Hibridizasyon (FISH), karışık topluluklardaki metabolik olarak aktif mikroorganizmaları tanımlamak ve nicelleştirmek için kullanılan ve floresan prob lar ile hücrelerin içindeki nükleik asitlerin spesifik tamamlayıcı bölümleri arasında önceden ekim yapmadan hibridizasyon reaksiyonu ile kullanılan moleküler bir tekniktir (Lukhele vd., 2019). FISH, bir ortamdaki mikrobiyal topluluk dinamiklerini değerlendirmede diğer moleküler tekniklerle birlikte yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Malik vd., 2008; Rastogi ve Sani, 2011; Richardson vd., 2002).

Hibridizasyon reaksiyonu epifluoresans/konfokal mikroskopisi ve nadiren de flow sitometri ile tespit edilerek ölçülmektedir. Hem kültüre edilebilen hem de kültüre edilemeyen mikroorganizmaların morfolojisi, miktarı ve mekansal dağılımları bakımından

mikrobiyal toplulukların yapısının daha ayrıntılı bir resmini vermektedir (Lukhele vd., 2019).

Ekstrem ortamlardan biri olan AMD'deki mikrobiyal topluluklar çoğunlukla aktif hücrelerden ve daha az aktif olmayan hücrelerden oluştuğu için oligonükleotit problemleri ile tespit edilmeyi daha mümkün kılmaktadır (Lukhele vd., 2019).

Diğer ileri moleküler tekniklerle birleştirildiğinde farklı FISH tipleri ortaya çıkmaktadır. Bir bölgedeki mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini ve fonksiyonel özelliklerini anlamak için FISH, MAR (mikroatoradiografi) (MAR-FISH) ile birleştirilmektedir (Wagner ve diğerleri, 2006) (Şekil 2.16). MAR-FISH, uygun izotop etiketli substratlar kullanarak bakterilerin ve spesifik yerinde (in situ) etkinliklerinin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır. STAR (substrat izleme otoradyografisi)-FISH, aynı prensiplere sahip olmalarına rağmen, metodolojide MAR-FISH'den farklıdır. Katalize edilmiş raportör birikme (Catalyzed reporter deposition)-FISH (CARD-FISH), artan hassasiyet ve güvenilirliğe sahip başka bir FISH versiyonudur. Hibritleştirilmiş hücrelerin sinyal yoğunluğu, tiramit sinyal amplifikasyonu (TSA) ile birlikte peroksidaz etiketli oligonükleotit problemleri kullanılarak enzimatik sinyal amplifikasyonu ile arttırılmaktadır. TSA, türevlendirilmiş tiramit kullanılarak patentlenmiş CARD tekniğine dayanmaktadır (Chakraborty ve Das, 2014).



Şekil 2. 16. Floresan in situ hibridizasyon yönteminin şematik gösterimi (Panigrahi vd., 2019)

2.4.2.8.Yeni nesil moleküler teknikler

Bilim adamları ve toplum, insanların hem insan genomunu hem de mikrobiyal genomu barındıran süper organizmalar olduğu gerçeğini kabul etmektedir. İnsan ve kendisi ile ilişkili mikrobiyota arasındaki karmaşık ilişkinin ve bu ilişkinin her iki ortağının nasıl modüle edildiğini veya etkilediğinin araştırılmasının zamanı olduğu düşünülmektedir. Bu açıklamadan yola çıkarak araştırmaların hayvan ve bitki krallıklarına ve bütünsel olarak Dünya'nın biyomuna genişletilebileceği düşüncesi hakim olmaktadır. Doğa gereği, tüm Dünya'nın biyomlarının evrimi ve işlevi, mikroplarla fiziksel çevre arasındaki sayısız etkileşimlerden etkilenmektedir.

Metagenomik terimi ilk kez 1998 yılında Handelsman ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Handelsman vd., 1998) ve çevresel örneklerde yer alan mikrobiyal genomların fonksiyonel ve dizi temelli analizleri için kullanılmaktaydı. Shotgun metagenomik, bir çevresel örnek içinde mevcut genomların çoğunu tam olarak dizileme kapasitesine sahiptir. Bu, bilinen ve bilinmeyen organizma soylarının fonksiyonel analizi ile ilişkilendirilerek biyoçeşitlilik profiline oluşturmaktadır. Shotgun metagenomik ile çevresel toplulukta kimlerin var olduğu, fonksiyonel olarak ne yaptıkları ve ekolojik konumda nasıl bir etkileşim içinde oldukları sorularına yanıtlar alınmaktadır. Günümüzde ise ilgili genin polimeraz zincir reaksiyonunun kullanıldığı marker gen metagenomik yaklaşımı ön plana çıkmaktadır (Oulas vd., 2015).

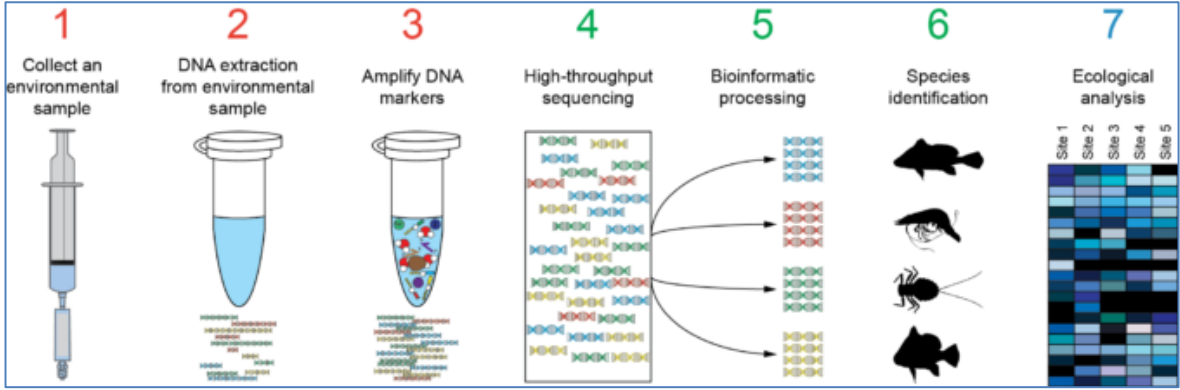
İlgili genlerin kullanıldığı Marker gen metagenomikleri, korunmuş olan 16S rRNA gen bölgesinin PCR ile çoğaltılarak parmak izi ya da taksonomik dağılımının hızlı ve doğru bir şekilde elde edildiği yaklaşımdır. Bu yaklaşım, mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında son zamanlarda önemli ölçüde ilgi görmüştür (Oulas vd., 2015). Amplikon bazlı dizilemede, küçük alt-birim (SSU) rRNA marker genleri, hiperdeğişken bölgeleri hedefleyen primerleri kullanarak amplifiye edilmekte ve bir mikrobiyal topluluğun taksonomik yapısının profilini çıkarmak için dizilenmektedir. Ayrıca, özel algoritmalar kullanan gen anotasyonları sayesinde, mikrobiyal toplulukların işlevsel yeteneklerini tahmin etmek mümkün olmaktadır (Lukhele vd., 2019).

Klon kütüphanesi dizileme çalışmalarındaki sınırlamalar, bir anda işlenebilecek örnek sayısını kısıtlayan ve böylece ayrışmayı riske atan tüm süreci kısıtlayan bir özelliği olmuştur. NGS kullanılarak yapışam amplikon bazlı gen dizilimi, yüksek çözünürlükte büyük miktarlarda ekolojik numunelerin işlenmesinin mümkün olduğu diğer Sanger dizileme tekniklerine göre avantajlar göstermektedir. Bu, yerel, bölgesel ve küresel mikrobiyal çeşitlilik modellerini çözmeyi mümkün kılmaktadır (Lukhele vd., 2019).

Bu nedenle, bu teknik, taksonomik ve filogenetik olarak profillenmiş mikrobiyal topluluklar için en hızlı ve en ucuz deney olarak ortaya çıkmaktadır. AMD'lerin baz alındığı çoğu çalışmada, uzun okuma uzunlukları nedeniyle ROCHE 454 pyrosequencing platformunu kullanılmıştır, ancak 2015'te kullanımdan kaldırılmasıyla Illumina, tercih edilen bir platform haline gelmiştir (Lukhele vd., 2019).

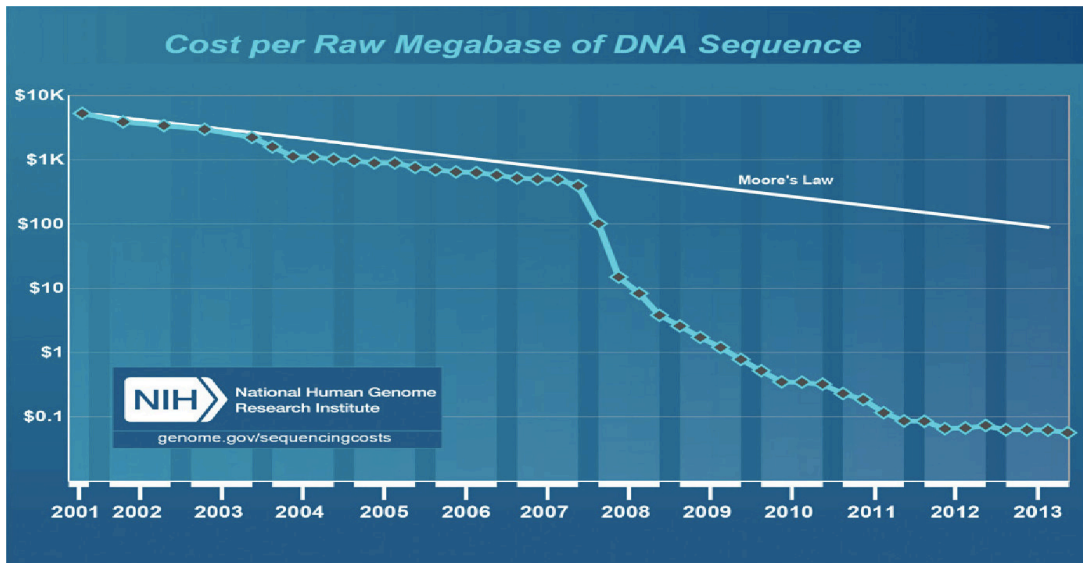
Mikrobiyal çeşitliliğin düşük olduğu ekstrem çevreler metagenomik çalışmalar için daha ideal görülmektedir (Valenzuela vd., 2006; Oulas vd., 2015). Aynı zamanda genomik düzenlemeler ve gen delesyon ya da insersiyonları bu çevrelerde çok düşük olduğu için kültürden bağımsız çalışmaların kullanılması açısından uygun görülebilmektedir (Tyson vd., 2004). Tyson vd., AMD çevrelerinde ilk kez metagenomik yaklaşımı kullanmış, random shotgun dizileme tekniği aracılığıyla AMD'de bulunan biyofilmin çeşitliliğini araştırmışlardır (Tyson vd., 2004). Handelsmann ve arkadaşları da, Richmond madeninin asit drenajındaki kültüre edilemeyen mikroorganizmaları metagenom yaklaşım ile ortaya koymuştur (Handelsmann, 2004). Literatürde AMD'lerdeki mikrobiyal çeşitliliğin metagenomik teknik ile çalışıldığı çok az sayıda çalışmaya rastlanmaktadır (Bertin vd., 2011; Liljeqvist vd., 2015; Chen vd., 2015; Hua vd., 2015).

Metagenomiğin genel tanımı, çevre temelli örneklemede mikroorganizmaların toplam genomlarının genetik bilginin kültürden bağımsız analizidir. DNA molekülünü hedef alailen dizilerin genetik bilgisinde odaklanmaktadır. Daha sonraki analizler yalnızca henüz açıklanamayan genleri içeren sekans korunumu, filogenetik, filogenomik, fonksiyon veya genetik çeşitlilik sunumuna odaklanmaktadır. Varılacak hipotezlerin, soruların ve hedeflerin çeşitliliği sınırsızdır ve birincil tasarım, analiz edilecek malzemenin doğasına ve birincil fonksiyonuna dayanmaktadır (Izard ve Rivera, 2014) (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Metagenomik çalışmaların tasarımı (Birtel vd., 2015)

Dizileme maliyetleri yıllar geçtikçe keskin bir şekilde azalmaktadır (Şekil 2.18), pek çok yeni araştırmalarda önceleri daha maliyetli olmaktadır. Dizilemede baz başına düşen maliyet azalmasına rağmen, toplam çalışma maliyeti hala önemli ölçüde yüksektir; çünkü çalışma başına megabaz dizileme sayısı sabit şekilde artmaktadır. Başlangıç maliyeti bazı projeler için hala yüksek olabilmektedir. Aynı parametreler temel alındığında, geleneksel teknikler (PCR-DGGE, klonlama çalışmalarını takip eden Sanger dizileme ve mikroarray yaklaşımlar) hala kullanılmaktadır. Hangi dizileme platformunun kullanılacağı ile ilgili bilimsel çalışmaların çeşitliliği nedeniyle önerilen tek bir yaklaşım bulunmamaktadır. Literatürün detaylı bir şekilde gözden geçirilmesi, meslektaşlarla tartışma ve dizileme olanakları, maliyet, uygunluk, geri dönüş süresi ve proje kapsamı karar alma sürecinin bir parçası olmaktadır.



Şekil 2. 18. DNA dizilemenin yıllara göre maliyeti (Izard ve Rivera, 2014)

Bu tür karar verme aşamalarında hipotez ve amaç başlıca düşünülmesi gereken parametrelerdir ve Çizelge 2.2 farklı ileri teknoloji dizileme teknolojilerinin özellerini göstermektedir. Her bir dizileme platformu, okuma uzunluğu, AT veya GC bakımından zengin bölgelerdeki önyargılar ve homopolimerleri dizileme yetenekleri ile ilgili kuvvetli ve zayıf yanlarıyla karakterizedir.

Metagenomik gibi DNA bazlı moleküler tekniklerin uygulanması, mikrobiyal toplulukların filogenetik ve fonksiyonel çeşitliliği hakkında yeni bilgiler ortaya çıkarmaktadır. DNA tabanlı tekniklerin sınırlamaları, in situ koşullar altında gerçekleştiği gibi gen ekspresyonu (işlevselliği) hakkında bilgi vermemektedir (Wilmes ve Bond, 2006). Kontamine bir ortamdaki işlevsel mikrobiyal çeşitlilik, büyük ölçekli sıralama teknikleriyle ayrıntılı bir şekilde belirlenebilir (Zwolinski, 2007). Kültüre edilemeyen mikroorganizmalardan genomik dizileri içeren komple metagenomik veritabanlarında, genetik potansiyel ve mikrobiyal toplulukların işlevselliği arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmak için metagenomik, metaproteomik, metatranscriptomik ve metabolomik gibi postgenomik yaklaşımları uygulamayı mümkün kılmaktadır. Büyük ölçekli sekans tekniklerinin, yüksek hızda düşük maliyetle milyarlarca okuma yapabileceği kabiliyeti uygulamaların çoğunda kullanışlıdır. Bu tür sekans teknikleri çoğu zaman yeni nesil sekans (NGS) olarak adlandırılır. Roche/454, MiSeq, Illumina/Solexa, Life/APG, İyon Torrent ve HeliScope/Helicos BioSciences gibi NGS platformları, geleneksel Sanger'ın klonlanmış ampliconların dideoksi sekansından çok daha hızlı ve ucuz olduğu bilinmektedir (Metzker, 2010; Mardis, 2013).

Çizelge 2.2. Dizileme Platformları ve Özellikleri

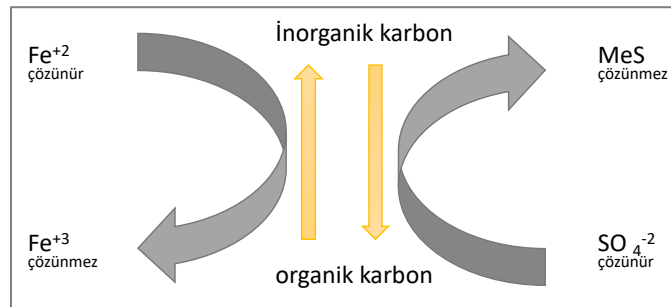
Sequencer	Read Length (b) _a	Run Time (h) (d) _b	Reads Per Run	Yield (b) _a	Mate Pair Information	Use in Metagenomics
ABI 3730xl _c	500–900	6–10 h	–	0.05–0.08 Mb	Yes	Not anymore
Roche 454 GS Junior _a	~400	10 h	~100,000	35 Mb	No	Yes
Roche 454 GS FLX _a	~700	23 h	1 million	700 Mb	No	Yes
Illumina MiSeq _a	~300	5–65 h	25 million	0.3–15 Gb	Yes	Yes
Illumina NextSeq 500	~300	12–30 h	130–400 million	20–120 Gb	Yes	Yes

Çizelge 2.2 (devam) Dizileme Platformları ve Özelliklerid

Sequencer	Read Length (b) _a	Run Time (h) (d) _b	Reads Per Run	Yield (b) _a	Mate Pair Information	Use in Metagenomics
Illumina HiSeq 2500 _a	~125–150	7 h to 6 d	300 million to 2 billions	10–180 Gb	Yes	Yes
Illumina HiSeq X _a	~150	<3 d	3 billions	1.6–1.8 Tb	Yes	Not yet
5500 SOLiD _a	~60	7 d	–	90 Gb	Yes	Yes
5500xl SOLiD _a	~60	7 d	–	300 Gb	Yes	Yes
Ion PGM system _c	~200 or ~400	2–4 h or 4–7 h	0.4–0.5 million on 314 chip 2–3 million on 316 chip 4–5.5 million on 318 chip	30–100 Mb on 314 chip 300 Mb to 1 Gb on 316 chip 600 Mb to 2 Gb on 318 chip	No	Yes
PacBio RS II SMRT _c	4200–8500	0.5–3 h	50,000 per cell	275–375 Mb	No	Yes

2.5.Biyoteknolojik Uygulamalar

Organik kirleticilerin remediasyonu genellikle karbondioksitde mineralize olmaları ile sonuçlanmaktadır. Diğer bir aşımam metal kirleticilerin giderilmesi, genellikle metallerin çözültiden uzaklaştırılmasını içermektedir. Bu işlem ferröz demirin çöken ferrik hale geldiği oksidasyon reaksiyonu gibi redoks halinin dönüşümüyle ya da kalkolfilik metallerin çözünmez metal sülfürler olarak çöktürmelerindeki gibi çözünmez minerallerin oluşumuyla gerçekleşmektedir. Şekil 2.19’da asidofil mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen ana oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları gösterilmiştir (Hallberg, 2010).



Şekil 2.19. Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları (Hallberg, 2010)

AMD'de, oksidatif reaksiyonlar genel olarak inorganik karbon kullanılarak ototrofik demir oksitleyici asidofil mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilirken, indirgeyici

reaksiyonlar ise elektron verici ve karbon kaynağı olarak organik karbon kullanan asidofil mikroorganizmalar tarafından desteklenmektedir. AMD'de geçiş metallerinin doğal olarak etkisiz hale gelmesi, çoğunlukla demirin oksidasyonu sonucunda çökmesi ve diğer metallerin ve metaloidlerin, oluşan ferrik minerallere adsorpsiyonu nedeniyle gerçekleştiği bilinmektedir (Hallberg, 2010).

Demir oksidasyonunu arttırmak için uygulanan yöntem, sabit yataklı biyoreaktörlerin kullanımıyla demir oksitleyici asidofillerin sayısının artırılmasıdır. Yapılan bir araştırma, bu tür sistemlerdeki çeşitli demir oksitleyici asidofil mikroorganizmaların yararlarını araştırmıştır (Rowe ve Johnson, 2008). Kullanılan suşların hepsinin benzer oksidasyon hızları göstermesine rağmen *L. ferrooxidans* ve *F. myxofaciens* ile biyoreaktör atıklarında en düşük Fe^{+2} konsantrasyonlarının elde edilmesi, bu asidofillerin ferröz demiri düşük seviyelere okside etme kabiliyetinde farklılıklar olduğunu göstermiştir. Çeşitli biyoreaktörlerden çıkan atık sularındaki ferröz demir farklılıklarının, bu asidofillerin ferröz demir afinitesindeki değişikliklerden kaynaklandığı ileri sürmüştür. Ayrıca, bu mikroorganizmaların karışık topluluklarının biyoreaktörlerde ferröz demirin oksidasyonunu sağlamak için kullanılabilmesi ve değişik kimyasalların AMD'sinin tedavisi için tek bir organizmanın biyoreaktöründe büyütülmesinden daha iyi olabileceği önerilmiştir (Hallberg, 2010).

Asidofil (veya aside toleranslı) sülfat indirgeyen bakterilerin izolasyonu, AMD'nin yeni bir iyileştirme stratejisinin geliştirilmesine izin vermektedir (Johnson vd., 2006), böylelikle metaller, reaktif S^{-2} konsantrasyonunu, biyoreaktör pH'ının ilgili çözünürlük ürünlerinin kontrolü yoluyla denetleyerek metal sülfidler olarak seçici şekilde geri kazanmaktadır. Bu yaklaşım, yalnızca AMD'den toksik metallerin etkili şekilde çıkarılmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda atıkların faydalı bir ürüne dönüşmesine izin vermektedir. Ayrıca, baz metallerin geri kazanılması ve kullanılması, şu anda metal bakımından zengin atık atıkların giderilmesinde kullanılan işlemler tarafından üretilen toksik atıkların miktarını azaltacağı düşünülmektedir. Bu yaklaşımın ilginç ve yeni bir varyasyonunda (Jameson vd., 2010), *A. ferrooxidans* ve *A. ferrivorans*'ın sülfijenezinden yararlanılmış ve bu bakteriler, bugüne kadar izole edilmiş SRB'den daha düşük pH (3) ortamında ve her iki metal sülfidin oluşabileceği yerde sülfid üretebildiğinden, CuS ve ZnS'nin daha verimli bir şekilde çökeltmesinde kullanılmıştır (Hallberg, 2010).

Altın, bakır ve diğer metallerin cevherlerinin işlenmesi için asidofil mikroorganizmaların kullanılması (biyomadencilik) ile biyoteknolojinin ana alanlarından birinde ortaya çıkmaktadır. Öte yandan, aynı mikroorganizmalar yaygın çevre kirliliğine neden olan asidik metal üreten ya da içeren atıkların meydana gelmesinden de sorumludur. Sağladıkları net faydaları vurgulamak için bu mikroorganizmaların olumlu yönlerinden faydalanma ve aynı zamanda zararlı çıkarlarını sınırlandırılması ihtiyacı doğmaktadır. Bu amaca ulaşmak için, asidofil mikrobiyolojisinin uygulamalı (örneğin, biyomühendislik) yönlerinin yanı sıra temel (örneğin biyokimya, moleküler biyoloji) anlayışında genişletilerek kullanılması gerekli olacaktır (Johnson, 1998).

Asidofil mikroorganizmalar ticari olarak sadece biyo-maden işlemlerinde kullanılmıştır. Asidofil bakteri ve arkeaların teoride, AMD'nin biyolojik olarak iyileştirilmesi de dahil olmak üzere potansiyel kullanımda olabileceği başka durumlar da vardır. Üretilen ferrik demirin hidrolizine ve çökmesine neden olacak asitli atık sularındaki (pH > 2.5'de) ferröz demiri oksitlemek için immobilize edilmiş *At. ferrooxidans* popülasyonlarının kullanılması, kimyasal işleme alternatif olarak veya bununla birlikte uygulanabilirliğini düşündürmektedir (Gomez vd, 2000; Nemati ve Webb, 1999). Demir indirgeyen asidofillerin (örn. sabit yataklı reaktörlerde), aşırı asidik maden atıklarının biyo-saflaştırılması için yeni bir iki-fazlı yaklaşımın parçası olarak, ferrik demirin ferröz demire hızlı ve verimli bir şekilde indirgeyebildiği gösterilmiştir (Johnson vd., 2000). Asidtolerant (pH 3 ve üzerinde büyüyen) sülfat indirgeyen bakteriler, "asit streamer'lar"dan (mikropların makroskobik büyümeleri) ve anoksik sedimentlerden izole edilmiştir (Johnson vd., 1993; Sen ve Johnson, 1999). Bunlar asitli atık sularında hidrojen sülfür (ve alkalinite) üretmek için düşünülebilir; halen aside duyarlı sülfidojenik bakterileri AMD'nin toksik etkilerinden korumak için çevrimdışı SRB reaktörlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Son olarak, asidofilik prokaryotların kayda değer bir potansiyele sahip olabileceği biyoteknoloji alanlarında henüz keşfedilmemiştir (örneğin, asit ve muhtemelen ısıya toleranslı enzimlerin kaynakları ve organik kirleticilerin biyobozunması) (Hallberg ve Johnson, 2001).

Literatürde asidofil mikroorganizmaların izolasyonunun ve karakterizasyonunun yapıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Johnson vd, 1992; Zhang vd, 2013; Johnson, 1998; Aytar vd, 2015;). Ülkemizde işletilmiş veya işletilmeye devam eden maden yataklarından kaynaklanan asit maden drenajlarının mikrobiyal kommünite analizi üzerine şu ana kadar az

sayıda yapılmış tez çalışması bulunmaktadır (Vardar, 2011; Aytar, 2012; Gül, 2014; Sağlam, 2015; Toptaş, 2016).

Aytar (2012), Çan ve Balya bölgelerindeki asit maden drenajlarının kültürden bağımsız tekniklerin yanı sıra kültüre bağlı yöntemleri kullanarak tamamlayıcı, bütüncü ve doğrulayıcı bir yaklaşımla prokaryotik çeşitliliği belirlemiştir (Aytar, 2012).

Toptaş (2016), İzmir Beydağ-Halıköy’de bulunan bakır madeni işletmelerinden alınan örneklerden kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yöntemler kullanılarak prokaryotik çeşitliliği ortaya koymuştur. Yapılan kültüre bağlı komünite analizi çalışmaları kapsamında farklı besi ortamlarında bakteriler izole edilmiştir. Kültürden bağımsız komünite analizi çalışmalarında ayrıca arkelerin varlığı belirlenmiş, 16S klonlama ve denatüre edici jel elektroforezi deneyleri ile de komünitedeki asidofil mikroorganizmaların çeşitliliği belirlenmiştir. Laboratuvar koşullarında kültüre edilebilen üç farklı mikroorganizma ile sentetik AMD biyoremediasyonu, kurşun-çinko cevheri ve pirit biyooksidasyonu ve Çayırhan (Ankara) bölgesi linyitlerine biyodesülfürizasyon uygulamaları yapılmıştır (Toptaş, 2016).

Diğer tez çalışmalarında, seçilen AMD bölgelerinin prokaryotik çeşitliliği kültürden bağımsız tekniklerle (DGGE, 16S rRNA klon kütüphanesi oluşturma) tanımlanmıştır (Gül, 2014; Sağlam, 2015; Vardar, 2011).

Türkiye’de asidofil mikroorganizmalar ile ilgili literatür araştırıldığında, Balcı vd. (2014) Balya Pb- Zn maden atık sahasının biyojeokimyasının AMD oluşumuna etkileri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Söz konusu atık sahasında demir ve kükürt döngüsünde *Acidithiobacillus* spp. grubuna bağlı prokaryotların dominant olduğu sonucunu rapor etmişlerdir.

Aytar vd. (2015) yayımladığı makale, ESOGU Biyoteknoloji Laboratuvarı’nda yapılmış tez çalışmasının bir parçası olup kültüre bağlı ve kültürden bağımsız teknikler kullanılarak ülkemizde AMD komünitesinin belirlendiği ilk çalışmadır. Bu çalışmanın sonucunda, çalışılan Balya AMD’den *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus* sp., 2 farklı *Ferrimicrobium* sp., *Actinobacterium* sp., *Acidiphilium* sp., ve *Acidobacteriaceae*

familyasına ait bir bakteri şeklinde 7 ve Çan AMD'den *Leptospirillum* sp., *Acidobacteriaceae* familyasına ait bir bakteri, *Acidiphilium* sp. ve daha önce kültüre edilmemiş bir bakteri şeklinde 4 tür izole edilmiştir. Kültürden bağımsız tekniklerden de T-RFLP (Terminal restriksiyon uzunluk polimorfizm), qPCR ve FISH kullanılarak prokaryotik çeşitlilik ortaya konmuştur.

Sağlam vd. (2016), yaptıkları makalede, Karaerik Bakır Madeni AMD'si jeokimyasını çalışmış ve 16S klonlama tekniği gibi sadece kültürden bağımsız moleküler yöntemler kullanılarak *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Ferrovum myxofaciens*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidocella facilis*, *Acidocella aluminiidurans*, *Acidiphilium cryptum*, *Acidiphilium multivorum*; *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* ve *Acidiphilium cryptum* türlerini tanımlamıştır.

Bu tez çalışması ile, Türkiye'de Kahramanmaraş Ekinözü'ndeki asid maden drenaj gölünden mikroorganizmaizolasyonu yapılarak kültüre edilebilen mikrobiyal komünitenin belirlenmesi, kültürden bağımsız teknikler ile kültüre edilemeyen mikrobiyal komünitenin belirlenmesi, izole edilen bakterilerden biyomadencilik uygulamalarında kullanılabilecek suşlar tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Demir okside eden izolatlar içinden seçilen mikroorganizmaların maden atık sularının iyileştirme çalışmalarında kullanılabileceği ve yağınlaştırabileceğinin önünün açılacağı öngörülmektedir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar, enzimler, vektörler

Çevresel DNA ve genomik DNA'ları ekstrakte etmek için kullanılan UltraClean Mikrobiyal DNA İzolasyon Kit MoBio Laboratuvar'dan, PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit Thermo Fischer Scientific (ABD) firmasından sağlanmıştır.

Kalıp DNA'yı amplifiye etmek için yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nda kullanılan *Taq* DNA Polimeraz enzimi, tampon çözeltisi ve MgCl₂ solüsyonu Promega'dan (ABD); Master mix ise Ampliqon (Fransa) firmalarından temin edilmiştir.

Plazmid DNA izolasyonu için kullanılan GeneJET™ Plazmid Miniprep Kiti ile PCR ürünlerini temizlemek ve jelden geri kazanmak için kullanılan GeneJET™ Gel Extraction Kiti Fermentas'tan (Litvanya) sağlanmıştır.

Agaroz jelde yürütülen DNA'nın baz büyüklüğünü belirlemek için markır olarak kullanılan 1 kb DNA Ladder Jena Bioscience (Almanya), 1-10 kb 2-log DNA ladder New England Biolabs (İngiltere) firmalarından temin edilmiştir.

16S rRNA Klon Kütüphanesi oluşturmak için kullanılan pGEM-T klonlama vektörü, tampon çözeltisi ile T4 DNA Polimeraz içeren vektör sistemi ve transformasyonda kullanılan kompetan *E. coli* JM109 suşu Promega'dan (ABD) sağlanmıştır.

Amplifiye edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi'nde DNA'ları kesmek için kullanılan restriksiyon enzimleri Promega (ABD) ve Thermo Fischer Scientific (ABD) firmalarından elde edilmiştir.

Tez çalışmasının mikrobiyoloji çalışmalarında hazırlanan besiyerleri ve çözeltiler ile moleküler çalışmalarda hazırlanan çözeltiler için kullanılan diğer tüm kimyasallar Sigma Aldrich (Almanya) ve Merck (Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

Amplifikasyon sonrası elde edilen 16S rRNA gen bölgesi PCR ürünlerinin, DGGE analizi sonrası elde edilen bantlardan amplifikasyonu yapılan PCR ürünlerinin ve 16S Klon kütüphanesi sonrasında seçilen klonlardan izole edilen plazmidlerin diziletilmesi ve metagenomik verilerinin elde edildiği 16S Amplicon dizileme için BM Yazılım, Danışmanlık ve Lab. Sis. Ltd. Şti (Ankara, Türkiye) firmasından destek alınmıştır.

Su örneklerinin metal içeriğinin belirlenmesi için Acme Analitik (Acme Analitik Lab. Hiz. Ltd. Şti., Ankara, Türkiye) firmasından destek alınmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çizelge 3. 1. Tez çalışması sırasında kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
The DCODE Evrensel Mutasyon Belirleme Sistemi	Bio-Rad Dcode Universal Mutation System
Masaüstü Soğutmalı Yüksek Devirli Santrifüj	Centrion Scientific K3
Masaüstü Soğutmalı Yüksek Devirli Santrifüj	Beckman-Coulter Alegria X-30
Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı	Bio-Rad
Hibridizasyon Fırını	Rauserv H0-10
Cps Kontrollü Spektrofotometre	Schimidzu Uv-Vis Spectrophotometer Uv-2550
Su Banyosu	Lab Companion Bs-31
Su Banyosu	Memmert Çalkalamalı Su Banyosu
Vortex	Bio-Cote
pH Metre	WTW INOLAB Ph-ION 735
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph Mr3001
Otoklav	Hirayama Hg-80
Hassas Terazi	Ohaus Adventurer-Pro
Çalkalamalı İnkübatör	Edmund Bühlerded
Çalkalamalı İnkübatör	Lab Companion Sı 600r
Çalkalamalı İnkübatör	Lab Companion Sk 7100
Stereo mikroskop	Olympus

Çizelge 3.1. (devam) Tez çalışması sırasında kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
Etüv	Labart
Jel Elektroforez Sistemi	Bio-Rad
Jel Elektroforez Sistemi	Chever Scientific
Thermal Cyclor	Applied Biosystem 7300
Çeker Ocak	Hedlab
Etüv	Dedeoğlu
Kimyasal Dolabı	Köttermann
Kimyasal Dolabı	Tez-San
Buzdolabı	Arçelik
Derin Dondurucu	Arçelik
Mikrodalga	Arçelik
Mikroskop	Olympus
-86 Derin Dondurucu	Thermo-Sceintific
Mikro Santrifüj	Thermo-Sceintific

3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri

3.1.3.1. Asidiofil mikroorganizmalar için kullanılan besiyerleri

İnorganik demir ortamı (iFe) (400 ml): Bu besiortamı üç çözeltiden oluşmaktadır. Çözeltiler sırasıyla A, B ve C olarak adlandırılmaktadır.

Çözelti A

Heterotrofik Bazal Tuz Çözeltisi (50x)	8 ml
İz element	0,4 ml
Distile su	287 ml

pH 2,5'a H₂SO₄ kullanılarak ayarlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Çözelti B

Agarose Type II-Medium	3 g
Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilir	

Çözelti C (g/L)

Fe(SO ₄) (1M)	278,02 g
---------------------------	----------

pH 2,0'a ayarlanır. Filtre ile steril edilir.

Çözelti A ve B otoklav sonrası Çözelti C'den 3 ml eklenerek petrilere dökülür (Johnson, 1995; Hallberg ve Johnson, 2003).

Demir-Kükürt ortamı (FeS): Bu besiyortamı dört çözültiden oluşmaktadır. Çözültüler sırasıyla A, B, C ve D olarak adlandırılmaktadır.

Çözelti A

FeTSB	0,1 g
Bazal Tuz Çözültisi (50x)	40 ml
İz element	0,4 ml
Distile su	235 ml

Besiyeri pH'sı 2,5'a H₂SO₄ kullanılarak ayarlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Çözelti B

Agarose Type II-Medium	3 g
------------------------	-----

Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Çözelti C (g/L)

Fe(SO ₄) (1M)	278,02 g
---------------------------	----------

pH 2,0'a ayarlanır. Filtre ile steril edilmiştir.

Çözelti D (g/L)

Potasyumtetratizaol (0,1M)	30,2 g
----------------------------	--------

Filtre ile steril edilir.

Çözelti A ve B otoklav sonrası Çözelti C'den 10 ml Çözelti D'den 10 ml eklenerek petrilere dökülmüştür (Johnson, 1995; Hallberg ve Johnson, 2003).

Heterotrof ortam (Ye): Bu besiyortamı üç çözeltilerden oluşmaktadır. Her bir çözelti sırasıyla A, B ve C olarak adlandırılmaktadır.

Çözelti A

Yeast Extract	0,08 g
Heterotrofik Bazal Tuz Çözeltisi (50x)	8 ml
İz element	0,4 ml
Distile su	292 ml

Besiyeri pH'sı 3'e H₂SO₄ kullanılarak ayarlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Çözelti B

Agarose Type II-Medium	3 g
------------------------	-----

Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Çözelti C (g/L)

Fe(SO ₄) (1M)	278,02 g
---------------------------	----------

pH 2,0'a H₂SO₄ ile ayarlanmıştır. 0,22 µm por çaplı şırınga ucu filtre ile steril edilmiştir.

Çözelti A ve B otoklav sonrası Çözelti C'den 0,2 ml eklenerek petrilere dökülmüştür (Johnson, 1995; Hallberg ve Johnson, 2003).

Demir-tripton soya broth ortamı (FeTSB): Bu besiyortamı üç çözeltilerden oluşmaktadır. Her bir çözelti sırasıyla A, B ve C olarak adlandırılmaktadır.

Çözelti A

FeTSB	0,1 g
-------	-------

Bazal Tuz Çözeltisi (50x)	40 ml
İz element	0,4 ml
Distile su	290 ml

Besiyeri pH'sı 2,5'a H₂SO₄ kullanılarak ayarlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Çözelti B

Agarose Type II-Medium	3 g
------------------------	-----

Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Çözelti C (g/L)

Fe(SO ₄) (1M)	278,02 g
---------------------------	----------

pH 2,0'a ayarlanmıştır. 0,22 µm por çaplı şırınga ucu filtre ile steril edilmiştir.

Çözelti A ve B otoklav sonrası Çözelti C'den 10 ml eklenerek petrilere dökülmüştür (Johnson, 1995; Hallberg ve Johnson, 2003).

Seçici Besiyerleri

- *Leptospirillum*

Çözelti A (g/L)

(NH ₄) ₂ SO ₄ (1M)	0,132 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,053 g
K ₂ HPO ₄	0.027 g
Distile Su	950 ml

Besiyeri pH'sı 10 N H₂SO₄ ile 1,8'e ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Çözelti B (g/L)

FeSO ₄ x 7H ₂ O	20 g
---------------------------------------	------

0,25 N H₂SO₄

50 ml

Çözelti pH'sı 1,2'ye ayarlanmıştır. Çözöldükten sonra hızlıca 0,22 µm por çaplı şırınga ucu filtre ile steril edilmiştir.

Çözelti C (g/L)

İz element

1 ml

Çözelti A, B ve C sterilizasyon sonrasında birleştirilmiştir (DSMZ 882 kodlu besiyeri).

3.1.3.2. Mikrobiyolojik ve moleküler çalışmalarda kullanılan besiyerleri**LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri (g/L)**

Maya Ekstraktı

5 g

Trypton

10 g

NaCl

10 g

Otoklav ile 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

LB (Luria-Bertani) Agar

Maya Ekstraktı

5 g

Trypton

10 g

NaCl

10 g

Agar

15 g

Otoklav ile 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

BSA (Blue Selection Agar) Plate

Maya Ekstraktı

5 g

Trypton

10 g

NaCl

10 g

Agar	15 g
------	------

Otoklavlanmış ve uygun sıcaklığa soğuması sağlanmış 100 ml LB Agar içerisine;

Amfisilin (stok 100mg/ml)	100 µl
X-Gal (stok 20 mg/ml)	160 µl
IPTG (stok 20 mg/ml)	160 µl

Bileşenleri eklenmiştir.

SOC Medium (25 ml)

Maya Ekstraktı	0,5 g
Tripton	0,125 g
1 M NaCl	0,25 ml
1 M KCl	0,0625 ml
2 M Mg ⁺² Çözeltisi	0,25 ml
2M Glikoz	0,25 ml

Bacto tryptone, bacto yeast extract, 1 M NaCl ve 1 M KCl tartıldıktan sonra 22 ml'ye kadar distile su eklenerek otoklav ile 121°C'de steril edilmiştir. Sıcaklığı oda sıcaklığına ulaşıttıktan sonra 0,22 µm por çaplı şırınga ucu filtre ile steril edilen 2 M Mg⁺² ve 2 M Glikoz çözeltileri eklenmiştir. pH 7'ye ayarlanmış ve son hacim 25 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan stok ve çözeltiler

Tez çalışmasında mikrobiyoloji ve moleküler çalışmalarda kullanılan tüm çözeltilerin içerikleri sırasıyla verilmektedir.

50X Heterotrofik bazal tuz çözeltisi (g/L)

Na ₂ SO ₄ .10H ₂ O	7,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	22,5 g
KCl	2,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	25 g

KH_2PO_4	2,5 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,7 g

121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir (Hallberg ve Johnson, 2003).

Bazal tuz çözeltisi (g/L)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 g

121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir (Hallberg ve Johnson, 2003).

İz element çözeltisi (g/L 0,01 M H_2SO_4 ’te)

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 15\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
H_3BO_3	0,6 g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g
NaVO_3	1 g

121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir (Hallberg ve Johnson, 2003).

TAE 50X (1L)

Tris base	242 g
Asetik Asit	57,1 mL
EDTA (0,5 M pH 8)	20 mL

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 8’e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

TBE 10X (1 L)

Tris base (0,89 M)	108 g
Borik Asit (0,89 M)	55,04 g
EDTA (0,02 M)	7,44 g

Distile su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

PBS 10X (1L)

NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KCl	2,00 g
KH ₂ PO ₄	2,00 g

Distile su ile 1 litreye tamamlanıp pH 7,2'e ayarlanmış, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

Lizozim stok çözeltisi (10 mg/mL)

Lizozim	100 mg
EDTA (0,5 M)	1 mL
Tris-HCl (1M)	1 mL
dH ₂ O	8 mL

Filtre ile sterilize edilerek kullanılmıştır. -20 °C'lik derin dondurucuda saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

%100'lik DGGE stok solüsyonu (100 ml)

Üre	42 g
Deiyonize Formamid	40 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%40)	20 mL
TAE (50X)	2 mL

mQ su ile 100 mL'ye tamamlanıp +4 °C'de saklanmıştır (Muyzer, 1999).

%0'lık DGGE stok solüsyonu (100 ml)

Akrilamid/Bisakrilamid (%50)	20 mL
TAE (50X)	2 mL

mQ su ile 100 mL'ye tamamlanmış, buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır (Muyzer, 1999).

%10 SDS çözeltis

Sodyumdodesilsülfat (SDS)	10,00 g
dH ₂ O	1000 mL

Hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook vd., 1989).

In situ hibridizasyon tamponu

NaCl (5 M)	360 µL
Tris-HCl (1 M)	40 µL
Formamide	700 µL
mQ su	900 µL
SDS (%10)	2 µL

Hazırlanıp buz üzerinde korunmuştur (Anton, 1999).

FISH için yıkama tamponu

Tris-HCl (1 M pH 8)	1 mL
NaCl (5 M)	700 µL
EDTA (0,5 M)	500 µL

mQ su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır (Anton 1999).

Amfisilin (100 mg/ml)

Stok amfisilin 1 ml'ye 100 mg olacak şekilde sulandırılarak ve 0,22 µm por çaplı şırınga ucu filtre ile steril edilmiştir.

Hazırlanan tampon -20°C'de saklanmıştır.

X-gal çözeltisi

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside	100 mg
N,N'-dimethylformamide	2 mL

Çözelti hazırlandıktan sonra 70 oplu 70 yum folyo ile kaplanmış güneş ışığından korunmuştur, -20°C'de muhafaza edilmiştir.

IPTG çözeltisi (0.1 M)

IPTG	1,2 g
DNA-az ve RNA-az içermeyen su	50 mL

Bu çözelti filtre ile steril edilmiş ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Cözücü solüsyonu

Amonyum asetat	0.5 M
Magnezyum asetat	10 mM
EDTA (pH 8.0)	1 mM
SDS	% 0.1

Mg⁺² Stok Çözeltisi (100 ml)

MgCl ₂ .6H ₂ O	20,33 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	24,65 g

Yukarıda verilen kimyasal maddelere distile su eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Filtre ile sterilize edilmiş ve +4 °C'de saklanmıştır.

Glikoz Stok (100 ml)

Glikoz	36 g
--------	------

Tartımı yapılan glikoz 100 ml distile suda çözüldükten sonra filtre ile sterilize edilmiş ve +4 °C’de saklanmıştır.

Fenantrolin Çözeltisi

1,10 Phenanthroline monohydrate 1 g

Tartımı yapılan fenantrolin üzerine 1000 ml distile su eklenir ve 1 ml HCl damlatılmış ve homojen çözünmesi sağlanmıştır.

Amonyum asetat çözeltisi

Amonyum asetat 250 g
Distile su 150 ml
Glasiyel asetik asit 750 ml

Amonyum asetat üzerine distile su ve asit eklenerek homojen çözünmesi sağlanmıştır.

Stok Demir Çözeltisi

FeSO₄.7H₂O 0,4978 g

100 mg/L Fe⁺² çözeltisi için 0,4978 g FeSO₄.7H₂O pH 2,5 olan 1000 ml distile suda çözülmüştür.

3.1.5. Moleküler çalışmalarda kullanılan primer ve oligonükleotid problemler

Çalışmada kullanılan primer ve oligonükleotid problemler Çizelge 3.2’de; metagenomik analizde kütüphane hazırlanırken kullanılan indeks diziler ise Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Tez çalışmasında kullanılan oligonükleotid dizileri

Primer/Prob Adı	Primer Dizisi	Kullanım Amacı
27-F	5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’	16 rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu (Lane vd., 1985)
1387-R	5’-GGGCGG(AT)GTGTACAAGGC-3’	16 rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu
1492-R	5’-GGTTACCTTGTTACGACTT-3’	16 rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu (Lane vd., 1985)

Çizelge 3.2. (devam) Tez çalışmasında kullanılan oligonükleotid dizileri

Primer/Prob Adı	Primer Dizisi	Kullanım Amacı
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Koloni PCR
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'	Koloni PCR
341-F	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	DGGE Re-PCR Muyzer vd., 1993)
907-R	5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'	DGGE PCR ve DGGE Re-PCR Muyzer vd., 1993)
341-F (GC)	5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCC GTCCCGCCGCCCCGCCCCGCT ACGGGAGGCAGCAG-3'	DGGE PCR (Muyzer vd., 1993)
Arc 915	GTGCTCCCCGCAATTCT	FISH analizi (Amann vd., 1990)
Eub 338	GCTCCCTCCCGTAGGAGT	FISH analizi

Çizelge 3.3. Metagenomik analizde kullanılan indeks dizileri

Örnek adı	Index		Index dizisi		
K1	N701-S502	N701	TAAGGCGA	S502	CTCTCTAT
K2	N701-S503	N701	TAAGGCGA	S503	TATCCTCT
K3	N701-S505	N701	TAAGGCGA	S505	GTAAGGAG
K4	N701-S506	N701	TAAGGCGA	S506	ACTGCATA
K5	N701-S507	N701	TAAGGCGA	S507	AAGGAGTA
K6	N712-S501	N712	GTAGAGGA	S501	TAGATCGC
K7	N701-S502	N701	TAAGGCGA	S502	CTCTCTAT

3.2. Yöntem

Tez çalışması süresince Çizelge 3.4 'te verilen süreç takip edilmiştir. Tez çalışması örnek alımı ile başlamış, kültüre bağlı ve kültürden bağımsız teknikler ile çeşitlilik belirlenmiştir. Yeni nesil dizileme tekniği olan metagenomik yaklaşımla elde edilen sonuçlar desteklenmiştir. Son aşamasında izole edilen mikroorganizmalardan *Leptosprillum* sp'nin Fe⁺² oksidasyon seviyesinin belirlenmesi ile uygulama adımı tamamlanmıştır.

Çizelge 3.4. Tez süresince takip edilen plan

DÖNEM	BELLİ AŞAMALAR
Aralık 2016-Mayıs 2017	Çevresel örneklerin temini ve izolasyon çalışmaları, kültüre bağlı ve kültürden bağımsız teknikler kullanılarak komünite belirlenmesi
Haziran 2017-Kasım 2017	Kültüre bağlı ve kültürden bağımsız teknikler kullanılarak komünite belirlenmesi
Aralık 2017-Mayıs 2018	Biyoteknolojik uygulamaların yapılması
Haziran 2018-Aralık 2018	Biyoteknolojik uygulamaların yapılması

Birinci sezon örneklem yerleri, sırasıyla K1, K2, K3, K4, ve K5 olarak tanımlanmıştır. Alınan örneklerin sıcaklık, pH, ve koordinat bilgeleri Çizelge 3.5'te verilmiştir. Asidik ortamları tanımlamak için kullanılan karakteristik özelliklerinden biri olan pH 3'ten küçük ifadesine uymaktadır (Johnson vd., 2006; Tse ve Ma, 2016).

Çizelge 3.5. Birinci dönem örneklem noktalarının özellikleri

Örnek Adı	pH	Sıcaklık	Lokasyon
K1	2,7	18°C	336538 D 4208074 K EkinözüKAHRAMANMARAŞ
K2	2,32	27,3°C	336538 D 4208074 K Ekinözü-KAHRAMANMARAŞ
K3	2,48	20,3°C	336502 D 4208109 K Ekinözü-KAHRAMANMARAŞ
K4	2,55	27,1°C	336502 D 4208109 K Ekinözü-KAHRAMANMARAŞ
K5	2,09	27,3°C	336538 D 4208074 K Ekinözü-KAHRAMANMARAŞ

3.2.1.2. İkinci sezon örnekleme

İkinci sezon örnek alımı Ocak 2018'de yapılmıştır. Kış mevsimi nedeniyle bölgenin yağış almaması sebebiyle bir önceki sezonda örneklem noktalarının dört tanesi kurumuştur. Birinci sezonda K1 olarak adlandırılan bölgeden örnek alınabilmiştir. Bu sezonki örnek K6 olarak adlandırılmıştır. Örneklem alanının özellikleri Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. İkinci dönem örneklem noktasının özellikleri

Örnek Adı	pH	Sıcaklık	Lokasyon
K6	2,8	-	336538 D 4208074 K EkinözüKAHRAMANMARAŞ

3.2.1.3. Üçüncü sezon örnekleme

Üçüncü sezon örnek alımı Eylül 2018'de yapılmıştır. Önceki sezonda olduğu gibi örneklem noktalarının dört tanesinden numune alınamamıştır. Birinci sezonda K1 olarak

adlandırılan örneklem alanından numune alınabilmiştir. Bu sezon alınan örnek K7 olarak adlandırılmıştır. Örneklem alanının özellikleri Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Üçüncü dönem örneklem noktasının özellikleri

Örnek Adı	pH	Sıcaklık	Lokasyon
K7	2,7	21°C	336538 D 4208074 K EkinözüKAHRAMANMARAŞ

3.2.2. Metal analizleri

Üç sezonda alınan örneklerin metal içeriğinin belirlenmesi için 50 ml su numunesi analize gönderilmiştir. Acme Analitik (Acme Analitik Lab. Hiz. Ltd. Şti., Ankara, Türkiye) firması SQ200 methodu ile metal taraması yapmıştır. İçindeki çözünmüş metal konsantrasyonu belirlenen sınırlar dışında olan numuneler on kata kadar seyreltilmiş ve 32 ile 70 arasında metal için sonuç elde edilmiştir.

3.2.3. Kültüre bağlı yöntemler ile mikroorganizma tanımlama çalışmaları

- **Asidofil mikroorganizmaların izolasyonu**

Asidofil bakteri izolasyonu için 3.1.3 çalışmada kullanılan besiyerleri başlığında belirtilen 4 farklı besi ortamı hazırlanmıştır. 5 farklı noktadan alınan suların 200 µl’si katı besiyerlerine yayma olarak ekilmiştir. Tekrarlı olarak ekilen petripler 30 °C’de inkübasyona bırakılmış ve mikroorganizmaların büyümesi için 10 gün inkübe edilmiştir. Her bir petride mikroorganizma görüldükten sonra inkübasyon durdurulmuştur. Stereo mikroskop ile incelenen petriplerdeki mikroorganizmalardan farklı morfolojilere sahip bakteriler taze besiyerine çekilmiştir. İnkübasyon süresi sona erdikçe, isolatlar taze besiyerlerine pasajlanmıştır.

- **İsolatların moleküler identifikasyonu**

İsolatların tanımlanabilmesi için iki farklı strateji izlenmiştir. Birinci stratejide bakterilerden genomik DNA izolasyonu yapılması için mikrobiyal kültür sıvı besiyerinde

geliştirilmiştir. Hücreler 5000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra çöktürülmüştür. Genomik DNA izolasyonunda İnvitrogen’in PureLink Microbiome DNA Purification Kit’i kullanılmıştır. Kit protokolü aşağıda verilmiştir (PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit User Guide (Microbial Culture and Transport Media Samples)):

- Çöktürülen bakteri hücreleri üzerine 800 µl S1-Lizis tampon eklenmiştir. Pipetaj ile ya da vorteksle resüspanse edilmiştir. Daha sonra karışım boncuk içeren tüplere transfer edilmiştir.
- Karışım üzerine 100 µl S2- parçalama güçlendirici tamponu eklendikten sonra kısa süre vortekslenmiştir.
- 65 °C’de 10 dk boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda vortekste yatay pozisyonda 10 dk en yüksek hızda homojen oluncaya dek bekletilmiştir.
- 14.000xg’de 2 dk santrifügasyon yapılmıştır.
- Süpernatantın 500 µl’si pelletten kaçınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpe alınmıştır.
- Üzerine 900 µl S4-bağlanma tamponu eklenerek vortekslenmiştir.
- Bu karışımın 700 µl’si spin kolon tüpe alınarak 14.000xg’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Atık uzaklaştırılmış, kalan örnek karışımı ile bir önceki adım tekrarlanmıştır.
- Spin kolon yeni bir koleksiyon tüpüne alınmıştır. 500 µl S5-Yıkama tamponu eklenerek 14.000xg’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Atık uzaklaştırılmış, boş olarak spin kolon 14.000xg’de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- Spin kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış, üzerine 100 µl S6-Elüsyon tamponu eklendikten sonra 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 14.000xg’de 1 dk santrifügasyon sonrasında spin kolon atılmış, tüpte kalan saf DNA - 20 °C’de saklanmıştır.

Genomik DNA’ların kontrolü elektroforetik yöntem ile yapılmıştır. Örneklerin 1 µl’si %1 agaroz jele yüklenerek 80V’da 30 dk süresince yürütülmüştür. Yürütmesi tamamlanan jel, Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Genomik DNA’lar kalıp olarak kullanılarak Çizelge 3.8’de verilen bileşenler karıştırılarak 16S rRNA gen bölgesi amplifiye edilmiştir. Reaksiyon koşulları 95 °C 5 dakika öndenatürasyon ile başlayarak 95 °C 30 saniye denatürasyon, 55 °C 1 dakika bağlanma, 72 °C 1 dakika 30

saniye uzama aşamalarından oluşan 30 döngü ile 72 °C’de 10 dakika son uzama ve 4°C’de inkübasyon aşamalarından oluşmaktadır.

Çizelge 3.8. 16S rRNA PCR için kullanılan bileşenler

Bileşen	Miktar
dH ₂ O	13,075 µl
Tampon 5X	5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
dNTPs	2,5 µl
27F	0,4 µl
1387R	0,4 µl
DNA	1 µl
Enzim	0,125 µl
Toplam	25 µl

Elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jelde kontrol edilmiştir. Jel 80 V’da 30 dk süresince yürütülmüş ve Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Amplifikasyonu yapılan 16S rRNA gen bölgeleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek farklı türe ait olanların ortaya çıkardığı profil tespit edilmiştir. Kullanılan restriksiyon enzimleri *Alu I* ve *Hae III*’dür.

HaeIII için reaksiyon koşulları;

<i>HaeIII</i>	0,5 µl
Tampon	1 µl
Saflaştırılmış DNA	5 µl
Ultra saf su	3,5 µl
Toplam	10 µl

AluI için reaksiyon koşulları;

<i>AluI</i>	0,5 µl
Tampon	1 µl
Saflaştırılmış DNA	5 µl
Ultra saf su	3,5 µl
Toplam	10 µl

Yukarıdaki reaksiyon karışımları 37 °C 'de 2 saat inkübe edilmiştir. Sıcaklığın sabit tutulması için Thermal Cycler inkübatör olarak kullanılmıştır. Reaksiyon sonunda kesilen DNA'lar %2,5 agaroz jelde TBE Tampon içinde 60V'da 150 dk süresince yürütülmüştür.

Genomik DNA'ları elde edilemeyen izolatlar için farklı bir strateji uygulanmıştır. Koloni PCR yöntemi için Çizelge 3.6'da verilen bileşenlerden kalıp DNA çıkarılarak karışım hazırlanmış ve sonrasında aynı koşullar uygulanarak amplifikasyon başlatılmıştır.

Birinci sezon örneklerinden heterotrofik besi ortamında saflaştırılan bakterilerin sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra genomik DNA'ları ekstrakte edilmiş ve moleküler identifikasyonu yapılmıştır. Diğer besi ortamlarında izole edilen bakterilerin moleküler identifikasyonunda koloni PCR yöntemi uygulanmıştır.

İkinci sezonda alınan örnek asidofil bakteri izolasyonu için de belirtilen 4 farklı besi ortamı hazırlanmıştır. Birinci sezonda yapıldığı gibi bir noktadan alınan sudan 200 µl katı besiyerlerine yayma olarak ekilmiştir. Tekrarlı olarak ekilen petripler 30 °C'de inkübasyona bırakılmış ve mikroorganizmaların büyümesi için 10 gün inkübe edilmiştir. Her bir petride koloni görülmesi ardından inkübasyon durdurulmuştur. Stereo mikroskop ile incelenen petriplerdeki mikroorganizmalardan farklı morfolojilerde olduğu tespit edilenler taze besiyerine çekilmiştir. Saflığı kontrol edilen izolatlar katı besiyer ortamında pasajlanmaya devam edilmiştir. İnkübasyon süresi sona erdikçe, izolatlar taze besiyerlerine pasajlanmıştır. Elde edilen izolatlardan koloni PCR yöntemi kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu yapılarak moleküler identifikasyonu tamamlanmıştır.

Üçüncü sezonda alınan örnekten asidofil bakteri izolasyonu için belirtilen 4 farklı besi ortamı hazırlanmıştır. Birinci ve ikinci sezonda yapılan yöntem modifiye yapılarak bir noktadan alınan sudan 100 µl ve 200 µl katı besiyerlerine yayma olarak ekilmiştir. Tekrarlı olarak ekilen petripler 30 °C'de inkübasyona bırakılmış ve morfolojilerin oluşması için 10 gün inkübe edilmiştir. Aynı zamanda, 4 farklı besiyerine büyük loplulu öze yardımıyla çizgi ekim yapılmıştır. Her bir petride koloni görüldükten sonra inkübasyon durdurulmuştur. Stereo mikroskop ile incelenen petriplerdeki mikroorganizmalardan farklı morfolojilerde olduğu tespit edilenler taze besiyerine çekilmiştir. Saflığı kontrol edilen izolatlar katı besi ortamında pasajlanmaya devam edilmiştir. Mikroorganizmalar büyüdükçe, taze

besiyelerine pasajlanmıştır. Elde edilen izolatlardan koloni PCR yöntemi kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu yapılarak moleküler identifikasyonu tamamlanmıştır.

3.2.4. Kültürden bağımsız yöntemler ile mikroorganizma tanımlama çalışmaları

3.2.4.1. Membran filtrasyon

- **Birinci sezonda alınan su örnekleri**

Kültürden bağımsız çalışmalarda kullanılacak çevresel DNA'yı ekstrakte etmek için alınan su örnekleri vakumlu filtrasyon sistemi ile süzülmüştür. Membran filtrasyon işleminde GTTP (Milipore, 0,2 µm por büyüklüğünde 47 mm çapında) filtre kullanılmıştır. Ancak ilk denemelerde suyun metal içeriğinin yoğun olması sebebiyle filtre tıkanmış ve az miktarda su geçirilmiştir. Bu nedenle sulardaki tortu önce santrifüj işlemi ile çöktürülmüştür, sonra kaba filtrasyon ile kalan tortular da toplanmış ve son olarak GTTP membran filtreden geçirilmiştir. Birinci sezon örneklemede 5 istasyondan alınan su örnekleri bu prosedüre uygun filtreden geçirilmiştir. Bek alevinde kurutulan filtreler ekstraksiyon işleminde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Filtreden geçirilen su miktarları karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Birinci sezon su örneklerinin filtre edilen hacimleri

Su örneği	Filtre edilen su miktarı	
	Kaba filtrasyon öncesi	Kaba Filtrasyon sonrası
K1	5500 ml	3200 ml
K2	300 ml	1100 ml
K3	900 ml	2100 ml
K4	700 ml	1800 ml
K5	200 ml	500 ml

- **İkinci sezonda alınan su örneği**

Kültürden bağımsız çalışmalarda kullanılacak çevresel DNA'yı ekstrakte etmek için alınan su örnekleri vakum filtrasyon sistemi ile süzülmüştür. Membran filtrasyon işleminde 0,2 µm por çaplı GTTP filtre kullanılmıştır. İkinci sezon örnekleme alanından alınan suyun önce santrifügasyonu yapılmış, sonra kaba filtrasyonu yapılmış ve son olarak GTTP filtreden

geçirilmiştir. Bek alevinde kurutulan filtre ekstraksiyon işleminde kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Filtreden geçirilen su miktarları karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.10’da verilmiştir.

Çizelge 3.10. İkinci sezon örneklem alanından alınan suyun filtreden geçirilen hacmi

Su örneği	Filtre edilen su miktarı
K6	2350 ml

- **Üçüncü sezonda alınan su örneği**

Kültürden bağımsız çalışmalarda kullanılacak çevresel DNA’yı ekstrakte etmek için alınan su örnekleri vakum filtrasyon sistemi ile süzülmüştür. Membran filtrasyon işleminde 0,2 µm’lik GTTP filtre kullanılmıştır. Üçüncü sezonda alınan su örneğinin kaba filtrasyonu yapılmış ve son olarak GTTP filtreden geçirilmiştir. Bek alevinde kurutulan filtreler ekstraksiyon işleminde kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Filtreden geçirilen su miktarları karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Üçüncü sezon örneklem alanından alınan suyun filtreden geçirilen hacmi

Su örneği	Filtre edilen su miktarı
K7	1150 ml

3.2.4.2. DNA izolasyonu

- **Birinci sezon, ikinci sezon ve üçüncü sezon örneklerinin çalışılması**

Filtrelerden DNA izolasyonu için öncelikle MOBIO Power Soil DNA Isolation Kit (12888-100) kullanılmıştır. Filtrelerin yarısı kullanılarak uygulanan protokol aşağıda verilmiştir (UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit, Instruction Manual):

- Filtreler küçük parçalara ayrılarak Power Beads Tüpe konular, vortekslenmiştir.
- C1 solusyondan 60 µl eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- Tüpler 10 dk boyunca maksimum hızda yatay konumda vortekslenmiştir.
- Tüpler oda sıcaklığında 10000xg’de 30 sn santrifüjlenmiştir.
- Süpernatant 2 ml’lik koleksiyon tüpüne alınmıştır (yaklaşık 400-500 µl).

- 250 µl C2 solusyonu eklenmiş ve 5 sn vortekslelendikten sonra +4°C 'de inkübe edilmiştir.
- Tüpler oda sıcaklığında 1 dk 10000xg'de santrifüjlenmiştir.
- Pelletten sakınarak 600 µl süpernatant koleksiyon tüpüne alınmıştır.
- 200 µl C3 solusyonu eklenmiş ve nazikçe vortekslenmiştir. +4°C'de 5 dk inkübe edilmiştir.
- Tüpler oda sıcaklığında 10000xg'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Pelletten sakınılarak 750 µl süpernatant 2 ml temiz koleksiyon tüpüne alınmıştır.
- C4 solusyonundan 1200 µl süpernatanta eklenmiş ve 5 sn vortekslenmiştir.
- 675 µl spin filtreye eklenmiş ve 10000xg'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Altta kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Tüm süpernatant bitene dek en az 3 kez bu işlem tekrarlanmıştır.
- 500 µl solüsyon C5 eklenmiş ve oda sıcaklığında 10000xg'de 30 sn santrifüjlenmiştir. Altta kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
- Alkolü tamamen uzaklaştırmak için 1 dk oda sıcaklığında 10000xg'de tekrar santrifüjlenmiştir.
- Spin filtre C5 solusyonundan kaçınarak temiz 2 ml koleksiyon tüpüne alınmıştır.
- C6 solusyonundan 100 µl beyaz flitrenin tam ortasına bırakılmış ve 30 sn oda sıcaklığında 10000xg'de santrifüjlenmiştir.
- Spin filtre atılarak DNA -20°C'de ya da -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Ekstraksiyonu tamamlanan çevresel DNA'ların 1 µl'si %1'lik jele yüklenerek 60V'da 70 dk yürütülmüştür.

Bant görülmeyen DNA ekstraksiyonu sonrasında filtrelerden tekrar DNA izolasyonu için İnvitrogen'in PureLink Microbiome DNA Purification Kit'i kullanılmıştır. Filtrelerin yarısı kullanılarak uygulanan protokol aşamaları maddeler halinde belirtilmiştir:

- Filtreler oldukça ince kesilmiştir. Ependorf tüpe alınan filtre parçaları üzerine 800 µl S1- Lizis tampon eklenmiştir. Pipetaj yapılarak ya da vorteksle resüspanse edilmiştir. Daha sonra karışım boncuk içeren tüplere transfer edilmiştir.
- Karışım üzerine 100 µl S2- parçalama güçlendirici tamponu eklenmiştir. Kısa süre vortekslenmiştir.
- 65 °C'de 10 dk boyunca inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon sonunda vortekste yatay pozisyonda 10 dk en yüksek hızda homojen oluncaya dek bekletilmiştir.
- 14.000xg'de 2 dk santrifügasyon yapılmıştır.
- Pelletten kaçınarak 500 µl'ye kadar süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpe alınmıştır.
- Üzerine 900 µl S4-bağlanma tamponu eklenerek vortekslenmiştir.
- Bu karışımın 700 µl'si spin column tüpe alınarak 14.000xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Atık uzaklaştırılmış, kalan örnek karışımı ile 8. Adım tekrarlanmıştır.
- Spin kolona yeni bir koleksiyon tüpüne alınmıştır. 500 µl S5-Yıkama tamponu eklenmiş 14.000xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Atık uzaklaştırılmış, boş olarak spin kolona 14.000xg'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- İkinci santrifügasyon yıkama tamponun (içindeki etanolün) tamamen uzaklaştırılması için optimize edilmiştir.
- Spin kolona yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınır, üzerine 100 µl S6-Elüsyon Tamponu eklendikten sonra 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 14.000xg'de 3 dk santrifügasyon sonrasında spin kolon atılır, tüpte saf kalan DNA -20 °C'de saklanmıştır.

Yukarıdaki protokole göre tüm noktalardaki su örneklerinin çevresel DNA'ları elde edilmiştir.

Çevresel DNA'lar ekstrakte edildikten sonra 1 µl 'si %1 agaroz jelde 80V'da 30 dk süresince yürütülerek kontrolü yapılmıştır (Sambrook ve Russell vd., 2001). Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Saflık kontrolü ve konsatrasyonun belirlenmesi NanoDrop (Thermo Scientific) ile yapılmıştır.

3.2.4.3.Klon kütüphanesi oluşturma ve ampliyeye ribosomal DNA restriksiyonu analizi

Mikroorganizmaların çeşitliliğinin belirlenmesi çalışmalarında uygulanan bir diğer kültürden bağımsız teknik 16S rRNA gen bölgesinin plazmide aktarılarak 16S klon kütüphanesi oluşturulmasıdır. 16S rRNA gen bölgesi, mikroorganizmalar için evrimsel kronometre olarak tanımlanan moleküldür ve 16S rRNA PCR ürünlerini elde etmek için 27F-1387R veya 27F-1492R primer çiftleri kullanılmıştır (). Reaksiyonda Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13 'de verilen bileşenler kullanılmıştır.

Çizelge 3.12. 16S rRNA PCR bileşenleri (27 F ve 1387 R primer çifti için)

Bileşen-27 F ve 1387	Hacim
dH ₂ O	13,275 µl
Tampon 5x	5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
dNTPs	2,5 µl
27F	0,3 µl
1387R	0,3 µl
DNA	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,125 µl
	25 µl

PCR koşulları 95 °C’de 5 dakika öndenatürasyon, 95 °C’de 30 saniye denatürasyon, 55°C ‘de 1 dakika bağlanma, 72°C’de 1 dakika 30 saniye uzama aşamalarından oluşan 30 döngü, 72 °C’de 10 dakika son uzama ve 4 °C’de inkübasyon aşamalarından oluşmaktadır.

Çizelge 3. 13. 16S rRNA PCR bileşenleri (27 F ve 1492 R primer çifti için)

Bileşen-27 F ve 1492R	Hacim
dH ₂ O	13,275 µl
Tampon 5x	5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
dNTPs	2,5 µl
27 F	0,3 µl
1492 R	0,3 µl
DNA	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,125 µl
	25 µl

PCR koşulları 94 °C’de 3 dakika öndenatürasyon, 94 °C’de 30 saniye denatürasyon, 50°C ‘de 1 dakika bağlanma, 72°C’de 2 dakika uzama aşamalarından oluşan 30 döngü, 72 °C ‘de 10 dakika son uzama ve 4 °C ‘de inkübasyon aşamalarından oluşmaktadır.

Amplikonlar %1 agaroz jelde 100 V’da 70 dk süresince yürütülmüş ve EtBr ile boyandıktan sonra Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Saflaştırılması gereken bantların jelden geri kazanımında GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas, Litvanya) protokolü uygulanmıştır. Takip edilen prosedür aşağıda verilmiştir.

- Saflaştırılmak istenilen fragment(ler) steril bir bisturi ile agaroz jelden kesilmiştir.

- Kesilen jel parçaları önceden ağırlığı tartılmış steril mikrosantrifüj tüplerinin içerisine alınıp, tüplerin dolu ağırlıkları alınmıştır. Böylece kesilen jel parçalarının ağırlıkları hesaplanmıştır.
- Ağırlıkları belirlenen jel parçalarına 1:1 (hacim:ağırlık) oranında kitin içerisinde yer alan Bağlanma tamponu eklenmiştir ve 60°C’de yaklaşık 10 dakika bekletilerek jelin tamamen erimesi sağlanmıştır.
- Bağlanma tamponu içerisinde eritilen jel, kit içerisinde bulunan Gene JET™ saflaştırma kolonuna alınmıştır ve 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında kolonun altında kalan kısım atılarak toplama tüpü kolona tekrar yerleştirilmiştir. Kitin içerisinde bulunan yıkama tamponundan 700 µl kolon üzerine eklenerek 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Altta kalan kısım atıldıktan sonra toplama tüpü kolona yerleştirilmiştir. Yıkama tamponun uzaklaştırılması için tekrar 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon steril bir santrifüj tüpü içerisine yerleştirilerek, üzerine kit içerisinde bulunan 50µl Elution çözeltisi eklenmiştir ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 14000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- Spin kolon atıldıktan sonra tüpte saf DNA kalmıştır ve kullanımına kadar -20 °C’de saklanmıştır.

Klon kütüphanesi oluşturmak için insert olarak 16S rRNA PCR ürünü, vektör olarak p-GEMT easy vector system, transformasyonda ise *E. coli* JM109 suşu kullanılmıştır. 3:1 ya da 2:1 (insert:vektör) oranında ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. İhtiyaç olan DNA miktarı belirlemek için Denklem 3.1 ve Denklem 3.2 kullanılmıştır (pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega Teknik Kitapçığı).

$$x = (\text{ng vector} \times \text{kb insert}) / (\text{kb vector}) \times \text{insert/vector} \quad (3.1)$$

$$x = (50 \times 1.3) / 3 \times 3/1 = 65 \text{ ng}$$

$$x = (\text{ng vector} \times \text{kb insert}) / (\text{kb vector}) \times \text{insert/vector} \quad (3.2)$$

$$x = (50 \times 1.3) / 3 \times 2/1 = 43.3 \text{ ng}$$

Ligasyon reaksiyon karışımı için Çizelge 3.14’te verilen bileşenler kullanılmış ve 4 °C’de gece boyu bekletilmiştir. Oluşturulan rekombinant DNA, *E.coli* JM109 kompetant hücrelerine transforme edilmiştir.

Çizelge 3.14. Ligasyon reaksiyonunda kullanılan bileşenler

Bileşenler	Miktar
2 x Rapid Ligasyon Tamponu	5 µl
pGEM-T Easy Vektör	1 µl
PCR Ürünü	x µl (~65 ng)
T4 DNA Ligaz (3 ünite/ µl)	1 µl
dH ₂ O	10-x µl

Transformasyon protokolü aşağıda verilmiştir:

- Ligasyon örneğinin 10 µl'sinin üzerine 200 µl kompetan *E. coli* JM109 hücreleri eklendikten sonra 4-6 kez ters yüz edilmiştir.
- Hücre porlarının açılması için önce 30 dakika buzda bekletilip ardından 42 °C'de 90 saniye ısı şokuna maruz bırakıldıktan sonra 2 dakika buzda bekletilmiştir.
- 800 µl SOC Medium eklenip 4-6 kez ters yüz edilen karışım 90 dakika 37 °C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.
- Amfisilin, IPTG ve X-gal içeren LB Agar petrilere farklı hacimlerde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir (100 µl; 200 µl (2) ve kalan olarak). 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda mavi beyaz seçilimine göre klonlar yeni BSA plakelere kürdan ile çarpı şeklinde ekilmiştir.

Elde edilen beyaz klonlar için PCR Master Mix ile koloni PCR kurulmuştur (Çizelge 3.15). Vektöre özgü primer çifti (SP6 ve T7) kullanılarak amplifiye edilen ürünler restriksiyon enzimleri ile kesilerek klon kütüphanesinde farklı profillerin elde edilmesi hedeflenmiştir.

Çizelge 3.15. Koloni PCR bileşenleri

Bileşen	Hacim
dH ₂ O	11,9 µl
Master Mix 2x	12,5
T7	0,3 µl
SP6	0,3 µl
DNA	-
	25 µl

PCR koşulları 95 °C'de 15 dakika öndenatürasyon, 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 54°C 'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 1 dakika 30 saniye uzama aşamalarından oluşan 30 döngü, 72 °C'de 10 dakika son uzama ve 4 °C'de inkübasyon aşamalarından oluşmaktadır.

Klon kütüphanesinin ARDRA profilinin belirlenmesi için iki farklı enzim kullanılmıştır. Enzimlerden biri *BsuRI* (*HaeIII*) (5'G G ↓C C 3')'dir. Reaksiyon (10x tampon, DNA, dH₂O, Enzim) bileşenleri ile oluşturulan karışım 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Ürünler %2,5 lik agaroz jelde 1xTBE tamponunda 60V'da 150 dk süresince yürütülmüştür.

AluI (5'A G ↓C T 3') ile yeniden kesim yapılmıştır. Reaksiyon bileşenleri (10x tampon, BSA, DNA, dH₂O, Enzim) ile kurularak 37 °C'de 2 saat süre ile inkübe edilmiş, sonrasında % 2,5 agaroz jelde 1xTBE tamponunda 60V'da 150 dk süresince yürütülmüştür.

Klon kütüphanelerinin taranması için tüm örneklerde restriksiyon enzimi olarak *AluI* (5'A G ↓C T 3') enzimi kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri (10x tampon, BSA, DNA, dH₂O, Enzim) karıştırılarak 37 °C'de 2 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kesilen DNA fragmentleri %2,5 agaroz jelde 1xTBE tamponunda 60V'da 150 dk süresince yürütülmüştür.

Farklılık gözlenen klonlar amfisilin için LB Broth besiyortamına ekilmiş ve 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerden plazmid DNA izolasyonu için GeneJET™ Plasmid Miniprep Kiti (Fermentas) kullanılmıştır. Kit içerisinde yer alan detaylı protokol aşağıda verilmiştir:

- Aşı kültürden 2 ml alınarak 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır. 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında pellet üzerine 250 µl Resuspension solüsyonu eklenmiştir ve pipet yardımıyla pelletin çözülmesi sağlamıştır.
- Üzerine 250 µl Lysis solüsyonu eklenmiştir ve 4-6 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Tüp içerisine 350µl Neutralization solüsyonu eklenmiştir ve tekrar 4-6 kez alt üst ederek karışması sağlandıktan sonra 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında süpernatant GeneJET™ spin kolonuna alınmıştır ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrasında kolonun altına kalan kısım uzaklaştırılmış ve üzerine 500µl yıkama solüsyonu eklenmiştir.
- 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildikten sonra kolonun altında kalan kısım uzaklaştırılmıştır ve bu kez yıkama solüsyonunun tamamen uzaklaştırılması için 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında kolon kısmı yeni steril bir mikrosantrifüj tüpüne konularak üzerine Elution tamponu eklenmiştir. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 3 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir ve kolon kısmı atılmıştır.
- Elde edilen plazmid DNA'larının agaroz jelde kontrolü yapılmıştır ve -20°C'de saklanmıştır.

3.2.4.4.16S rRNA DGGE PCR ürünleri elde edilmesi ve DGGE analizi

Denatüre Edici Gradient Jel Elektroföresi (DGGE); aynı boyutta ancak farklı nükleotid dizilimine sahip DNA'ların dereceli artan denatüre edici ajana sahip poliakrilamid jel içinde ayrılması prensibidir (Muyzer vd., 1993). Denatüre edici ajan olarak üre ve formamid kullanılmıştır. Sırasıyla aşağıdaki verilen aşamalar takip edilerek analiz süreci tamamlanmıştır.

- Su/toprak/çamur örneklerinden DNA ekstraksiyonu
- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile 16S rRNA bölgesini çoğaltılması
- Denatüre edici kademeli jel elektroföresi (DGGE) ile PCR ürünlerinin birbirinden ayrılması

Bakteriler için DGGE PCR Çizelge 3.16'da verilen bileşenler ile kurulmuştur. Amplifikasyon gradient PCR uygulanarak yapılmıştır. Koşullar bir döngü 94 °C'de 5 dakika denatürasyon, 65 °C'de 1 dakika bağlanma, 72 °C'de 3 dakika uzama; 9 Döngü (her döngüde primer bağlanma sıcaklığı 1 °C azaltılarak) 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 64°C-55°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 3 dakika uzama, 20 Döngü 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 3 dakika uzama ile bir döngü 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 55°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 10 dakika son uzama, 4°C'de inkübasyon aşamalarından oluşmaktadır.

Çizelge 3.16. Bakteri DGGE PCR Bileşenleri

Bileşen	Hacim
dH ₂ O	13,275 µl
Tampon 5x	5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
dNTPs	2,5 µl
344 F(GC)	0,3 µl
907R	0,3 µl
DNA	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,125 µl
	25 µl

Benzer şekilde Arke için DGGE PCR Çizelge 3.17’de verilen bileşenler ile kurulmuştur. Amplifikasyon gradient PCR uygulanarak yapılmıştır. Koşullar bir döngü 94 °C’de 5 dakika ön denatürasyon, 94 °C’de 30 saniye, 56 °C’de 45 saniye bağlanma, 72 °C’de 2 dakika uzama (29 döngü) ve 94 °C’de 30 saniye, 56 °C’de 45 saniye bağlanma, 72 °C’de 7 dakika uzama 1 döngü ve 72°C’de 10 dakika son uzama, 4°C’de inkübasyon aşamalarından oluşmaktadır.

Çizelge 3.17. Arke DGGE PCR Bileşenleri

Bileşen	Hacim
dH ₂ O	13,275 µl
Tampon 5x	5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
dNTPs	2,5 µl
341 F(GC)	0,3 µl
907R	0,3 µl
DNA	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,125 µl
	25 µl

Amplifikasyonu yapılan DGGE PCR ürünleri %1’lik agaroz jele yüklenerek 1x TAE tamponunda 100 V’da 70 dk süresince yürütülmüştür. Safsızlık görülen PCR ürünlerinin jelden geri kazanımında GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas, Litvanya) protokolü uygulanmıştır (GeneJET Jel Ekstraksiyon Kit, Teknik Kitapçığı). Takip edilen prosedür aşağıda verilmiştir:

- Saflaştırılmak istenilen fragment(ler) steril bir bisturi ile agaroz jelden kesilmiştir.
- Kesilen jel parçaları önceden ağırlığı tartılmış steril mikrosantrifüj tüplerinin içerisine alınıp, tüplerin dolu ağırlıkları alınmıştır. Böylece kesilen jel parçalarının ağırlıkları hesaplanmıştır.
- Ağırlıkları belirlenen jel parçalarına 1:1 (hacim:ağırlık) oranında kitin içerisinde yer alan Bağlanma tamponu eklenmiştir ve 60°C’de yaklaşık 10 dakika bekletilerek jelin tamamen erimesi sağlanmıştır.
- Bağlanma tamponu içerisinde eritilen jel, kit içerisinde bulunan Gene JET™ saflaştırma kolonuna alınmıştır ve 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında kolonun altında kalan kısım atılarak toplama tüpü kolona tekrar yerleştirilmiştir. Kitin içerisinde bulunan yıkama tamponundan 700 µl kolon üzerine eklenerek 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Altta kalan kısım atıldıktan sonra toplama tüpü kolona yerleştirilmiştir. Yıkama tamponun uzaklaştırılması için tekrar 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon steril bir santrifüj tüpü içerisine yerleştirilerek, üzerine kit içerisinde bulunan 50µl Elution çözeltisi eklenmiştir ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 14000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- Spin kolon atıldıktan sonra tüpte saf DNA kalmış ve kullanımına kadar -20 °C’de saklanmıştır.

DGGE için, %100 ve %0 DGGE stok solüsyonlar kullanılması ile istenilen gradientlerde jel hazırlanmıştır. Stok solüsyonların hazırlanması için gerekli bileşenler Çizelge 3.18 ve 3.19’da verilmiştir.

Çizelge 3.18. DGGE Stok solüsyon-I

%100 DGGE Stok Solüsyonu	
Üre	42 g
Deiyonize Formamid	40 ml
%40 Akrilamid/Bis akrilamid	20 ml
TAE (50x)	2 ml

Çizelge 3.19. DGGE Stok solüsyon-II

%0 DGGE Stok Solüsyonu	
%40 Akrilamid/Bis akrilamid	20 ml
TAE (50x)	2 ml

DGGE jeli %100 ve % 0 stok solüsyonlarından Çizelge 3.20’de ve Çizelge 3.21’de verilen hacimlerde alınarak karıştırılır ve %60-%40 ve %50-30 konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Yüksek konsantrasyonda hazırlanan karışımına 200 µl boya çözletisinden eklenmiştir. Her iki karışıma 200 µl APS ve 20 µl TEMED eklenmiştir.

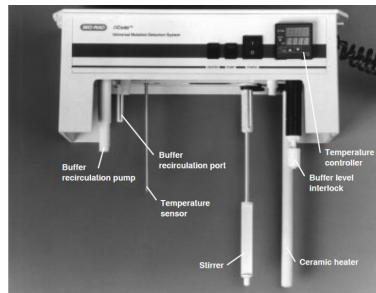
Çizelge 3. 20. %60-%40 konsantrasyonda jel hazırlanması için gerekli hacimler

Jel yüzdesi	Stok Solüsyon	
	% 100	% 0
% 60	12 ml	8 ml
% 40	8 ml	12 ml

Çizelge 3. 21. %50-%30 konsantrasyonda jel hazırlanması için gerekli hacimler

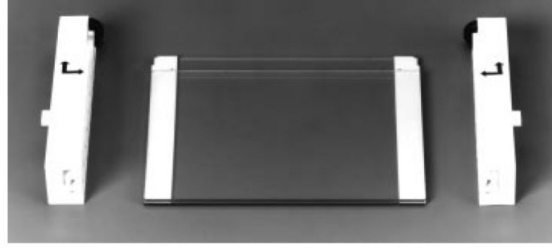
Jel yüzdesi	Stok Solüsyon	
	% 100	% 0
% 50	10 ml	10 ml
% 30	3 ml	17 ml

- i. 1xTAE tampon (7 L) ile tank doldurulmuştur. Kapak kapatılmış, karıştırıcı ve ısıtıcı çalıştırılmıştır. Isıtıcı 60 °C’ye ayarlanarak tamponun ısınması sağlanmıştır (Şekil 3.3).

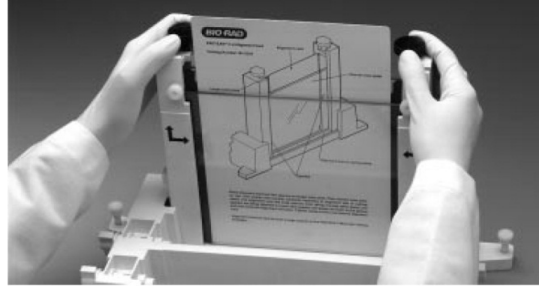


Şekil 3.3. Elektroforez sıcaklık kontrol modülü

- ii. %8 jel konsantrasyonuna uygun olarak %0 ve %100 DGGE stok solüsyonları hazırlanmıştır.
- iii. %10 APS çözeltisi hazırlanmıştır.
- iv. Camlar ve jel düzeneği hazırlanmıştır (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).

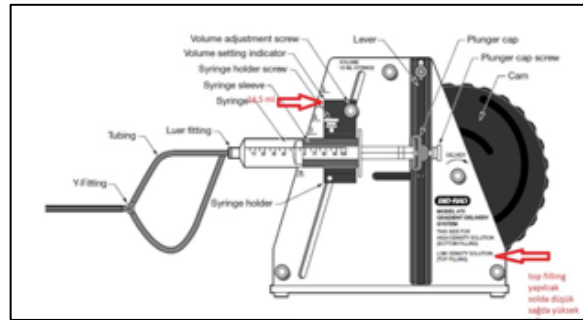


Şekil 3.4. Cam plakalar, aralayıcı ve kısıkaçların pozisyonu

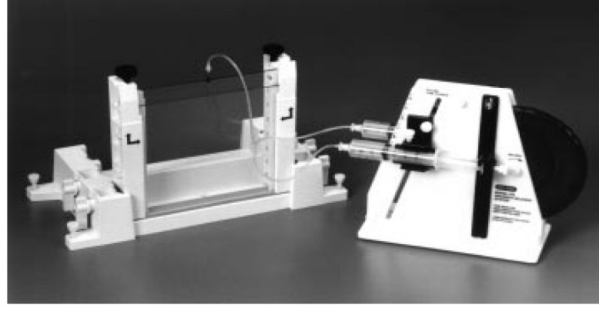


Şekil 3.5. Sandviç birleşmesinde aralayıcıların dizilme şekli

- v. Yukarıdaki tabloya göre %40 ve %60 jel içine 200ul APS, 20ul TEMED her birine konulmuştur. Yüksek yüzdeli olan jele 200 µl boya eklenmiştir.
- vi. Jel şırıngalara çekilir ve şırıngalar Top filling'e uygun şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). Yavaşça tekerlek çevrilerek 1ml/sn gibi bir hızda olacak şekilde sabit hızda doldurulmuştur.



Şekil 3.6. Gradient oluşturma sistemi



Şekil 3.7. Paralel gradient jel kaset sistemi

- vii. Tarak takılmış ve donmaya bırakılmıştır.
- viii. PCR ürünleri yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklenmiş, tamponunun sıcaklığı 60 oC'deyken 18 saat süresince 90 V'da yürütülmüştür.
- ix. Jelin yürümesi sonlandıktan sonra EtBr ile boyanmış ve iki kere distile su ile yıkandıktan sonra görüntülenmiştir.
- x. Jellerde farklı konumlardaki bantlar UV ışığı altında steril bisturi yardımıyla jelden kesilerek steril ependorf tüpleri içine alınmıştır.
- xi. Jel ağırlığı oranında çözücü tampon ilave edilmiş ve 1 gece 37 oC'de 150 rpm hızda çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır.
- xii. DNA izolasyon yönteminin Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) aşamasından sonrası uygulanmış ve GC kuyruğu bulunmayan DGGE primerleri ile tekrar amplifiye edilmiştir.
- xiii. Ürünler %1 agaroz jelde yürütülerek gözlenmiştir.

Re-PCR bileşenleri Çizelge 3.22'de verilmiştir ve bileşenler kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon koşulları 95 °C'de 5 dakika öndenatürasyon, 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C 'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 1 dakika 30 saniye uzama aşamalarından oluşan 30 döngü, 72 °C'de 10 dakika son uzama ve 4 °C'de inkübasyon aşamalarından oluşmaktadır.

Çizelge 3. 22. Re-PCR bileşenleri

Bileşen	Hacim
dH ₂ O	13,275 µl
Tampon 5x	5 µl
MgCl ₂	2,5 µl

Çizelge 3.22 (devam) Re-PCR bileşenleri

Bileşen	Hacim
dNTPs	2,5 µl
341 F(GC)	0,3 µl
907R	0,3 µl
DNA	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,125 µl
	25 µl

3.2.5. FISH (Fluoresan in situ hibridizasyon) analizi

FISH analizinde optimizasyon çalışması yapılmıştır. Protokollerden bir tanesi Amann vd tarafından hazırlanmıştır ve işlem basamakları aşağıda verilmiştir. Bu protokolde formamid miktarı denenmiştir. Hibridizasyon tamponuna 700 µL ve 900 µL hacminde formamid eklenmiş ve iki farklı deneme yapılmıştır (Anton vd., 1999).

- Fiksasyon amacıyla, 1 mL, 3 mL, 5 mL ve 10 mL su örneğine toplam hacimde %4 Formaldehit (%37 v/v) eklenerek 4°C’de 1 gece fikse edilmiştir.
- Fiksasyon sonrası farklı hacimlerdeki örnekler 0,2 µm por çaplı GTTP Isopore (Millipore, 25 mm çap) filtreden geçirilmiş ve filtrenin yıkanması amacı ile 10 mL 1X steril PBS kullanılmıştır.
- Filtreler yıkandıktan sonra hibridizasyon işlemine kadar muhafaza edilmek üzere -20 °C’de depo edilmiştir.
- Fiksasyon işleminin sonrasında hibridizasyon için filtrenin küçük bir kısmı kullanılmıştır. Hibridizasyon tamponunun 18 µL’sine ve 2 µL prob (Arc 915 ve Eub338 CY5 boya işaretli) eklenerek elde edilen karışım filtre üzerine pipetlenmiştir.
- Geriye kalan hibridizasyon tamponu hibridize edilecek filtrelerin yerleştirildiği falkon tüplerinin içini nemli tutmak ve formamid buharı oluşturmak amacı ile kullanılmıştır.
- Lam üzerinde hibridizasyon çözeltisi içeren filtre parçaları yatay şekilde önceden 46 °C’ye getirilmiş hibridizasyon fırınında (Hybridizatin oven H0-10) 2 saat inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon sonrasında filtreler önceden 48 °C’de ısıtılmış yıkama solüsyonu içerisine alınarak 15 dakika 48 °C bekletilmiştir. Bu süre sonrasında filtreler kurutma kağıdı üzerine alınarak havada kurutulmuştur.
- Örneklerdeki toplam mikroorganizma sayısını belirlemek için ortamdaki tüm DNA’ları boyama özelliğindeki DAPI boyaması uygulanmıştır. Filtre parçasına 25 µL DAPI boyası pipetlenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Aynı filtre parçası önce saf etanol ile sonrasında mQ su ile yıkanmıştır. Yıkanmış filtre havada kurutulduktan sonra, filtre lam üzerine alınmış ve citifluor/gliserol damlatılarak lamelle kapatılmıştır.
- Preparatın incelenmesi epifluoresan mikroskop kullanılarak yapılmıştır.

3 sezonda alınan su örneklerinden 1ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml hacimlerde filtreden geçirilmiştir ve formaldehit ile fikse edilmiştir. GTTP (Milipore, 0,20 µm por çapında) membrandan filtre edildikten sonra hibridizasyon yapılabilecek şekilde -20 °C’de saklanmıştır.

Uygulanan diğer protokolün basamakları da aşağıda verilmiştir ().

- Fiksasyon amacıyla, 1 mL, 3 mL, 5 mL ve 10 mL su örneğine toplam hacimde %4 Formaldehit (%37 v/v) eklenerek 4°C’de 1 gece fikse edilmiştir.
- Fiksasyon sonrası farklı hacimlerdeki örnekler 0,2 µm por çaplı GTTP Isopore (Millipore) filtreden geçirilmiş ve filtrenin yıkanması amacı ile 10 mL 1X steril PBS kullanılmıştır.
- Filtre yüzeyi 20 µL %0,2 Low Melting Agarose ile kaplanmıştır. 35°C’de 10 dk bekletilmiştir.
- Filtre parçası 0,5 ml’lik tüpe konulmuştur.
- %50, %80 ve %96’lık etanol serisi ile yıkanmıştır (her biri için 1-5 dk).
- Havada kurutulan filtre parçası tekrar tüpe konulmuştur.
- 100 µL hibridizasyon tamponu tüpe eklenir.
- 5 µL prob tüpe eklenir.
- Hibridizasyon işlemi için tüplerdeki filtreler 46°C’de 90 dakika bekletilir.
- Hibridizasyondan sonra filtre parçaları önceden aynı sıcaklıkta ısıtılmış yıkama tamponunda 48°C’de 30 dakika bekletilmiştir.
- Yıkama işleminden sonra filtre parçaları suda yıkanmıştır.

- Havada kurutulmuş filtre parçaları tüpe alınmış üzerine 25 µL DAPI eklenmiş ve 20 dk bekletilmiştir.
- Su ile yıkandıktan sonra filtre parçaları havada kurutulmuştur.
- Lam üzerine alınan filtre parçasına citifluor/glisero1 damlatılarak lamelle kapatılmıştır.
- Preparatın incelenmesi epifluoresan mikroskop kullanılarak yapılmıştır.

Alınan yedi örnek için de 10 ml su geçirilen filtreler preparat hazırlamak için kullanılmıştır.

3.2.6. Metagenomik yaklaşımla çeşitliliğin belirlenmesi

Su örneklerinden ekstrakte edilen çevresel DNA'ların metagenomik analizinin yapılması için BM Yazılım, Danışmanlık ve Lab. Sis.Ltd. Şti (Ankara, Türkiye) firmasına gönderilmiştir. Analiz Illumina Miseq Sisteminde 16S Ribozomal RNA Gen Amplikon paneli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yeni Nesil Dizileme sisteminde hedef 16S rRNA gen bölgesindeki V3-V4 bölgeleri olarak belirlenmiştir. Bu bölge prokaryot organizmalar için tasarlanan 341F (CCT ACG GGN GGC WGC AG) ve 805R (GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC) primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiştir. 2,5 µL mikrobiyal çevresel DNA kalıp olarak kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 12,5 µL 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, Amplicon PCR Primer (1µM) çifti 5 µL içermek üzere toplamda 25 µL hacindedir. Reaksiyon koşulları, 95 °C 3 dakika ön denatürasyon, 95 °C 30 saniye denatürasyon, 55°C 30 saniye bağlanma, 72°C 30 saniye uzama adımlarını içeren 25 döngü, 72°C 5 dakika son uzamadan oluşmaktadır. AMPure XP boncukları amplikon ürünlerinden primer dimerleri ya da fazla primerleri saflaştırılmak için kullanılmaktadır. Index PCR Nextera XT Index Kit ile adapterleri takmaktadır. Saflaştırma için AMPure XP boncukları kullanılmaktadır. Validasyon işlemi için Bioanalyzer DNA 1000 chip kullanılmaktadır. Dizileme Illumina Miseq platformu ile yapılmaktadır (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Guide; Kozich vd., 2013).

3.2.7. Biyoinformatik analizler

Biyoinformatik analizlerde çeşitli yazılımlardan, internet siteleri ve programlardan yararlanılmıştır.

Elde edilen izolatların ve ARDRA sonucuna göre farklı profil gösteren izolatların genomik DNA'ları kalıp olarak kullanılarak amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesi PCR ürünleri dizi analizine gönderilmiştir. Dizi analizi sonucu oluşan kromatogram 4Peaks v1.8 programı ile görüntülenmiştir (Oliveira vd., 2018). Diziler BLAST programı kullanılarak nr/nt veritabanında hizalanmıştır (align edilmiştir).

Klon kütüphanesinden seçilen tüm klonların ARDRA sonucuna göre belirlenen farklı profildeki klonların plazmidleri dizi analizine gönderilmiştir. Dizi analizi sonucu oluşan kromatogram 4Peaks v1.8 programı ile görüntülenmiştir (Oliveira vd., 2018). Diziler BLAST programı kullanılarak nr/nt veritabanında hizalanmıştır (align edilmiştir).

DGGE bantlarının Re-PCR ürünleri dizi analize gönderilmiştir. Dizi analizi sonucu 4Peaks v1.8 programı ile görüntülenmiştir. Diziler BLAST programı kullanılarak nr/nt veritabanında hizalanmıştır (align edilmiştir).

Elde edilen izolatların, klonların ve DGGE bantlarının dizi analiz sonuçlarına, dış tür ve eşleşen türleri eklenmesi sonucunda MEGA 7.0 programında Neighbor joining metodu kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur (Kumar vd., 2016). Her örneklem yeri için bu işlem yapılmıştır.

Metagenomik analizinden elde edilen ham datalar, QIIME 2-2019.4 (Bolyen vd., 2019) kullanılarak işlenmiştir. Analizler NCBI veritabanında yapılmıştır. Metagenomik analizi ile elde edilen çift yönlü (paired end) sekansların yer aldığı fastq dosyalarının FASTQC programı ile kalite kontrolü yapılmıştır (Andrews, 2010). Programın ürettiği görseller baz alınarak kalitesi 20 ve üzeri olan bazların pozisyonları tespit edilmiştir. Metagenom çeşitliliği tespit etmek için QIIME 2 programı kullanılmıştır. Dosyalar öncelikle QIIME 2 programına aktarılmıştır (import). İçeri aktarılan dosyalara DADA2 komutu ile birleştirme (joined), kırpma (trim) ve kaliteye göre filtreleme işlemleri uygulanmıştır

(Callahan vd., 2016). Sonra OTU kümelenmesi (OTU clustering) yapılmış ve veritabanları kullanılarak Taxa-Bar grafikleri oluşturulmuştur. α çeşitlilik (Faith, 1992) ve β çeşitlilik (Lozupone vd., 2007) sonuçları elde edilmiştir. Örneğin kendi içindeki ve diğer gruplarla olan etkileşimleri verilmiştir.

3.2.8. İstatiksel Analizler

Çevresel parametreler ve çeşitliliğin birbirine etkisinin incelenmesi için PAleontology STatistics (PAST) programı versiyon 3 kullanılmıştır (Hammer vd., 2008). Klon sayıları ve metagenomik analiz sonucunda elde edilen okuma sayıları çeşitlilik için belirtilirken pH, metal konsantrasyonları çevresel etmenler olarak programda veri tablosu oluşturulmuştur.

Birinci sezon örneklerin çevresel özelliklerine karşılık klon sayıları ve metagenomik analiz okuma sayıları girilerek hazırlanan tablolar sırasıyla Şekil 3.8 ve 3.9'da verilmiştir. Birinci örnek alanının üç sezon örneklerinin çevresel özelliklerine karşı klon sayıları ve metagenomik analiz okuma sayıları girilerek hazırlanan tablolar sırasıyla Şekil 3.10 ve 3.11'de verilmiştir.

Veri tablosu kullanılarak Multivariate sekmesinden Principal Components (PCA), Principal Coordinates (PCoA) ve Canonical Correspondence Analysis (CCA) yaklaşımları ile çevresel etmen çeşitlilik korelasyonları elde edilmiştir.

	pH	Al	Au	Ca	Cd	Co	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	S	Sr	V	Zn	Metallibacterium	Leptospirillum	Acidiphilium	Acidithiobac	Sulfobacillus	Acidimicrob	Aciditerrimo	Ferrimicrobium
K2	2,32	2278693	6595	621,9	3392	12378	11538	14318654	2	3851	4041571	24	14416	21892	596	1470	1286435	0	0	0	80	0	0	0	3
K3	2,48	1110177	1748	397,2	713	4827	7342	2181233	1	1369	1166752	9	7241	6155	383	296	389255	1	1	0	47	0	0	0	0
K4	2,55	1246778	2811	447,7	737	4122	3625	2715884	1	1658	1861344	21	10344	7893	832	528	562134	0	1	11	0	2	17	28	5
K5	2,09	7304930	5267	614,5	2292	25341	70442	13801524	1	6890	3521069	4	25015	31305	197	2052	911081	0	47	3	8	0	0	0	0

Şekil 3.8. Çevresel faktör -klon sayıları ile hazırlanan veri tablosu (Birinci sezon)

	pH	Al	Au	Ca	Cd	Co	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	S	Sr	V	Zn	Ferropasmacea	Metallibacterium	Leptospirillum	Acidiphilium	Acidithiobac
K2	2,32	2278693	6595	621,9	3392	12378	11538	14318654	2	3851	4041571	24	14416	21892	596	1470	1286435	1106	0	92	74360	0
K3	2,48	1110177	1748	397,2	713	4827	7342	2181233	1	1369	1166752	9	7241	6155	383	296	389255	412	9364	16871	14406	1531
K4	2,55	1246778	2811	447,7	737	4122	3625	2715884	1	1658	1861344	21	10344	7893	832	528	562134	0	4742	27131	9743	604
K5	2,09	7304930	5267	614,5	2292	25341	70442	13801524	1	6890	3521069	4	25015	31305	197	2052	911081	31658	0	3959	0	11494

Şekil 3.9. Çevresel faktör-okuma sayıları ile hazırlanan veri tablosu (Birinci sezon)

	pH	Al	Au	Ca	Co	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	S	Zn	Leptospirillum	Acidiphilium	Acidithiobacillus	Metallibacterium	Uncultured f	Actinobacterium
K_1	2,32	218559	1463	519,5	1686	1446	808262	6	1120	994140	29	2511	3432	93917	2	0	0	7	4	28
K_6	2,8	265572	1678	501,2	1491	945	1086675	5	1127	945650	27	2356	3971	108473	28	5	1	2	2	0
K_7	2,7	464377	2509	650,4	2197	1530	2264787	4	1892	164346	41	3671	6399	169595	81	3	0	0	3	0

Şekil 3.10. Çevresel faktör-klon sayıları ile hazırlanan veri tablosu (Birinci örneklem alanı)

	pH	Al	Au	Ca	Co	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	S	Zn	Leptospirillum	Acidiphilium	Acidithiobacillus	Metallibacterium
K_1	2,72	218559	1463	519,5	1686	1446	808262	6	1120	994140	29	2511	3432	93917	0	12959	0	15873
K_6	2,8	265572	1678	501,2	1491	945	1086675	5	1127	945650	27	2356	3971	108473	12394	9629	3102	903
K_7	2,7	464377	2509	650,4	2197	1530	2264787	4	1892	164346	41	3671	6399	169595	29767	9075	0	7999

Şekil 3.11. Çevresel faktör -okuma sayıları ile hazırlanan veri tablosu (Birinci örneklem alanı)

3.2.9. Biyoteknolojik Uygulamalar

3.2.9.1. Fe⁺² için standart eğri çizilmesi

Ferrik demir konsantrasyonu belirlemek için fenantrolin yöntemi kullanılmıştır (Vogel, 1989). Fe⁺² standart eğri çiziminde 100 ppm stok çözelti kullanılmıştır. 0,1 ppm'den 10 ppm'e kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlar ve stok çözülden kullanılan hacimleri Çizelge 3.23'te verilmiştir. Dilüsyonlardaki Fe⁺² konsantrasyonu fenantrolin yöntemine göre belirlenmiştir. Fenantrolin yöntemi, 5 ml örnek üzerine 1 ml amonyum asetat çözeltisi, 2 ml fenantrolin çözeltisi eklenmiştir. Karışım 5 dk içinde 510 nm'de okunmuştur. Elde edilen veriler Excel'de grafiğe dönüştürülmüştür.

Çizelge 3.23. Standart eğri için hazırlanan dilüsyonlar

Dilüsyon	Stok Çözelti	Toplam Hacim
10 ppm	50 ml	100 ml
8 ppm	40 ml	100 ml
6 ppm	30 ml	100 ml
5 ppm	25 ml	100 ml
3 ppm	15 ml	100 ml
1 ppm	10 ml	100 ml
0,5 ppm	25 ml	100 ml
0,25 ppm	12,5 ml	100 ml
0,1 ppm	5 ml	100 ml

3.2.9.2. Fe⁺² → Fe⁺³ reaksiyonunun taranması

Leptospirillum 'a özgü besiyerinde geliştirilen 3 kültür (K3, K4, K7), 4 g/L Fe⁺² içeren besiyerine %10 inoküle edilerek, 250 ml sıvı kültür hacminde 1 L erlen kullanılarak kesikli sistemde çalışılmıştır. 6 saatlik periyotta üç kez örnek toplanmıştır. Her örnek alımı sonrasında hacmin 250 ml'de tutulması amacıyla taze besiyeri eklenmiştir.

Fe^{+2} ölçümü Fenantrolin yöntemine göre yapılmıştır. Alınan örnekler şırınga ucu filtreden (0,45 μ m por çapında) geçirilerek standart eğri aralığına girmesi amacıyla 1250 kat seyreltilmiştir. Yine 5 ml örnek üzerine 1 ml amonyum asetat çözeltisi, 2 ml fenantrolin çözeltisi eklenmiştir. Karışım 5 dk içinde 510 nm'de okunmuştur.

Elde edilen absorbans değerleri seyreltme katsayısı ve standart eğri eğimi ile çarpılarak konsatrasyon değerleri elde edilmiştir. Besiyerindeki Fe^{+2} konsantrasyonu ve elde edilen konsatrasyonlar yüzde oksidasyon hesaplanmasında kullanılmıştır.

En yüksek oksidasyona sahip kültür ile sabit sonuçlar alınmaya başladıktan sonra saatlik oksidasyon deneyleri yapılmıştır. Günlük 50 ml örnek alımı ve 50 ml besleme yapılmıştır. Örneklerdeki Fe^{+2} konsantrasyonu fenantrolin yöntemine göre okunmuştur.

Aynı mikrobiyal kültüre bu kez 2 kat Fe^{+2} içeren taze besiyeri ile besleme yapılarak saatlik ölçümler alınmıştır. Günlük 50 ml örnek alımı ve 50 ml besleme yapılarak, örneklerdeki Fe^{+2} konsantrasyonu fenantrolin yöntemine göre okunmuştur

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Örneklem Alanlarının Metal İçeriklerinin Belirlenmesi

Alınan su örneklerinin kimyasal içeriğinin analizi tamamlanmıştır. Tüm sezonlardaki örneklerde yer alan metaller Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Birinci örneklem alanının 3 sezon (Mayıs, Ocak ve Eylül) için alınan örneklerin üçünde de fazla miktarda bulunan metaller; alüminyum (Al), altın (Au), kalsiyum (Ca), demir (Fe), manganez (Mn) ve çinko (Zn) olarak tespit edilmiştir. Bunlar dışında kükürt (S), nikel (Ni), magnezyum (Mg), bakır (Cu), kalsiyum (Ca), sodyum (Na), potasyum (K), vanadyum (V), kadmiyum (Cd), kobalt (Co) da bulunan diğer metallere bir kaçırdır. Birinci örneklem alanının üç sezon incelemeleri, alüminyum (Al), altın (Au), demir (Fe), kükürt (S) ve çinko (Zn) miktarlarında artış gösterirken; yalnızca potasyum (K) miktarında azalış belirlenmiştir. Kalsiyum (Ca), kobalt (Co), bakır (Cu), magnezyum (Mg), manganez (Mn), sodyum (Na), nikel (Ni), stronsiyum (Sr) ve vanadyum (V) miktarlarında da ikinci sezonda azalış üçüncü sezonda yeniden yükseliş tespit edilmiştir.

Birinci sezonda alınan diğer 4 istasyon için kimyasal içerikte fazla konsantrasyonda bulunan metaller; K2 örneğinde alüminyum (Al), altın (Au), bizmut (Bi), kalsiyum (Ca), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), krom (Cr), bakır (Cu), demir (Fe), magnezyum (Mg), manganez (Mn), nikel (Ni), kükürt (S), potasyum (K), sodyum (Na), stronsiyum (St), vanadyum (V), çinko (Zn) olarak tespit edilmiştir.

Birinci sezonda alınan K3 örneğinde alüminyum (Al), altın (Au), kalsiyum (Ca), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), bakır (Cu), demir (Fe), lantan (La), magnezyum (Mg), manganez (Mn), nikel (Ni), kükürt (S), sodyum (Na), stronsiyum (St), vanadyum (V), çinko (Zn) metalleri tespit edilmiştir. Birinci sezonda alınan K4 örneğinde alüminyum (Al), altın (Au), bizmut (Bi), kalsiyum (Ca), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), bakır (Cu), demir (Fe), lantan (La), magnezyum (Mg), manganez (Mn), nikel (Ni), kükürt (S), stronsiyum (St), vanadyum (V), çinko (Zn) metalleri tespit edilmiştir.

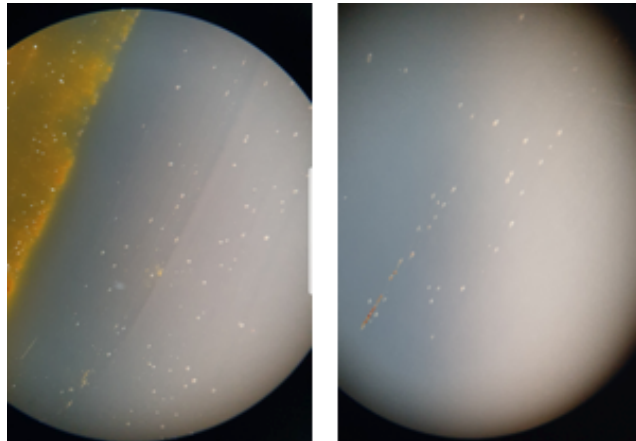
4.2. Kültüre Bağlı Yöntemler ile Mikroorganizma Tanımlama Çalışmaları

3 sezonda alınan örneklerin Bölüm 3.1.3.1’de verilen besi ortamlarına ekimleri sonucunda elde edilen izolatların kodları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Besi ortamları asidofil mikroorganizmaların beslenme şekilleri baz alınarak belirlenmiştir (Johnson, 1995; Hallberg ve Johnson, 2003). kırmızı heterotrof , mavi renk demir sülfür , lacivert renk demir triptiksoy broth, mor renk ise inorganik besiyerini ifade etmektedir.

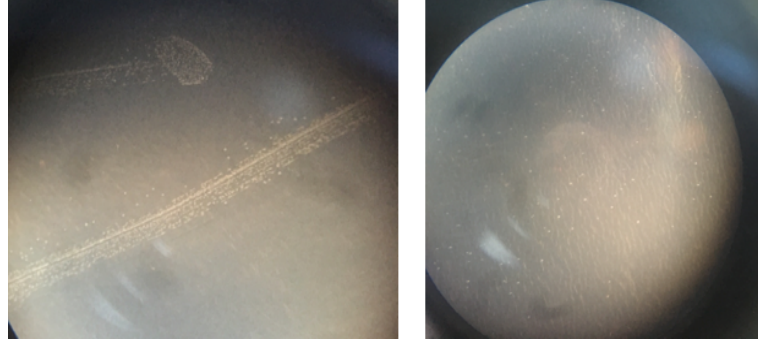
Çizelge 4. 2. Kahramanmaraş Ekinözü’nden alınan su örneklerinden elde edilen izolatlar

Örnek adı	İzolat kodları
K1	BY17,BY18,BY19, BY29,BY33,BY42,BY43,BY44, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7
K2	BY5,BY6,BY7,BY8,BY9,BY25,BY26,BY27,BY28,BY40,BY41,A8
K3	BY10,BY11,BY12,BY30,BY31,BY32,BY34,BY45,BY46,BY47,A9,A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16
K4	BY13,BY14,BY15,BY16,BY22,BY23,BY24,BY37,BY38,BY39,BY49,BY50, A17, A18, A19, A20
K5	BY1,BY2,BY3,BY4,BY20,BY21,BY51,BY35,BY36,BY48,A21,A22,A23,A24,A25, A26, A27, A28
K6	BY60, BY61, BY62, BY55, BY56, BY57, BY58, BY59, BY52, BY53, BY54
K7	BY70, BY71, BY72, BY73, BY74, BY85, BY86, BY87, BY88, BY 89, BY 90, BY91, BY92, BY94, BY77, BY78, BY81, BY82, BY83, BY84, BY92, BY93, BY75, BY76, BY79,BY80, BY96, BY97, BY98, BY99,

Stereo mikroskop ile incelenen izolatlardan heterotrof ve inorganik besi ortamında geliştirilen bakterilerin görüntüsü Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de verilmiştir.

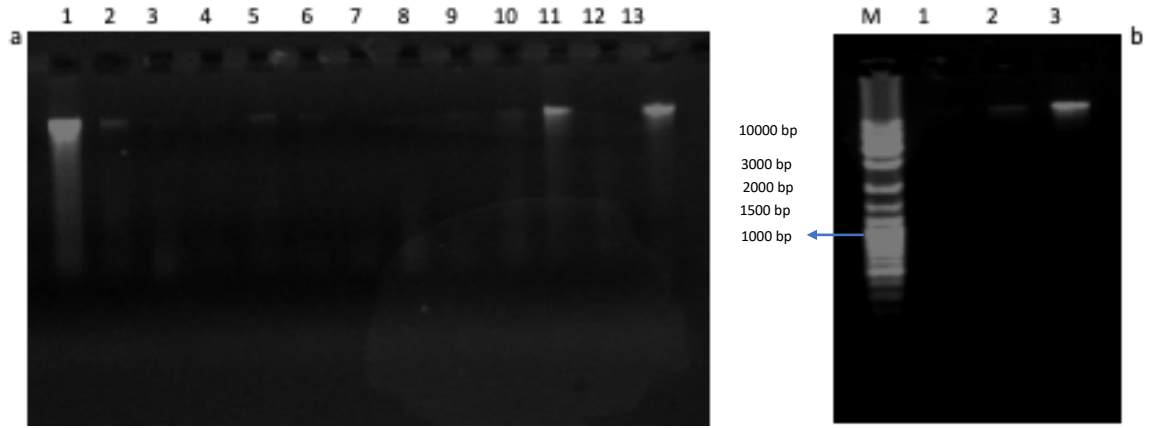


Şekil 4.1. İnorganik demir besiyerinde büyüyen mikroorganizmaların mikroskop görüntüsü



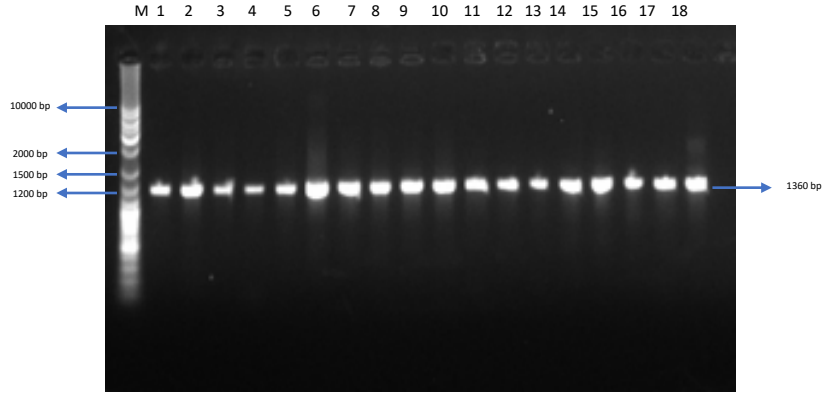
Şekil 4.2. Heterotrofik besiyerinde büyüyen izolatlar

Birinci sezon örneklerinden heterotrofik besiyerinde 19 izolat elde edilmiştir. Bunlardan 18 tanesinin genomik DNA'sı 3.2.3 numaralı başlıkta verilen yöntem takip edilerek izole edilmiştir. DNA'ların jel görüntüsü Şekil 4.3'te verilmiştir.



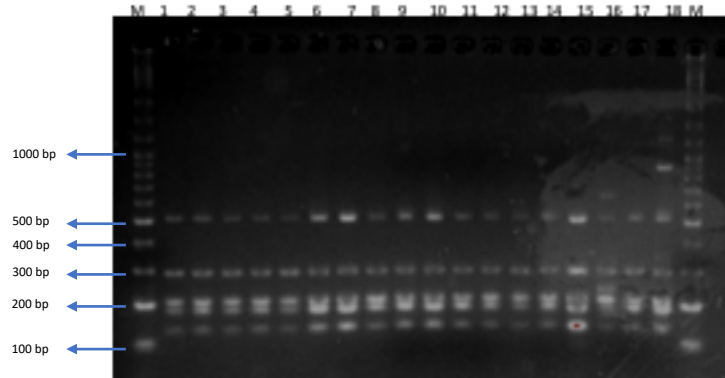
Şekil 4.3. Birinci sezon Ye3 besiyerinde izole edilen mikroorganizmaların genomik DNA'ları

Heterotof besiyerinden izole edilen mikroorganizmaların genomik DNA'ları kalıp olarak kullanılarak 27F ve 1387R primer çifti kullanılarak 16S rRNA gen bölgesinden PCR ürünleri amplifiye edilmiştir. PCR ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 4.4'de verilmiştir.

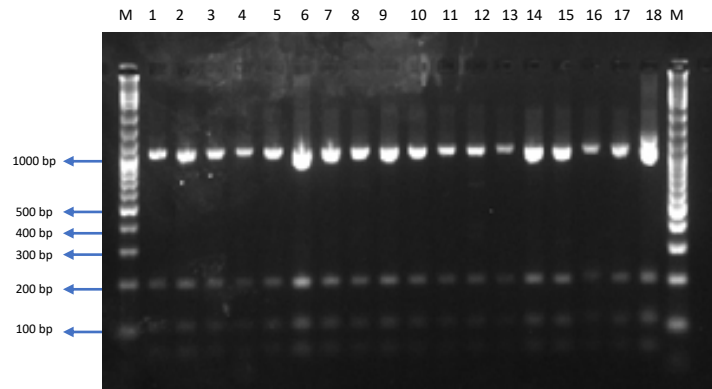


Şekil 4.4. Ye3 besiyerinde izole edilen mikroorganizmaların 16S rRNA PCR ürünü

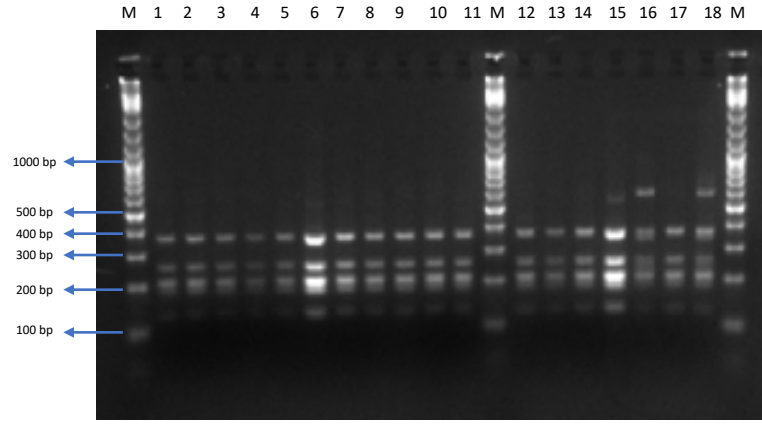
Heterotrof besiyerinden izole edilen asidofil mikroorganizmaların 16S rRNA PCR ürünlerinin kesiminde kullanılacak uygun restriksiyon enziminin bulunması için 4 farklı reaksiyon kurulmuştur. Her bir kesim profili Şekil 4.5 - Şekil 4.8 arasında verilmiştir. Farklı profillerin gözlendiği kesimler *AluI* ve *HaeIII* enzimleri ile elde edilmiştir.



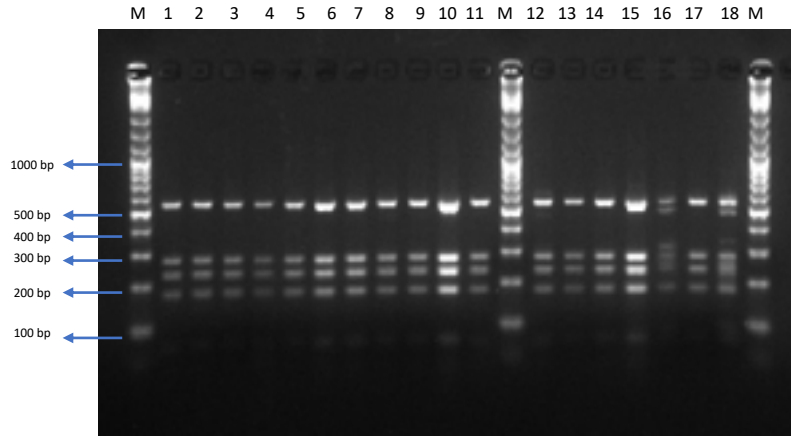
Şekil 4.5. Mikroorganizmaların 16S rRNA PCR ürünlerinin *CfoI* kesim profili



Şekil 4.6. Mikroorganizmaların 16S rRNA PCR ürünlerinin *HinfI* kesim profili



Şekil 4.7. Mikroorganizmaların 16S rRNA PCR ürünlerinin *AluI* kesim profili



Şekil 4.8. Mikroorganizmaların 16S rRNA PCR ürünlerinin *HaeIII* kesim profili

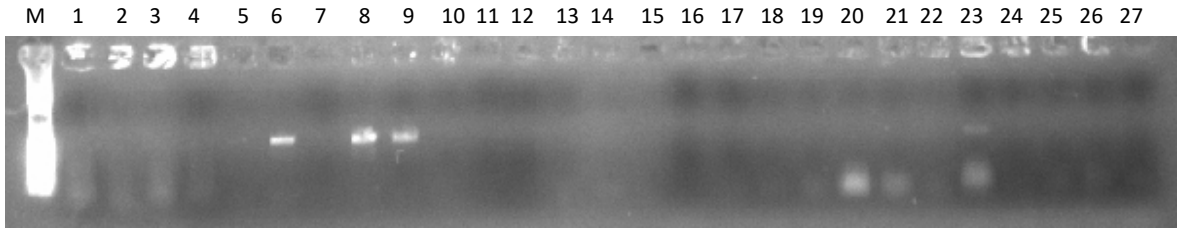
Şekil 4.5 ve Şekil 4.8 arasındaki jel görüntülerinde verilen kesim profilleri sonucunda elde edilen izolatlar profil eşleşmesi Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4. 3. Heterotrof besiyerinde gelişen izolatların kesim sonrası profile ait izolatların dağılımı

Profil	İzolat Numarası
1	BY1, BY2, BY3, BY4, BY5, BY6, BY8, BY9, BY10, BY11, BY12, BY13, BY14, BY15, BY16, BY18
2	BY17, BY19

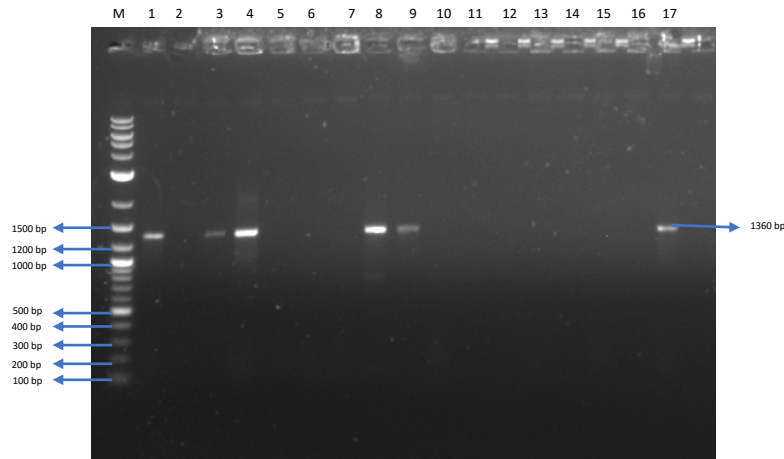
Kesim profile göre seçilen temsilcilerin 16S rRNA PCR ürünlerinin Sanger dideoksi zincir sonlandırma yöntemine göre dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Kromotogram sonucuna göre sekanslar NCBI BLAST programında hizalanmıştır (align edilmiştir).

Birinci sezon örneklerinin heterotrof besiyeri dışındaki besiortamlarında kültüre edilebilen mikroorganizmalar için koloni PCR kurulmuştur. BY-20 ve BY-51 kodu arasındaki izolatlardan elde edilen PCR ürünlerinin görüntülediği jel görüntüsü Şekil 4.9'de verilmiştir. Başarılı PCR ürünleri BY24, BY30, BY31 ve BY47 olarak belirlenmiştir.

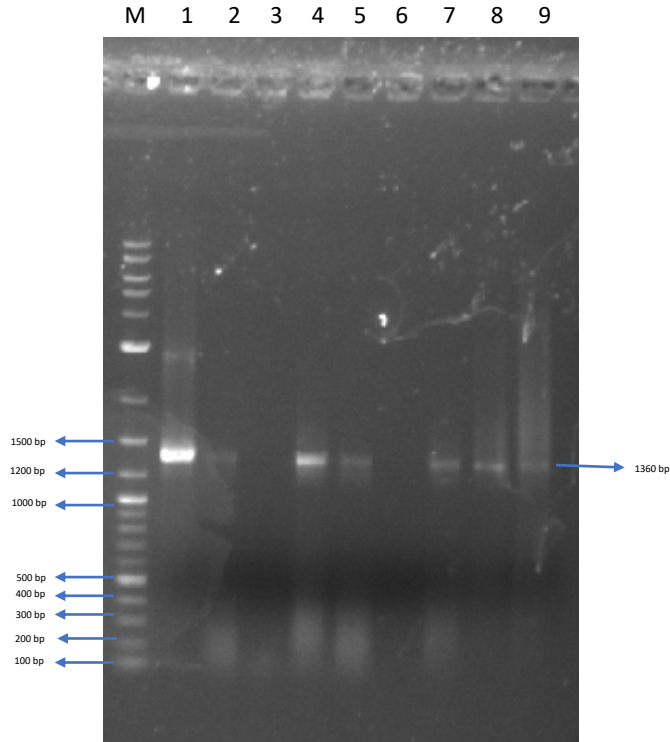


Şekil 4.9. Birinci sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M:marker, 1:BY20, 2:BY21, 3:BY22, 4:BY22, 5:BY23, 6:BY24, 7:BY25, 8:BY30, 9:BY31, 10:BY32, 11:BY33, 12:BY34, 13:BY35, 14:BY36, 15:BY38, 16:BY39, 17:BY42, 18:BY43, 19:BY44, 20:BY44, 21:BY45, 22:BY46, 23:BY47, 24:BY48, 25:BY49, 26:BY50 27:BY51

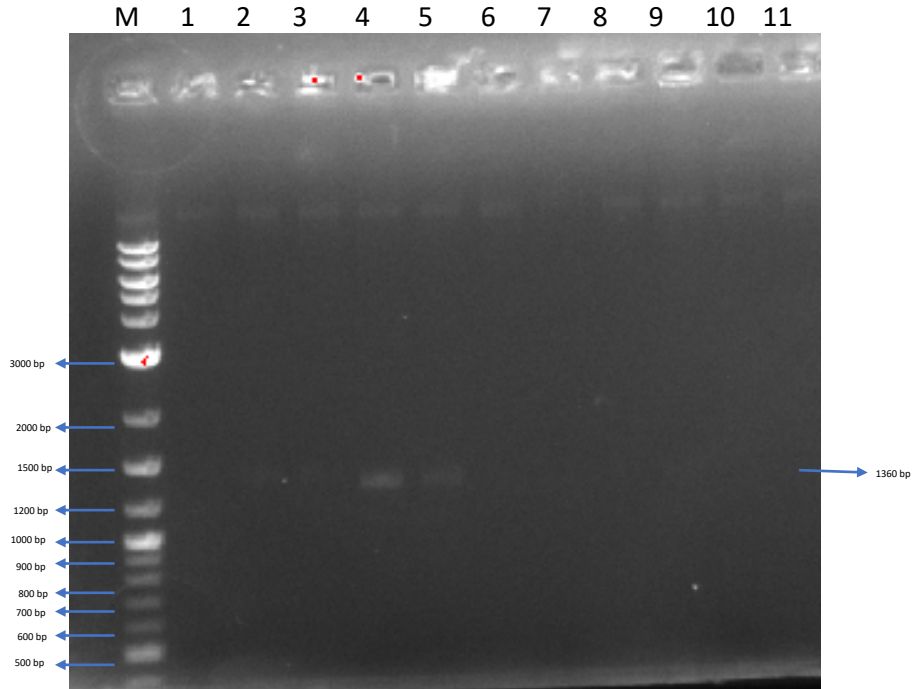
Birinci sezonda izole edilen diğer izotların için de koloni PCR'ları 3 set halinde çıkmayan izolatlar tekrar edilerek kurulmuştur (Şekil 4.10 -Şekil 4.12). Başarılı amplifiye edilen izolat 16S rRNA PCR ürünleri A16, A2, A27, A1, A20 ve A3, A7, A23, A25, A18, A13, A12, A11, A4, A10 ve A19'tur.



Şekil 4.10. Birinci sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü.M:Marker, 1:A16, 2:A28, 3:A2 4:A27 5:A26 6:A14, 7:A15, 8:A1, 9: A20, 10:A19, 11:NK, 12:NK, 13:A4, 14:A21, 15:A9, 16:A22, 17:A3



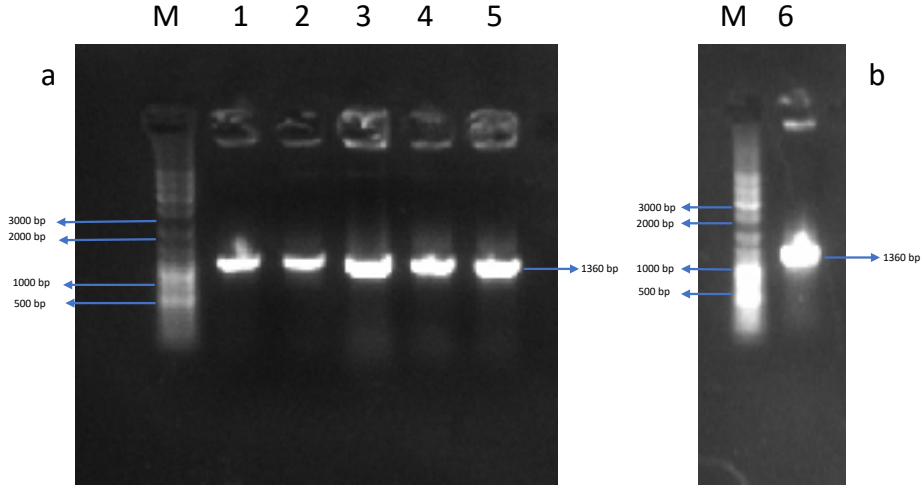
Şekil 4. 11. Birinci sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M:Marker, 1:A7, 2:A23, 3:A24, 4:A25, 5:A18, 6:A17, 7:A13, 8:A12, 9:A11



Şekil 4.12. Birinci sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M:Marker, 1:A4, 2:A6, 3:A8, 4:A10, 5:A19, 6:A21, 7:A22, 8:A9, 9:A28, 10:A27, 11:A20

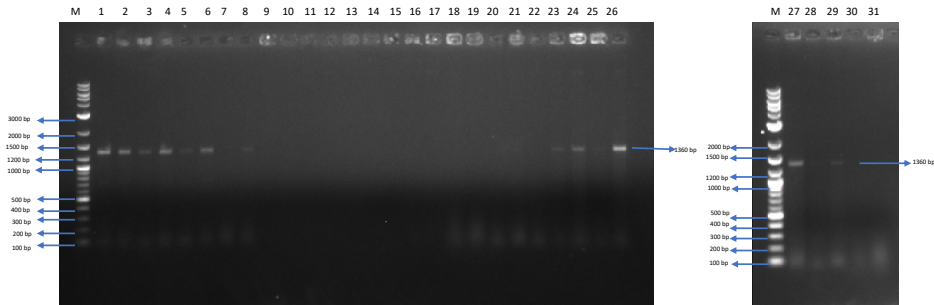
İkinci sezon alınan su örneğinden yapılan ekimlerden elde edilen izolatlar BY-52, BY-53, BY-54, BY60, BY61 ve BY62 ile amplifiye edilen koloni PCR ürünlerinin jel

görüntüsü Şekil 4.13’de verilmiştir. İzolatların PCR ürünleri başarılı şekilde amplifiye edilmiştir.



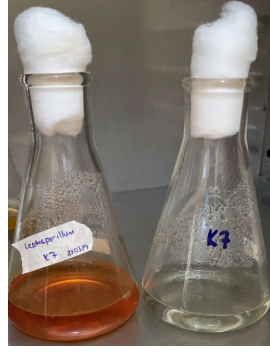
Şekil 4.13. İkinci sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M:Marker, 1:BY52, 2:BY54, 3:BY60, 4:BY61, 5:BY62, 6:BY53.

Üçüncü sezonda alınan su örneğinin yapılan ekimlerinden elde edilen izolatların 16S rRNA PCR ürünleri Şekil 4.14’de gösterilmektedir.



Şekil 4.14. Birinci ve üçüncü sezon izolatlarının koloni PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M:Marker, 1:BY96, 2:BY97, 3:BY98, 4:BY99, 5:BY79, 6:BY80, 7:A2, 8:A22, 9:BY78, 10:BY77, 11:BY81, 12:BY82, 13:BY83, 14:BY84, 15:BY92, 16: BY93, 17: BY94, 18: BY70, 19:BY71, 20:BY72, 21: BY73, 22: BY74, 23: BY86, 24:BY87, 25:BY88, 26: BY89, 27: BY90, 28:BY92, 29:BY94, 30:BY75, 31:BY79

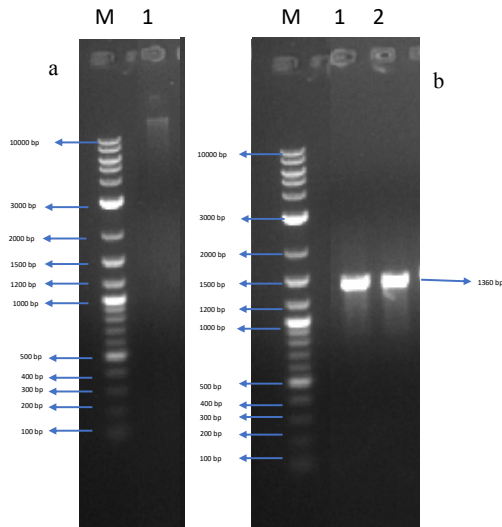
Üçüncü sezonda alınan örneğin metagenomik analizine göre yüksek oranda bulunduğu tespit edilen *Leptospirillum* için 3.1.3.1 numaralı başlıkta verilen seçici besiyeri hazırlanmıştır. Uygulama talimatında olduğu gibi çevresel örnekten inokule edilerek 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon besi ortamı açık yeşil renkten kırmızı döndüğünde sonlandırılmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *Leptospirillum*'a özgü besiyeri ve bu besiyerinde geliştirilen K7 izolatı

Kültürden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'ya ait jel görüntüsü Şekil 4.16a ve kalıp olarak kullanıldığı 27F ve 1387R primer çifti ile amplifiye edilen ürünün jel Şekil 4.16b 'de verilmiştir.

Pozitif sonuç alınan PCR ürününün Sanger dideoksi zincir sonlandırma yöntemine göre dizi analizi gerçekleştirilmiştir. NCBI BLAST programında hizalanan (align edilen) izolatların eşleştiği tür %98 oranında *Leptospirillum ferrooxidans* olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.16. *Leptospirillum*'a özgü besiyerinde geliştirilen K7 genomik DNA ve 16S rRNA PCR ürünü a:M:marker, 1:genomik DNA. b:M:Marker, 1ve 2:16S rRNA PCR ürünü

Kültüre bağlı çalışmalar kapsamında arke domaininde yer alan *Ferroplasma* için hazırlanan besi ortamına K5 örneklem alanınınından alınan sudan inokulum yapılmıştır. Gelişim gözlenmiş ancak tanımlanması yapılamamıştır.

İzolatların başarılı ile amplifiye edilen PCR ürünleri dizi analizine gönderilmiş, gelen dizi analizi sonuçları NCBI'daki blastn ara yüzünde nr/nt veritabanında hizalanmıştır (align edilmiştir). Eşleşen türler ve yüzde benzerlikleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. İzole edilen mikroorganizmaların moleküler identifikasyon sonucu

İzolat Kodu	Eşleştiği tür ve benzerlik oranı	Baz Sayısı	Yüzde Benzerlik
BY3	<i>Acidiphilium cryptum</i> NR_025851.1	980 bp	%100
BY6	<i>Acidiphilium cryptum</i> NR_025851.1	707 bp	%99
BY13	<i>Acidiphilium cryptum</i> NR_025851.1	1331 bp	%100
BY16	<i>Acidiphilium cryptum</i> NR_025851.1	1278 bp	%100
BY17	<i>Acidibacter ferriducens</i> NR_126260.1	1357 bp	%87
BY30	<i>Uncultured Acidithiobacillus sp.</i> KF848644.1	291 bp	%98
BY31	<i>Acidisoma tundrae</i> NR_042705.1	295 bp	%87
BY47	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769771.1	294 bp	%81
BY52	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769771.1	1279 bp	%97
BY53	<i>Uncultured Acidithiobacillus sp.</i> KF848644.1	1280 bp	%96
BY54	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769771.1	1293 bp	%98
BY60	<i>Acidiphilium sp.</i> FJ194544.1	1333 bp	%96
BY61	<i>Acidiphilium sp.</i> AM176778.1	1339 bp	%96
BY62	<i>Acidiphilium sp.</i> AM176778.1	1297 bp	%97
BY79	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769771.1	1161 bp	%99
BY96	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769772.1	1133 bp	%99
BY97	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769771.1	893 bp	%99
A1	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769771.1	837 bp	%99
A2	<i>Bacterium DX-A</i> EU710758.1	1271 bp	%99
A3	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769771.1	724 bp	%99
A7	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769771.1	1233 bp	%99
A10	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769772.1	1343 bp	%99
A11	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769771.1	1210 bp	%99
A12	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769771.1	1220 bp	%100
A16	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769771.1	1218 bp	%99
A19	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769772.1	1263 bp	%99
A20	<i>Uncultured prokaryote</i> JX297616.1	1253 bp	%99
A25	<i>Acidithiobacillus sp.</i> HM769772.1	1319 bp	%99
K7	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> NR_027216	1171 bp	%98

Tez çalışmasında elde edilen izolatların kodları ve dizi analizine gönderilen ve tanımlanmış olan izolatların listesi Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4. 5. Tez çalışmasında elde edilen ve tanımlaması yapılan izolatların kodları

Örnek adı	İzolat kodları	Dizilemeye Gönderilenler	Tanımlaması yapılanlar
K1	BY17,BY18,BY19, BY29,BY33,BY42,BY43,BY44, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7	BY17, BY19, A1,A2,A3	BY17, A1,A2,A3
K2	BY5,BY6,BY7,BY8,BY9,BY25,BY26,BY27,BY28,BY40,BY41,A8		BY5,BY6,BY7,BY8,BY9
K3	BY10,BY11,BY12,BY30,BY31,BY32,BY34,BY45,BY46,BY47,A9,A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16	BY30,BY31,BY47,A10, A11,A12,A13,A16	BY10,BY11,BY12, BY30,BY31,BY47,A10, A11,A12,A13,A16
K4	BY13,BY14,BY15,BY16,BY22,BY23,BY24,BY37,BY38,BY39,BY49,BY50, A17, A18, A19, A20	BY13, BY16, A18, A19, A20,	BY13, BY16, A18, A19, A20,
K5	BY1,BY2,BY3,BY4,BY20,BY21,BY51,BY35,BY36,BY48,A21,A22,A23,A24,A25, A26, A27, A28	BY3,BY6,A23,A25,A27	BY3, BY6, A23,A25,A27
K6	BY60, BY61, BY62, BY55, BY56, BY57, BY58, BY59, BY52, BY53, BY54	BY52, BY53, BY54, BY60, BY61, BY62	BY52, BY53, BY54, BY60, BY61, BY62
K7	BY70, BY71, BY72, BY73, BY74, BY75, BY76 BY77, BY78, BY79, BY80, BY81, BY82, BY83, BY84, BY92, BY93, BY85, BY86, BY87, BY88, BY 89, BY 90, BY91, BY92, BY94, BY96, BY97, BY98, BY99	BY79, BY80, BY96, BY97, BY98, BY99	BY79, BY96, BY97

Kültüre bağı tekniklerde kullanılan beslenme şekilllerine göre seçici olan besiyerleri yanı sıra metagenomik sonuçları dikkate alınarak *Leptospirillum*'a özgü sıvı besiyerinde izolasyon yapılmıştır. Kültürden bağımsız teknikler ile belirlenen mikroorganizmaların kültüre alınabilmesi her zaman mümkün olmamaktadır. Doğal habitatında bulunan ve DNA'ya bağı yöntemler ile identifiye edilen mikroorganizmalar besi ortamında benzer koşullar oluşturulsa dahi büyütememektedir. Bu çalışma kapsamında ve yedi örneklem alanında daha fazla izolasyonun yapıldığı mikroorganizmalar heterotrof ve kemolitotrof beslenme şekillerinde (Johnson, 1998) olan mikroorganizmalar olmuştur.

Morfolojik farklılık gözlenen asidofil bakteriler tekrar pasajlanmıştır. İnkübasyon sürelerinin en az on gün olması ve mutualist yaşamlarının ağır basması nedeniyle aktif tutulamayan mikroorganizmalar olmuştur. Bu sebep dolayısıyla, FeS besiyerinde büyütilen mikroorganizmaların tanımlamaları yapılamamıştır.

Kültüre bağı identifikasyonda sezonsal inceleme yapıldığında, K1 örneklem alanında heterotrofik besi yerinde büyülmüş, #BY17 ve #BY19 izolatları ARDRA sonucuna göre farklı profil vermiştir. Bu nedenle 1357 bç uzunluğundaki 16S rRNA gen bölgesinin BLAST veri tabanlarında analizi sonucunda %87 oranında benzer tespit edilen BY17 ve identifikasyon aşamasına gelinememiş BY19 izolatlarının yeni tür olabileceği tahmin edilmektedir. Bu mikroorganizmalar dışında *Acidithiobacillus* sp., bahar mevsiminde alınan birinci örneklem yerinde izoel edilmiştir. Sonbaharda alınan K1 örneklem alanının ikinci sezon örneği olan K6 örneklem alanında *Acidithiobacillus* sp. ve *Acidiphilium* sp. izole edilmiştir. Kış mevsiminde alınan aynı örneklem alanının üçüncü sezonunda ise *Leptospirillum ferrooxidans* ve *Acidithiobacillus* sp., izolasyonları yapılmıştır.

Birinci sezonda alınan dört örneklem alanında ise, bahar mevsiminde *Acidiphilium cryptum* ve *Acidithiobacillus* sp. tanımlanmıştır.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, Walton-Johnson 1992'de ve Johnson ve arkadaşlarının 1992'de yaptığı çalışmalarda izole ettikleri asidofil mikroorganizmalar *Thiobacillus ferrooxidans* ve *Leptospirillum ferrooxidans* olarak tanımlanmıştır. Schippers

ve çalışma arkadaşları 1995 yılında kültüre alabildikleri mikroorganizmaları *Sulfolobus/Acidianus*, *T. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* olarak belirlemişlerdir.

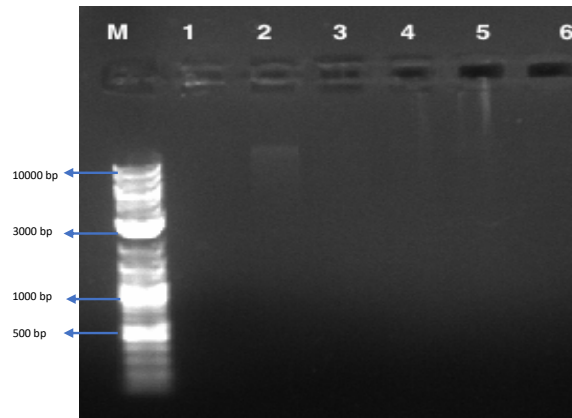
Halberg ve Johnson ise *Leptospirillum ferrooxidans* ve *Acidithiobacillus ferrooxidans* türlerini kültüre bağlı çalışmalarda izole etmişlerdir (Halberg ve Johnson, 2003).

Aytar ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları kültüre bağlı çalışmada *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidiphilium organovorum* strain TFC, *Ferrimicrobium acidiphilium*, *Ferritrix thermotolerans*, *Acidicapsa ligni*, *Acidiphilium acidophilum*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidicapsa ligni strain WH120*, *Acidiphilium rubrum* türlerinin izolasyonunu tamamlamışlardır.

4.3. Kültürden Bağımsız Yöntemler ile Mikroorganizma Tanımlama

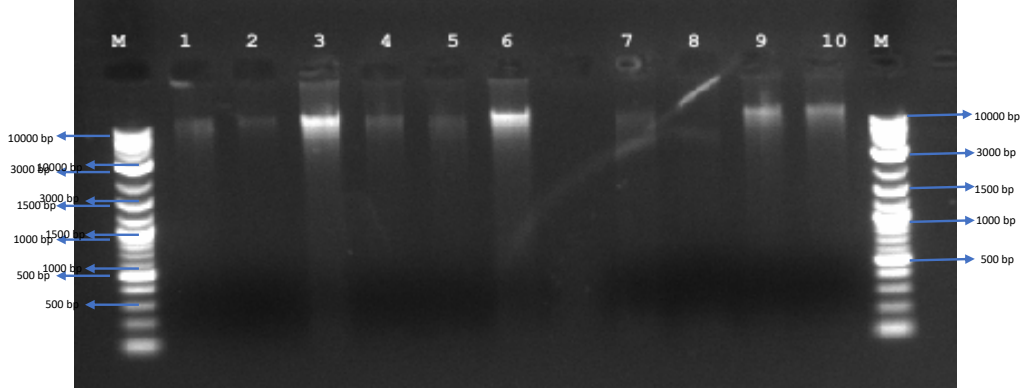
4.3.1. Membran filtrasyon ve DNA izolasyonu

Birinci sezon örnekleri alındıktan sonra 3.2.4.1.'de verilen protokole göre su örnekleri membran üzerine filtre edilmiştir. 3.2.4.2 numaralı başlıktaki çevresel DNA izolasyonu protokollerinde MOBIO Power Soil DNA Isolation Kit kullanılarak uygulanan izolasyon başarılı olmamıştır. Şekil 4.17'de verilen jel görüntüsünde DNA'ların ekstrakte edilemediği görülmektedir.



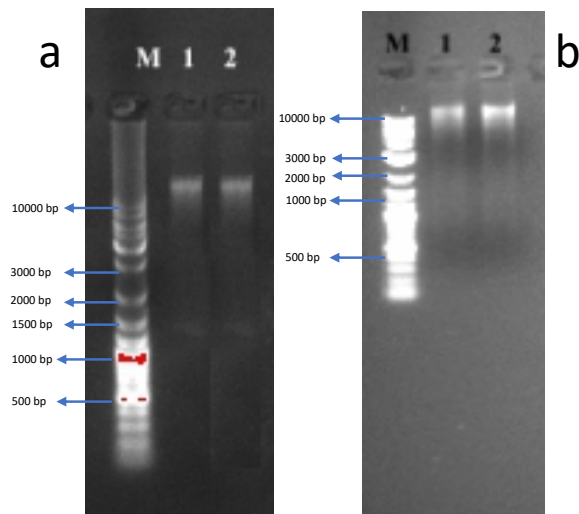
Şekil 4.17. Yarım filtre ile izole edilen çevresel DNA görüntüleri (1 µl) M: 2 kb NEB DNA ladder; 3:K1, 4:K2; 5:K3; 6:K4

Başarısız olan birinci ekstraksiyon denemesi sonrasında farklı bir kit kullanılmıştır. Yine 3.2.4.2 numaralı başlıkta verilen PureLink Microbiome DNA Purification Kit ile DNA ekstraksiyonu protokolü uygulanmıştır. Elde edilen DNA'ların jel görüntüleri Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18. Çevresel DNA'ların elektroforez jel görüntüsü. M:DNA ladder (1 kb), 1-2: K5 çevresel DNA, 3-4:K4 çevresel DNA, 5-6:K3 çevresel DNA, 7-8: K2 çevresel DNA, 9-10: K1 çevresel DNA.

Birinci sezon DNA ekstraksiyonun başarılı olmasından sonra alınan ikinci ve üçüncü sezon örnekleri de 3.2.4.1 numaralı başlıkta verilen membran filtrasyon protokolüne göre filtrasyon sonrası 3.2.4.2. numaralı başlıkta verilen PureLink Microbiome DNA Purification Kit ile DNA ekstraksiyonu protokolüne göre çevresel DNA'lar elde edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. İkinci ve üçüncü sezon örnekleri çevresel DNA jel görüntüsü. a) M:Marker 2log DNA ladder; 1 ve 2: İkinci sezon çevresel DNA, b) M: Marker 2log DNA ladder; 1 ve 2: Üçüncü sezon çevresel DNA

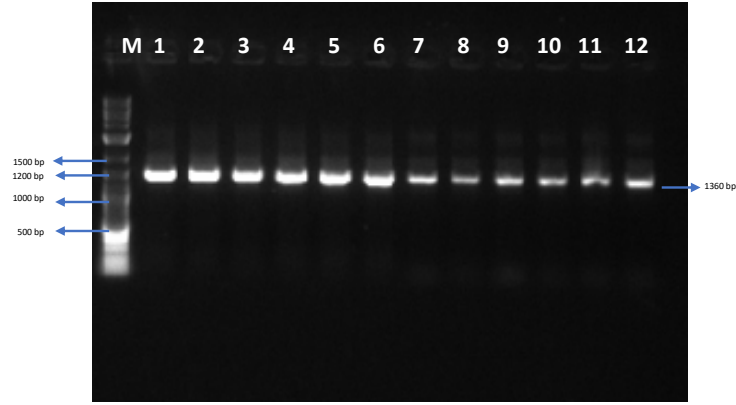
Çevresel DNA'lar elde edildikten sonra birinci sezon için jelde en parlak gözükümlerinin diğler sezonlarda ise iki yarım filtreden ekstrakte edilen DNA'ların konsantrasyonları NanoDrop (Thermo Scientific) ile belirlenmiş ve Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Üç sezonda alınan örneklerden ekstrakte edilen çevresel DNA'ların konsantrasyonu

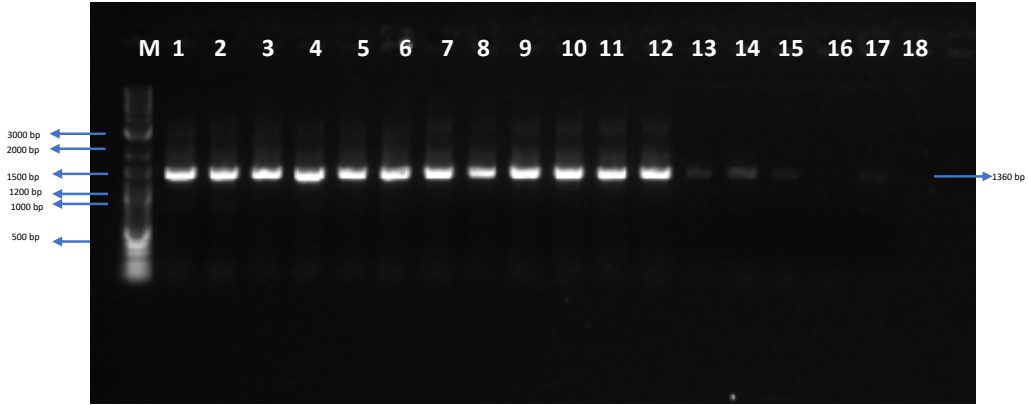
Örnek Adı	Kons. ng/µl	260/280	260/230
K1-1	45,1	1,91	1,30
K2-1	34,7	1,96	1,63
K3-1	42,1	2,03	1,98
K4-1	101,3	1,94	2,18
K5-1	9,1	1,91	1,17
K6-1	84,3	1,89	0,13
K6-2	76,7	1,93	0,12
K7-1	34,6	1,82	2,03
K7-2	33,8	1,81	1,32

4.3.2. 16S rRNA PCR ürünleri ve klon kütüphanesi oluşturma

Birinci sezon örneklerinin 3.2.4.2 numaralı başlıkta yer alan DNA izolasyon protokolüne göre çevresel DNA'lar ekstrakte edilmiştir. İlk dört örneklem alanından (K1, K2, K3, K4) ekstrakte edilen çevresel DNA'lardan konsantrasyonları yüksek PCR ürünleri oluşması için 2 µl kullanılmıştır. Son örneklem alanı (K5) için ise konsantrasyonu düşük olduğu için 3 µl kalıp DNA kullanılmıştır. Her bir çevresel DNA için 6 tüp reaksiyon kurulmuştur. Amplifiye edilen PCR ürünleri elektroforez sisteminde 100 V'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de verilmiştir.

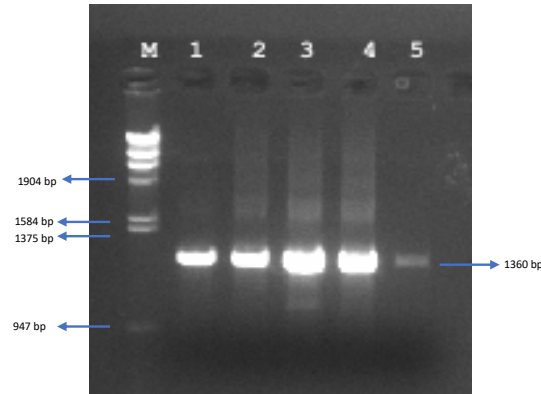


Şekil 4.20. K1 ve K2 için 6'şar tüp 16S rRNA PCR ürünleri



Şekil 4.21. K3,K4,K5 için 6'şar tüp 16S rRNA PCR ürünleri

Amplifikasyon sonucunda elde edilen tüm PCR ürünleri birleştirilmiştir ve ürünlerin saflaştırılması için 3.2.4.3 numaralı başlıkta verilen jelden saflaştırma protokolü uygulanmıştır. Elde edilen ürünler Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.22. Saflaştırılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü M: DNA ladder, 1:K1, 2: K2, 3:K3, 4:K4 ve 5:K5 16S rRNA PCR ürünleri

Lambda marker incelenerek belirlenen konsantrasyonlar da ilk dört örnek için ligasyon reaksiyonunda 1 µl PCR ürünü, son örnek içinse 3 µl PCR ürünü kullanılmıştır. Gece boyu +4 °C’de bekletilmiştir. Yöntem bölümünde verilen klon kütüphanesi oluşturulması başlığındaki transformasyon protokolü gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda petriyer kontrol edilmiştir. Beyaz koloni görülmemiştir.

Safılaştırılan ürünlerin NanoDrop (Thermo Scientific) ile ölçümü yapılmış ve konsantrasyonları Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Beş farklı istasyonun 16S rRNA PCR ürünlerinin miktarları

Örnek	Konsantrasyon ng/µl
K1	66,9
K2	57
K3	130,2
K4	98,4
K5	5

Çizelge 4.6’da verilen 16S rRNA PCR ürünlerinin konsantrasyonu dikkate alınarak 65 ng olacak şekilde ligasyon reaksiyonunda kullanılacak ürünlerin hacimleri belirlenmiştir ve Çizelge 4.8’de verilmiştir.

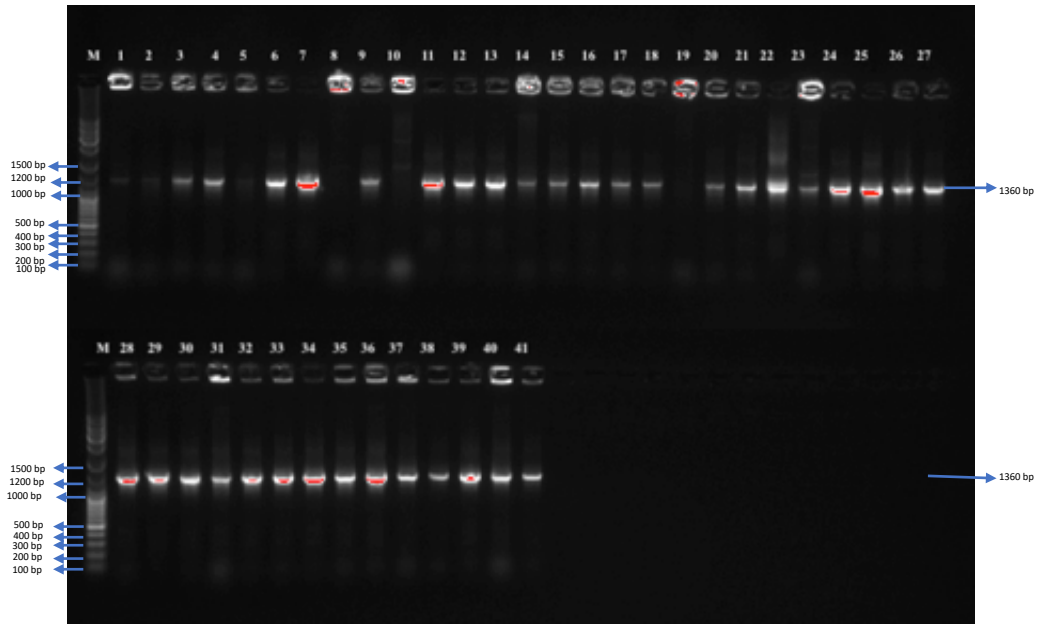
Çizelge 4.8. Ligasyonda kullanılan DNA hacimleri

Örnek	Ligasyon için kullanılan DNA hacimleri	Reaksiyon içindeki DNA konsantrasyonu ng/ µl
K1	1 µl	66,9
K2	1,5 µl	85,5
K3	0,5 µl	65
K4	0,7 µl	68,8
K5	5 µl	25

Ligasyon reaksiyon karışımı 4 °C’de gece boyu bekletilmiştir. Oluşturulan rekombinant vektör JM109 kompetant hücrelerine transforme edilmiş (ısı şok ile) ardından BSA plate’lere farklı hacimlerde ekim yapılmış 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Sonraki gün, K1 ve K2 hariç diğer çevresel örneklerin petriyerindeki (K3 (81 koloni), K5 (77 koloni), K4 (92 koloni)) beyaz mavi seçilimine göre klonlar yeni BSA platelere kürdan ile çarpı şeklinde ekilmiştir.

Elde edilen klonlar için PCR Master Mix ile koloni PCR kurulmuştur. Koloni PCR'da 27F, 1387R primer çifti kullanılarak amplifiye edilen 16S rRNA PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek profil elde edilmiştir.

K5 örneklem alanı için seçilen 77 koloniden 41 beyaz koloniden amplifiye edilen ürünler Şekil 4.23'de verilmiştir.



Şekil 4.23. K5-klon kütüphanesindeki beyaz kolonilerin amplifikasyonu

Restriksiyon enzimi olarak *MspI* (C ↓C G G)-*HaeIII* (G G ↓C C) enzim ikilisi (Çizelge 4.9), *Hinf I* enzimi (Çizelge 4.10) kullanılmıştır. Sırasıyla karışımlar 37 °C'de 2 saat ve gece boyu bekletilerek kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

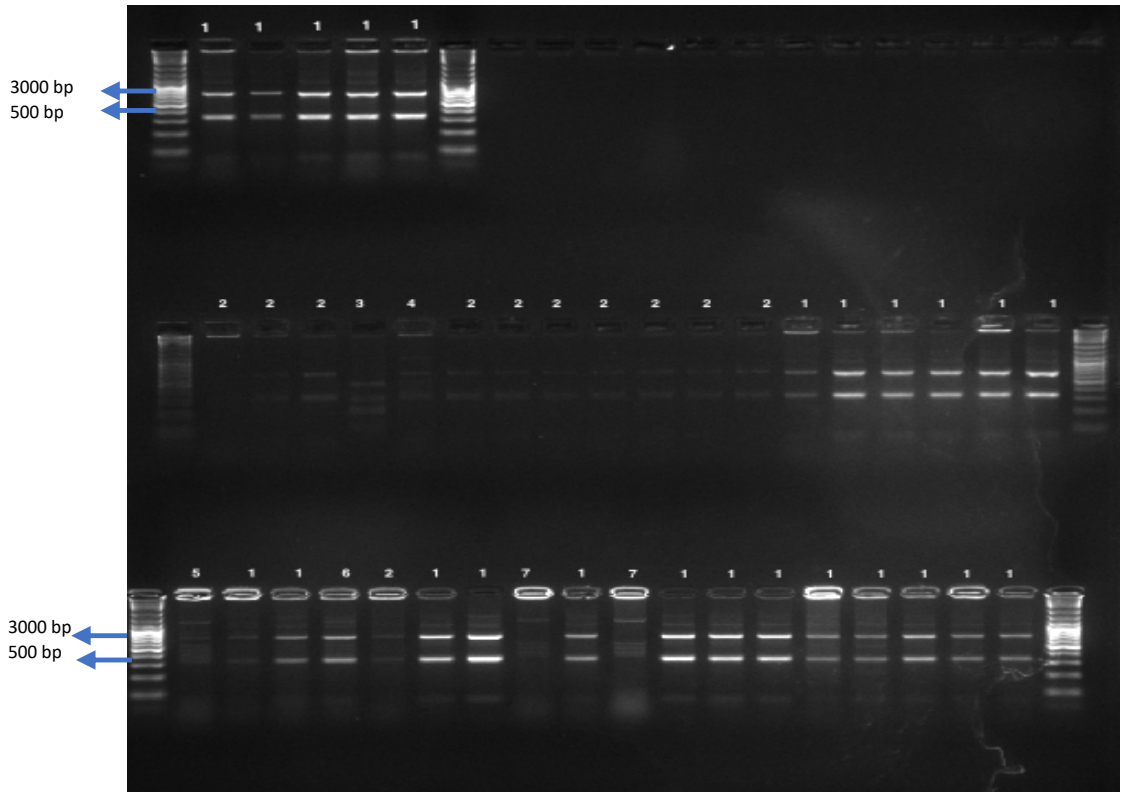
Çizelge 4.9. *Msp I*- *Hae III* İkili enzim kesim reaksiyon bileşenleri

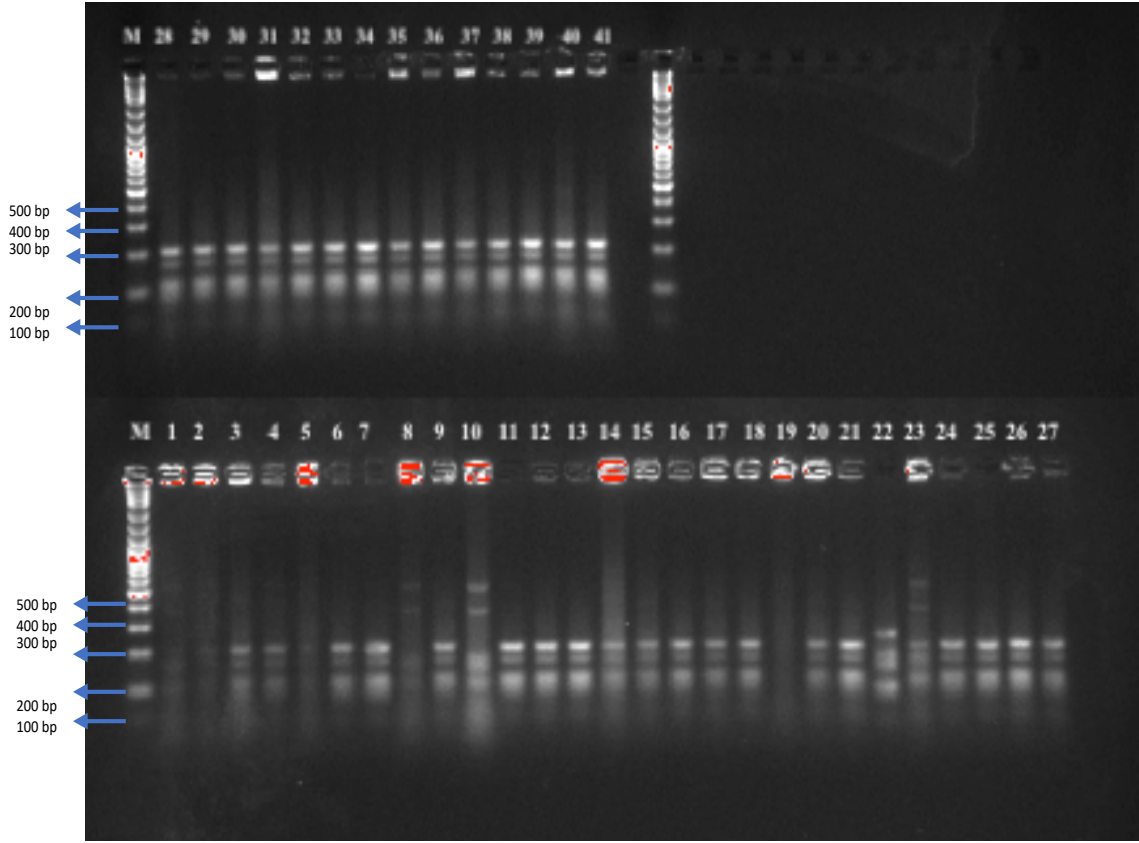
Bileşen	Hacim
dH ₂ O	2,5 µl
10x tampon	1 µl
PCR ürün	5 µl
Enzim (<i>HaeIII</i>)	1 µl
Enzim (<i>MspI</i>)	0,5 µl
	10 µl

Çizelge 4.10. *Hinf*I ile kesim reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim
dH ₂ O	3 µl
10x tampon	1 µl
PCR ürün	5 µl
Enzim (<i>Hinf</i> I)	1 µl
	10 µl

ARDRA profillerinin belirlenmesi için kesimi tamamlanan ürünlerin tamamı yükleme boyası ile karıştırılarak %2,5 agaroz jele yüklenmiş; 60V'da 150 dk süresince yürütülmüştür. Elde edilen görüntüler Şekil 4.24 (*Hinf*I) ve Şekil 4.25 (*Msp* I ve *Hae* III)'de verilmiştir.

Şekil 4.24. K5 klonlarını *Hinf*I enzimi ile reaksiyonu sonucunda elde edilen kesim profili



Şekil 4.25. K5 klonlarını *Msp* I ve *Hae* III enzim çifti ile kesim profili

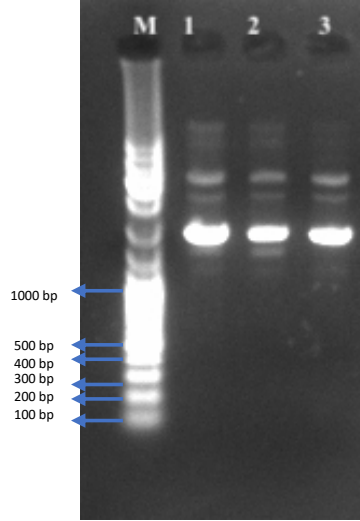
İki ayrı ARDRA profili incelendiğinde K5 örneklem alanının 7 farklı profile temsil edildiği saptanmıştır. İki farklı kesim yapılması ile farklı profiller elde edilmediği için tekli kesim ile devam edilmiştir. Profillerde yer alan klonlar Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. K5 örneklem alanının klonlarının enzimler ile kesiminden elde edilen profile ait klonlar

Profil	Klonlar
1	1,5,6,7,9,22,24,25,31,32,39,58,59,60,61,62,63,64,66,68,71,72,75,76
2	40,44,46,48,49,50,51,55,56,57
3	54
4	52
5	77
6	74
7	67,69

K5 Klon kütüphanesindeki 3 klonun plazmid izolasyonu yapılması için seçilmiştir. K5-74, K5-69 ve K5-77 klonları amfisilin içeren besiyortamına ekilmiş 37 gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 3.2.4.3. Klon kütüphanesi oluşturulması

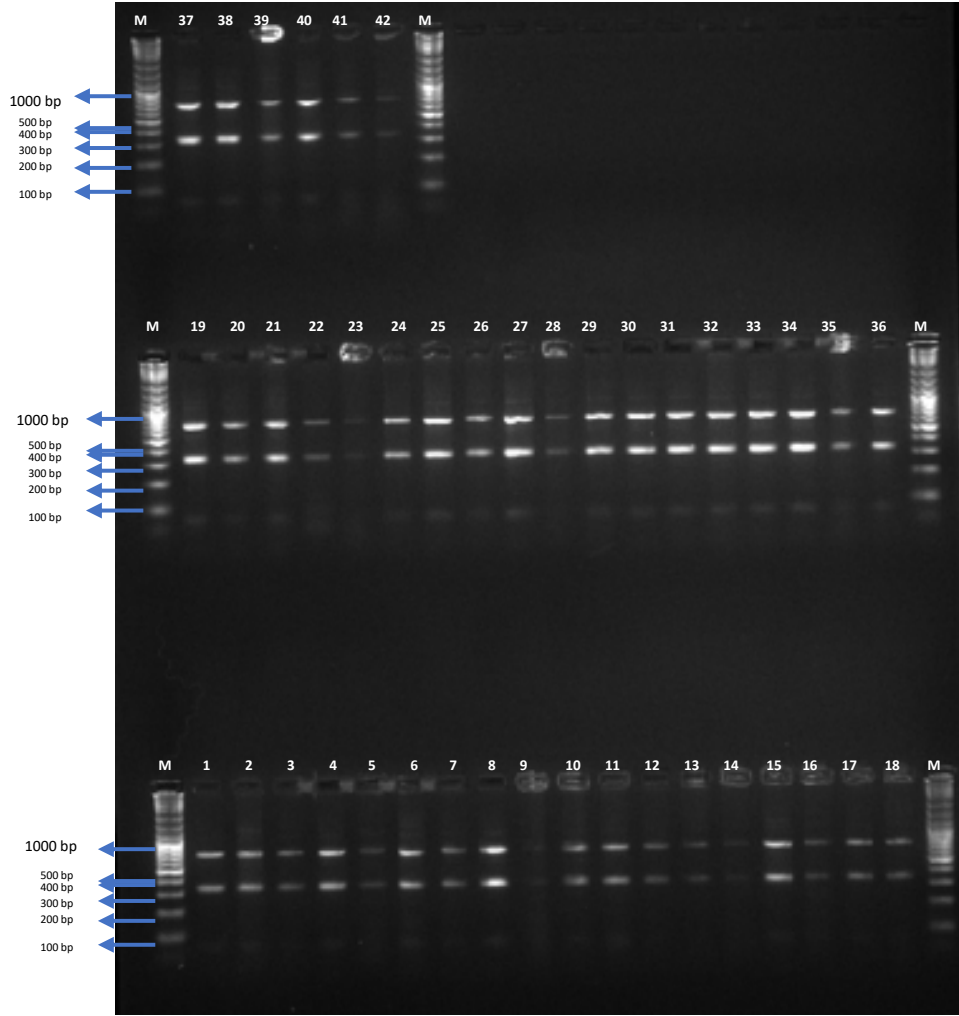
başlığında verilen plazmid izolasyon protokolüne göre üç plazmidin izolasyonu yapılmış, kontrol için %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.26). Elde edilen plazmidlerin dizi analizinin yapılması için BM Yazılım, Danışmanlık ve Lab. Sis.Ltd. Şti firmasına gönderilmiştir.



Şekil 4.26. K5 örneklem alanının klon kütüphanesi içi seçilen üç plazmidin jel görüntüsü

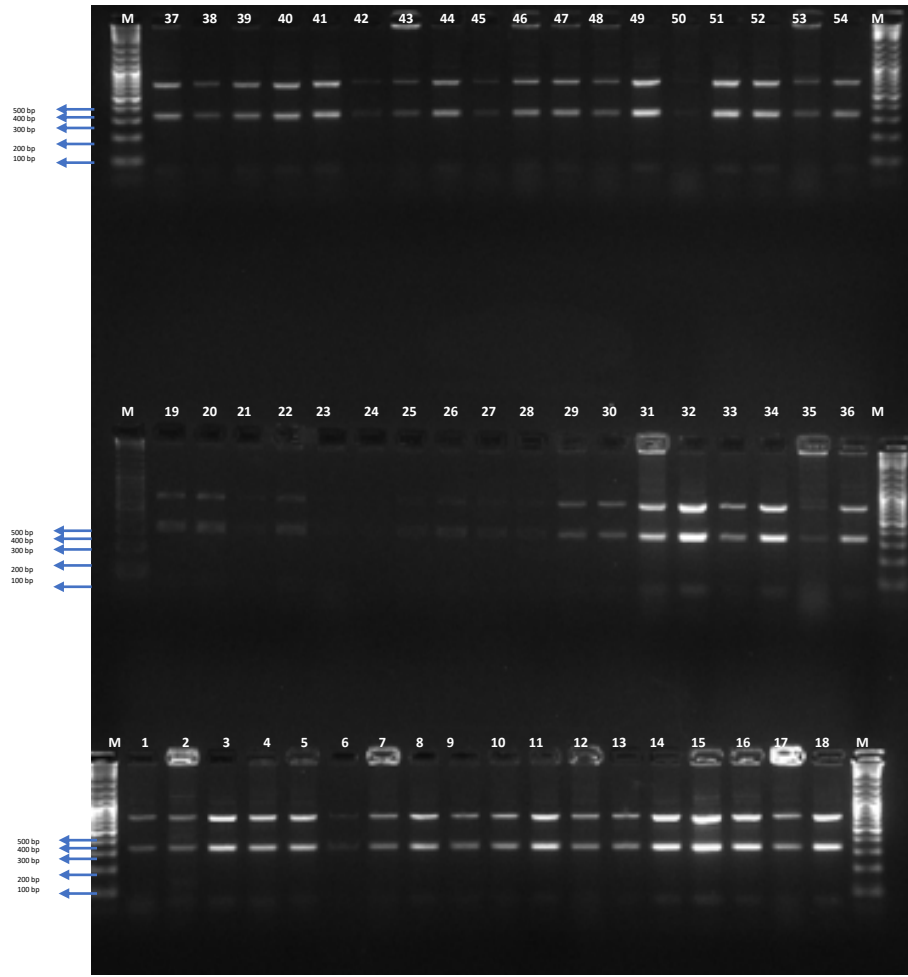
Sanger dizileme protokolüne göre gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda gelen kromatogramlar 4Peaks programı ile görüntülenmiştir. NCBI BLAST programında hizalama (alignment) gerçekleştirilmiştir. Plazmidlerin dizi analizi sonucunda yalnızca pGEMT vektör olduğu belirlenmiştir.

K3 beyaz kolonileri ile koloni PCR kurulmuştur. Elde edilen ampliconların 5 µl'si jelde yürütülmüştür. Elde edilen ürünler kalıp olarak kullanılarak HinFI restriksiyon enziminin kesim reaksiyonuna göre kesilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ürünler %2,5 lik agaroz jelde 1xTBE tamponunda 60V'da 150 dk süresince yürütülmüştür. Elde edilen kesim profili Şekil 4.27'de verilmiştir. Profil farklılığı olmadığı için vektöre insertin aktarılmadığı düşünülmektedir.

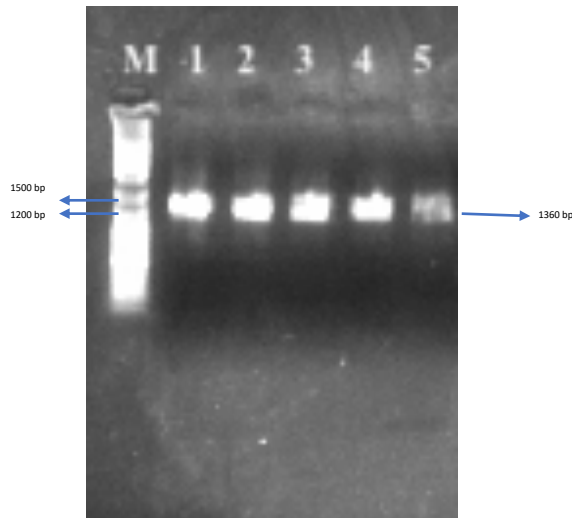


Şekil 4.27. K3 klonlarını *Hinf*I enzimi ile kesildikten sonra elde edilen kesim profil

K4 beyaz kolonileri ile koloni PCR kurulmuştur. Elde edilen ampliconların 5 µl'si jelde yürütülmüştür. Elde edilen ürünler kalıp olarak kullanılarak *Hinf*I restriksiyon enziminin kesim reaksiyonuna göre kesilmiştir. Kesim sonunda ürünler %2,5 lik agaroz jelde 1xTBE tamponunda 60V'da 150 dk süresince yürütülmüştür. Elde edilen kesim profili Şekil 4.28'de verilmiştir. Ancak tek profil görülmüştür. İçinde gen bölgesi olmayan vektör olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.28. K4 klonlarını *Hinf*I enzimi ile kesildikten sonra elde edilen kesim profili



Şekil 4.29. İkinci sezon çevresel DNA'dan amplifiye edilen K6 16S rRNA PCR ürünü

İkinci sezon çevresel DNA ile 16S rRNA PCR reaksiyonu birinci sezonda elde edilen DNA örneklerine uygulandığı gibi kurulmuştur. Amplifiye edilen ürünler %1 agaroz jele

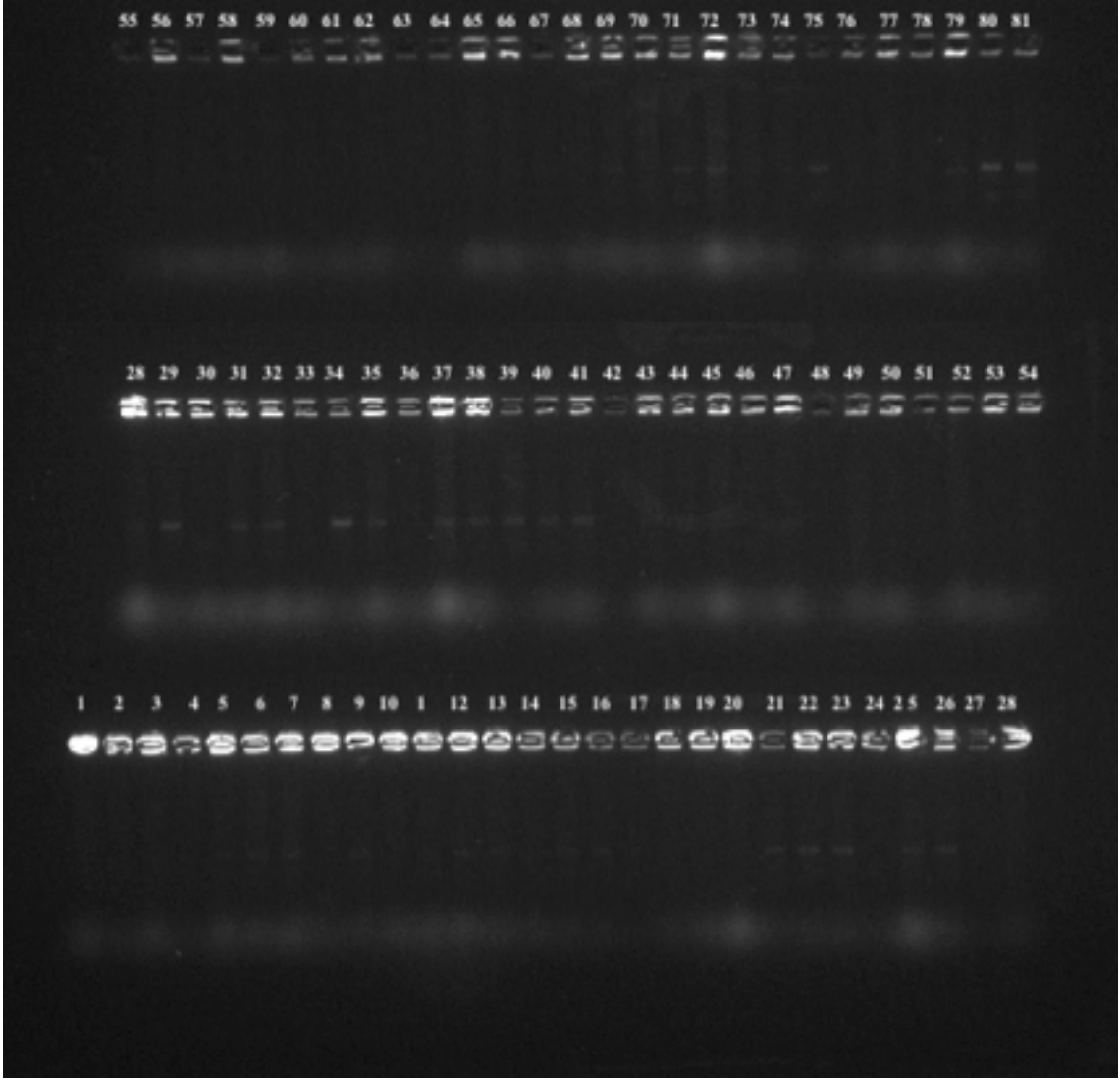
yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Çevresel DNA kullanılarak beş tüp reaksiyonda yaklaşık 1500 bp uzunluğunda elde edilen ürünlerin jel görüntüsü Şekil 4.29'da , konsantrasyonları ise Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4. 12. K6 örnek alanının 16S rRNA PCR ürününün NanoDrop ile belirlenen konsantrasyon

Örnek	Konsantrasyon ng/ μ l	Ligasyon için kullanılan
K6-16S PCR amplikon	48	1 μ l

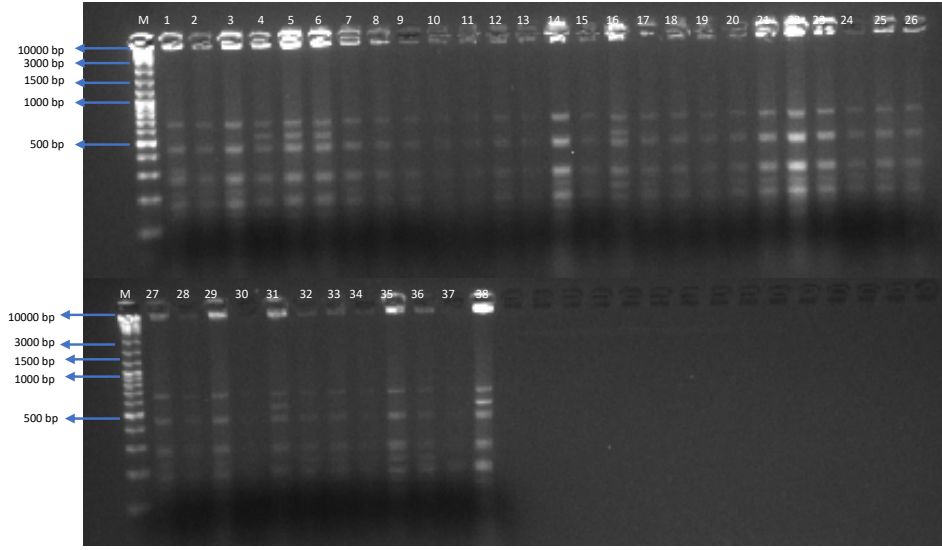
2:1 oranında DNA:plazmid içeren ligasyon reaksiyon karışımında 48 ng 16S PCR ürünü kullanılmıştır. 4°C'de gece boyu bekletilmiştir. Oluşturulan rekombinant DNA'lar *E.coli* JM109 kompetant hücrelerine transforme edilmiş (ısı şok ile) ardından BSA plate'lere farklı hacimlerde ekim yapılmış 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. 100 μ l, 200 μ l, 200 μ l ve kalan olmak üzere ekilen petrilere elde edilen klonlar ve hacimleri arasında doğrusal bir dağılım görülmektedir.

Ertesi gün beyaz mavi seçilimine göre klonlar yeni BSA platalere kürdan ile çarpı şeklinde ekilmiştir. 89 tane klon yeniden besiyerine alınmıştır. Elde edilen beyaz 81 klon kullanılarak T7 ve SP6 vektör primer çifti ile koloni PCR kurulmuştur. Amplifiye edilen ürünler %1'lik jelde yürütülmüş ve sonucu Şekil 4.30'da verilmiştir.



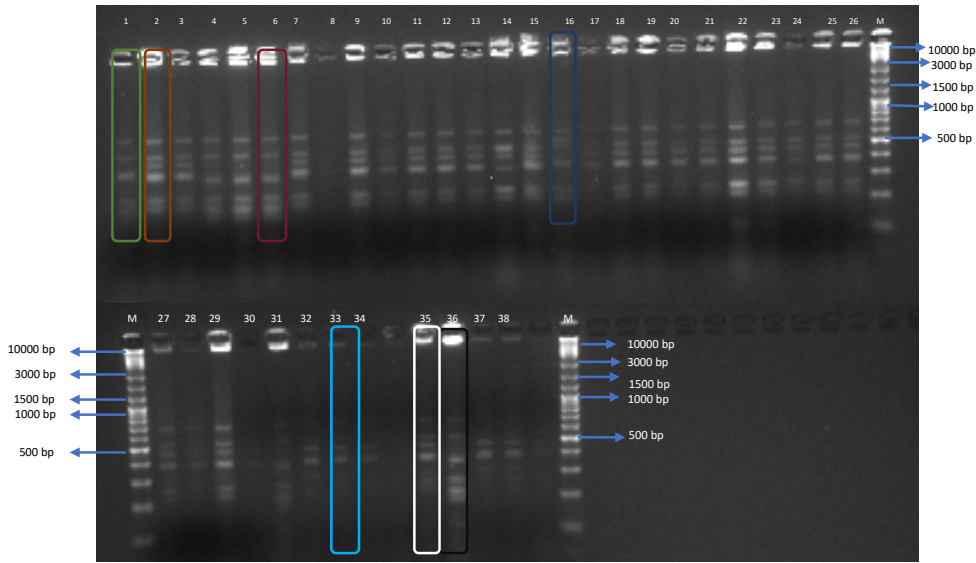
Şekil 4.30. K6-klon kütüphanesindeki beyaz kolonilerin amplifikasyonu

Vektör primerleri ile başarılı amplifiye edilen PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek klon kütüphanesindeki farklılıkların gözlenmesi hedeflenmiştir. İki farklı enzim kullanılmıştır. Enzimlerden biri *BsuRI* (*HaeIII*) (5' G G ↓C C 3')'dir. Gece boyu reaksiyon (10x tampon, DNA, dH₂O, Enzim) bileşenleri ile oluşturulan karışım 37 °C 'de gece boyu inkübe edilmiştir. Ürünler %2,5 lik agaroz jelde 1xTBE tamponunda 60V'da 150 dk süresince yürütülmüştür. Görüntülenen jel Şekil 4.31'de verilmiştir.



Şekil 4.31. K6 örneklem alanının klon kütüphanesinin *HaeIII* ile oluşturulan restriksiyon profili

Profil farklılığı az görüldüğü için, yeni bir restriksiyon enzimi ile de kesim yapılması planlanmıştır. *AluI* (5' A G ↓ C T 3') ile kesim yapılmıştır. Reaksiyon bileşenleri (10x tampon, BSA, DNA, dH₂O, Enzim) ile kurularak 37 °C 'de 2 saat süre ile inkübe edilmiş, sonrasında % 2,5 agaroz jelde 1xTBE tamponda 60V'da 150 dk süresince yürütülmüştür. Görüntülenen jel Şekil 4.32 'de verilmiştir. Profillere göre belirlenen klonların yer aldığı tablo ise Çizelge 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.32. K6 örneklem alanının klon kütüphanesinin *AluI* ile oluşturulan restriksiyon profili

Çizelge 4. 13. K6-klon kütüphanesi kesim profiline göre klonların dağılımı

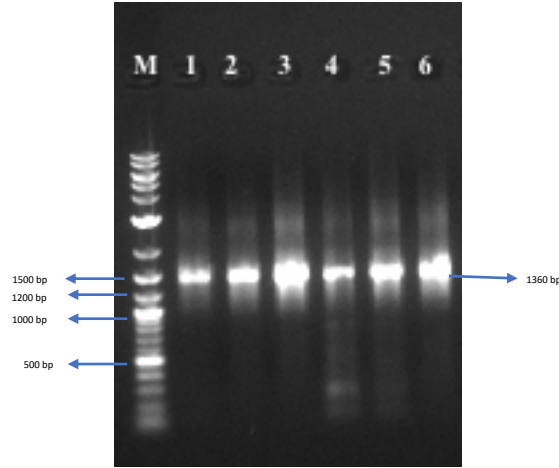
Profil	Klon numarası
1	5
2	6, 7, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 25, 26, 30, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 70, 72, 73, 85
3	9, 11, 12, 80, 87
4	81, 82, 83, 88
5	85
6	86
7	29, 84

Yedi profilden K6-5, K6-9, K6-11, K6-12, K6-15, K6-25, K6-29, K6-38, K6-40, K6-73, K6-80, K6-81, K6-84, K6-85, K6-86, K6-87 klonları için yeniden koloni PCR kuruldu. Elde edilen ürünlerin 16S rRNA gen bölgesi büyüklüğüne denk gelen bantlar kesilerek 27F, 1387R primerleri ile dizilemeye gönderilmiştir. Gelen kromatogram sonuçları 4Peaks programı ile görünülmiştir. İleri ve geri okumaların Fasta dizileri MEGA 7.0 programında hizalanarak (align edilerek) consensus diziler oluşturulmuştur. Oluşan diziler NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) BLAST programında blastn arayüzünde 16S ribozomal RNA veritabanı kullanılarak hizalanmıştır (align edilmiştir). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4. 14. K6 örnek alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları

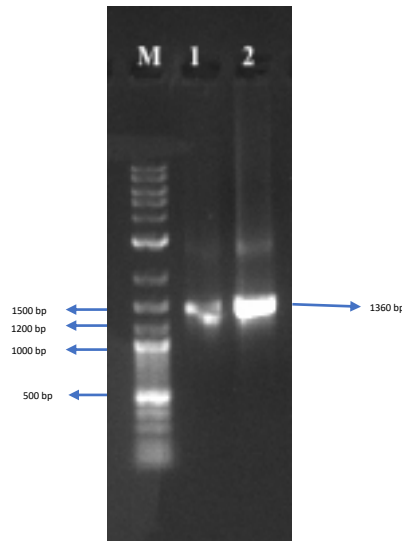
Profil	Klon numarası	Klon sayısı	Yüzde	Eşleşen tür	Baz Sayısı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen türün izole edildiği çevre
1	5	1	%2,63	<i>Uncultured Acidithiobacillus ferrivorans</i>	1309 bp	%99 LN650699.1	Asid maden suyu (Peru)
2	6 7 13 14 15 16 21 22 23 25 26 30 32 33 35 36 38 39 40 41 42 70 72 73 85	25	%65,7	<i>uncultured Leptospirillum sp</i>	1339 bp	%99 KT633229.1	Wudalianchi volkanik kümesi
3	9 11 12 80 87	5	%13	<i>Uncultured Acidiphilium rubrum</i>	1270 bp	%99 KC924950.1	Asid maden drenaj havuz suyu
4	81 82 83 88	3	%7,89	<i>Uncultured Leptospirillum sp</i>	1344 bp	%99 HM769765.1	Rio Tinto asid maden suyu
5	85	1	%2,63	<i>Uncultured bacterium</i>	1277 bp	%99 KC619579.1	Asid Gölü (Iberian Pyrite Belt)
6	86	1	%2,63	<i>Uncultured bacterium</i>	1337 bp	%99 KC620849.1	TongLing pirit madeni, (Anhui Province, China)
7	29 84	2	%5,2	<i>Uncultured Metallibacterium scheffleri</i>	1325 bp	%99 NR_118103.1	Asidik biyofilm

Üçüncü sezon örneği alındıktan sonra ekstrakte edilen çevresel DNA kullanılarak önceki örneklerde kullandığı 27F ve 1387R primer çifti ile 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu yapılmıştır. PCR ürünü %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v’da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Elde edilen ürünler Şekil 4.33’de verilmiştir.



Şekil 4.33. Üçüncü örneklem alanı 16S rRNA gen bölgesi PCR ürünleri M:marker, 1-6 K716S rRNA PCR ürünü

Üründe kirlilik tespit edildiği için jelden saflaştırma protokolü uygulanmıştır. Jelde yürütülen saf 16S rRNA gen bölgesi PCR ürünü Şekil 4.34'te verilmiştir. NanoDrop ile ölçümü yapılan saf DNA konsantrasyonu Çizelge 4.15'te verilmiştir.



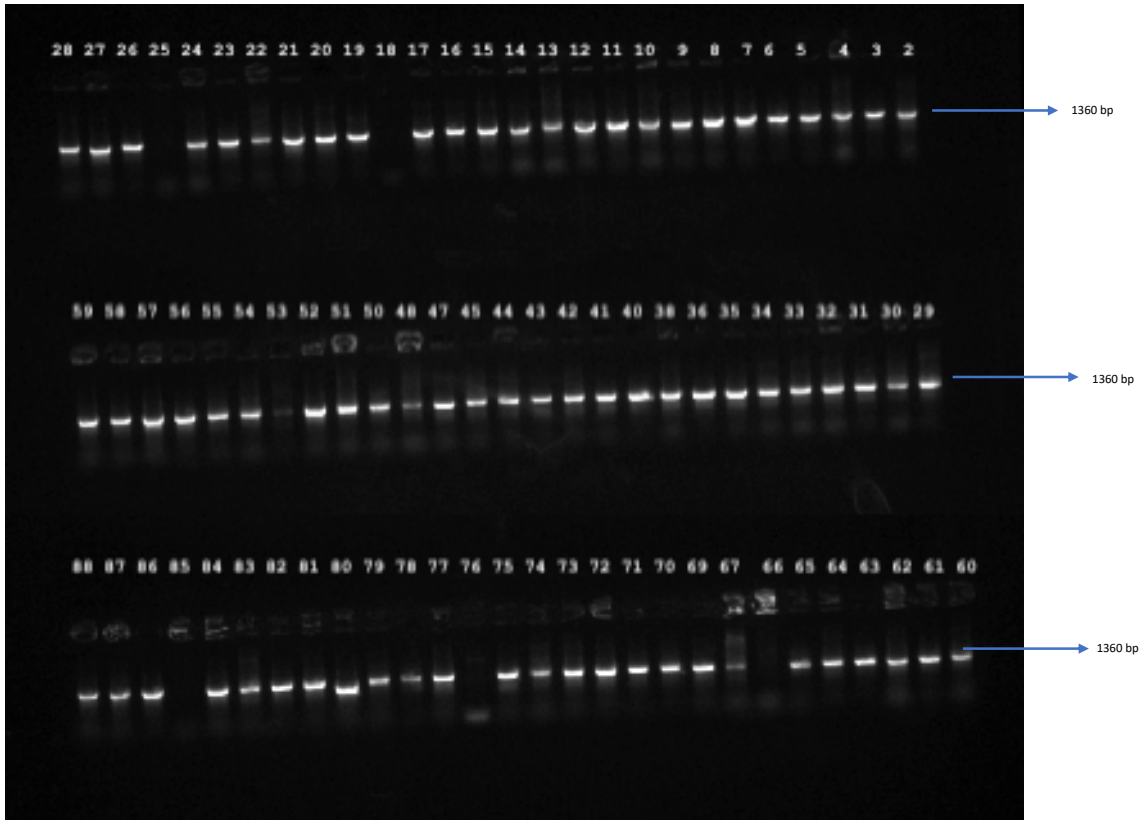
Şekil 4.34. K7 saf 16S rRNA gen bölgesi PCR ürünü M:marker, 1-2: Saf 16S rRNA PCR ürünü

Çizelge 4. 15. K7-16S rRNA gen bölgesi PCR ürünün konsantrasyonu

Örnek	Konsantrasyon ng/ μ l	Ligasyon için kullanılan hacim
K7-16S rRNA PCR amplikon	130	1 μ l

K5 çevresel DNA'sı kalıp olarak kullanılarak amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesi PCR ürününden 1 μ l (45 ng) kullanılarak 2:1 (DNA:plazmid) oranında plazmide ligasyonu yapılmıştır. *E.coli* JM109 kompetan hücrelere transforme edilmiştir. Yaklaşık 1 ml hacmindeki rekombinant DNA'lar BSA platelere 100 μ l, 200 μ l x2 ve kalan olacak yayma ekim yöntemi ile ekilmiştir. Bir gece 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda beyaz koloniler BSA platelere çarpı ekim şeklinde numaralandırılarak ekilmiştir. Yeniden pasajlanan 88 koloni 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

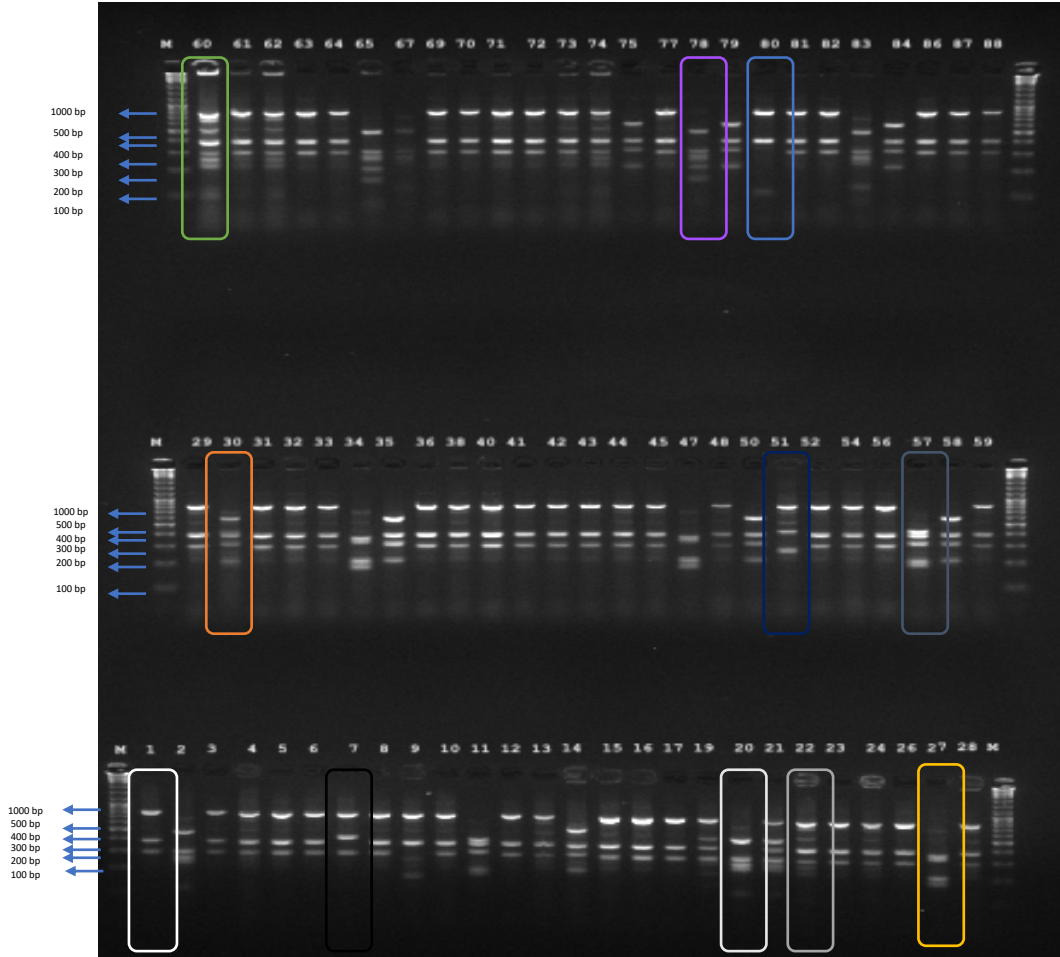
İnkübasyon sonrasında beyaz olarak geişen 84 koloni ile vektör primerleri ile PCR kurulmuştur (Şekil 4.35). Başarılı amplifiye edilen PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek klon kütüphanesindeki farklılıkların gözlenmesi hedeflenmiştir.



Şekil 4.35. K5-klon kütüphanesindeki kolonilerin amplifikasyon ürünleri (Numaralar klon numaralarını ifade etmektedir)

AluI (5'A G ↓C T 3') restriksiyon enzimi kullanılarak profil gözlenmesi hedeflenmiştir. Reaksiyon bileşenleri (10x tampon, BSA, DNA, dH₂O, Enzim) ile kurularak

37 °C'de 2 saat süre ile inkübe edilmiş, sonrasında % 2,5 agaroz jelde 1xTBE tamponunda 60V'da 150 dk süresince yürütülmüştür. Görüntülenen jel Şekil 4.36 'da verilmiştir.



Şekil 4.36. K5 klon kütüphanesi restriksiyon analizi, numaralar koloni sayılarını ifade etmektedir. M: marker

Çizelge 4.16. K5 klonlarının ait olduğu profil numaraları

Profil	Klon numarası
1	1 3 4 5 6 8 10 12 13 15 16 17 23 24 26 28 29 31 32 33 36 38 40 41 42 43 44 45 48 52 54 56 59 63 64 69 70 71 72 73 74 77 81 82 86 87 88
2	2 20
3	7
4	9 80
5	11 57
6	14 30 35 50 58 75 79 84
7	19 21 22
8	27 34 47

Çizelge 4.16 (devam) K5 klonlarının ait olduğu profil numaraları

Profil	Klon numarası
9	51
10	60 61 62
11	65 78 83

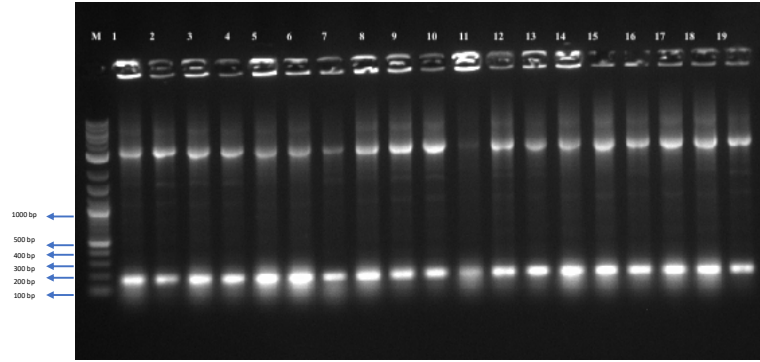
Çizelge 4.16’da verilen klonlardan K5-1, K5-12, K5-62, K5-7, K5-20, K5-60, K5-14, K5-27, K5-50, K5-2, K5-65, K5-78, K5-88, K5-22, K5-59, K5-11, K5-74, K5-47, K5-57, K5-80 seçilerek 27F ve 1387R primerleri ile dizilemeye gönderilemiştir. Gelen kromatogram sonuçları 4Peaks programı ile görünülenmiştir. İleri ve geri okumaların Fasta dizileri MEGA 7.0 programında hizalanmış (align edilmiş) consensus diziler oluşturulmuştur. Oluşan diziler NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) BLAST programında blastn arayüzünde 16S ribizomal RNA veritabanı kullanılarak hizalanmıştır (align edilmiştir). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4. 17. K5 Klon kütüphanesinde profillerin ait olduğu asidofil mikroorganizmalar

Profil	Klon numarası	Klon sayısı	Yüzde	Eşleşen tür	Baz Sayısı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen türün izole edildiği çevre
1	1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 23, 24, 26, 28, 29, 31, 32, 33, 36, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 48, 52, 54, 56, 59, 63, 64, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 77, 81, 82, 86, 87, 88	46	58,22 %	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	1343 bp	%99 DQ646517.1	Enrichment culture
2	2, 20	2	2,5 %	Uncultured bacterium	1299 bp	%98 KC620769.1	Asdi maden drenajı (pirit madeni, Çin)
3	7	1	1,26%	Uncultured <i>Leptospirillum</i>	1330 bp	%99 FJ206231.1	Bakır biyoliç yığı
4	9, 80	2	2,5 %	-	-	-	-
5	11, 57	2	2,5 %	-	-	-	-
6	14, 30, 35, 50, 58, 75, 79, 84	8	10 %	Uncultured <i>Acidithiobacillus ferriphilus</i>	842 bp	%99 KY002491.1	-
7	19, 21, 22	3	3,79 %	Uncultured prokaryote	1344 bp	%99 JX297617.1	Asid maden drenajı örneği (Dexing Bakır madeni)
8	27, 34, 47	3	3,79 %	Uncultured <i>Acidiphilum</i>	1279 bp	%99 FJ194544.1	-
9	51	1	1,26 %	-	-	-	-
10	60, 61, 62	3	3,79 %	Uncultured bacterium	1343 bp	%99 DQ660882.1	Asid maden drenajı (Dong Chuan bakır piriti)
11	65, 78, 83	3	3,79 %	Uncultured bacterium	1072 bp	%98 KC620769.1	Asid maden drenajı (TongLing pirit maden)

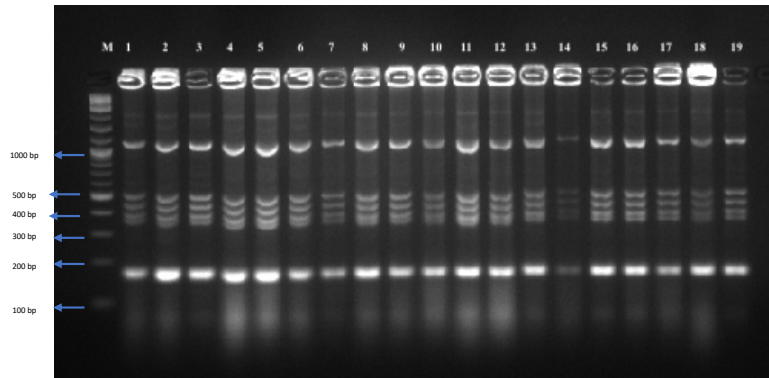
K4 ve K3 çevresel DNA’larından amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesi PCR ürünlerinin 2:1 DNA:plazmid oranı olacak şekilde yeniden ligasyon reaksiyonunda kullanılmıştır. Transformasyonda başarısız olunmuştur. Mavi koloni sayısı çok fazla çıkarken beyaz koloni sayısı az çıkmıştır.

Başarılı olarak klon kütüphanesi oluşturulan deneylerde 2:1 oranı başarılı olduğu için onunla devam edilmiştir ancak olumlu sonuç alınamadığı için K4 16S rRNA gen bölgesi PCR ürünü DNA:plazmit oranı 3:1 olacak şekilde kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonu kurulmuş, 4°C’de inkübsyon sonunda transformasyon gerçekleştirilmiştir. Yine mavi koloni sayısı beyaz koloniden fazla çıkmıştır. pGEM-T easy vector manualinde yazan trouble shooting kısmında yazılan önermelerden mavi kolonilerden de pozitif sonuç alınabilir maddesi denenmiştir. Mavi koloniler ile koloni PCR kurulmuştur. PCR ürünleri %1 agaroz jelde 1XTAE tamponda yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Kloni PCR jel görüntüsü Şekil 4.37’de verilmiştir.



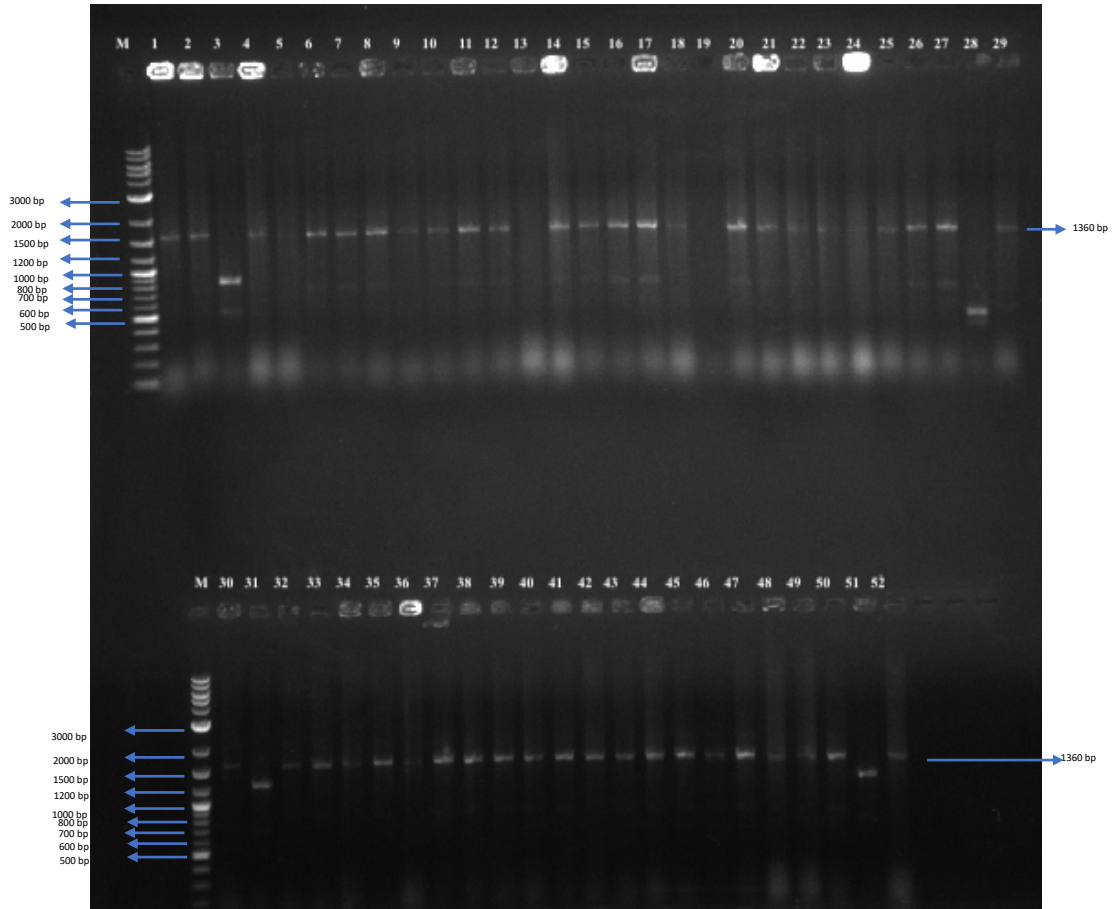
Şekil 4.37. K4 klon kütüphanesi mavi koloni PCR sonuçları

Elde edilen PCR ürünleri *AluI* enzimi ile kesimde kullanılmış, ürünler %2,5 agaroz jelde 1xTBE tamponda yürütülmüştür. Jel %1 EtBr ile boyandıktan sonra BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Kesim profili Şekil 4.38’de verilmiştir.



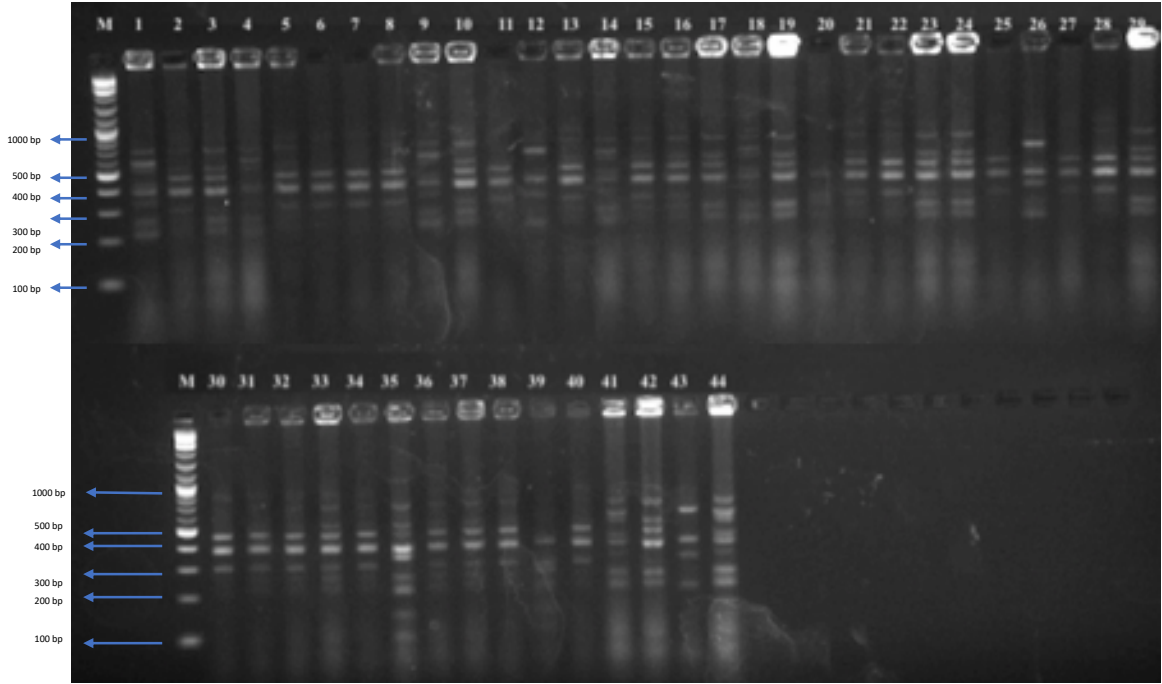
Şekil 4.38. K4 klon kütüphanesi mavi koloni PCR ürünlerinin *HinfI* ile kesim profili

K7-16S rRNA PCR ürünü ile ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. 2:1oranı kullanılmıştır. Transformasyonda *E.coli* JM109 hücrelerine aktarma yapılmıştır. Hücreler 100 µl, 200 µl, 200 µl ve kalan olacak şekilde ekilmiştir. 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen beyaz kolonilerden seçilenler çarpı şeklinde ekilmiştir. Yeniden inkübasyona bırakılmıştır. Beyaz koloni olarak gelişenler ile koloni PCR kurulmuştur. Ürünler %1 agaroz jele yüklenmiştir. BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenen jel görüntüsü Şekil 4.39’da verilmiştir.



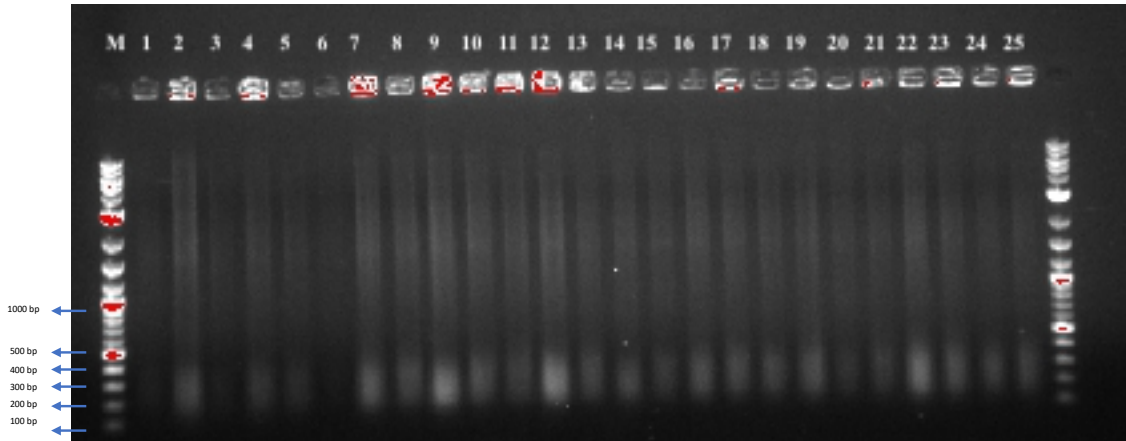
Şekil 4.39. K7 klon kütüphanesinin kolon PCR jel görüntüsü

Amplifiye olan PCR ürünleri *AluI* enzimi ile kesim reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. Kesim ürünleri %2,5 agaroz jelde 1xTBE tamponda yürütülmüştür. 60 V’da 150 dakika yürütülmüştür. BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenen jel görüntüsünde kesim profilleri Şekil 4.40’da verilmiştir.



Şekil 4.40. K7 klonlarının *AluI* restriksiyon enzimleri ile kesim profili

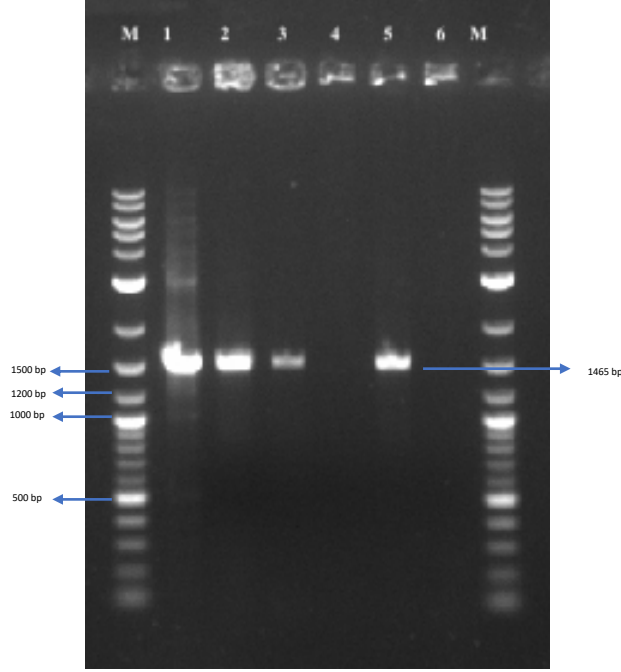
Profilden seçilen koloniler ile yeniden koloni PCR kurularak dizi analizine gönderilmesine karar verilmiş ancak koloni PCR bu kez çalışmamıştır. Jel görüntüsü Şekil 4.41’de verilmiştir. Koloni PCR yerine plazmid geliştirilip plazmid izolasyonu yapılması tercih edilmeliydi bu nedenle bu klon kütüphanesi tekrarlanacaktır.



Şekil 4.41. K7 seçilen klonlar ile amplifiye edilen koloni PCR ürünleri

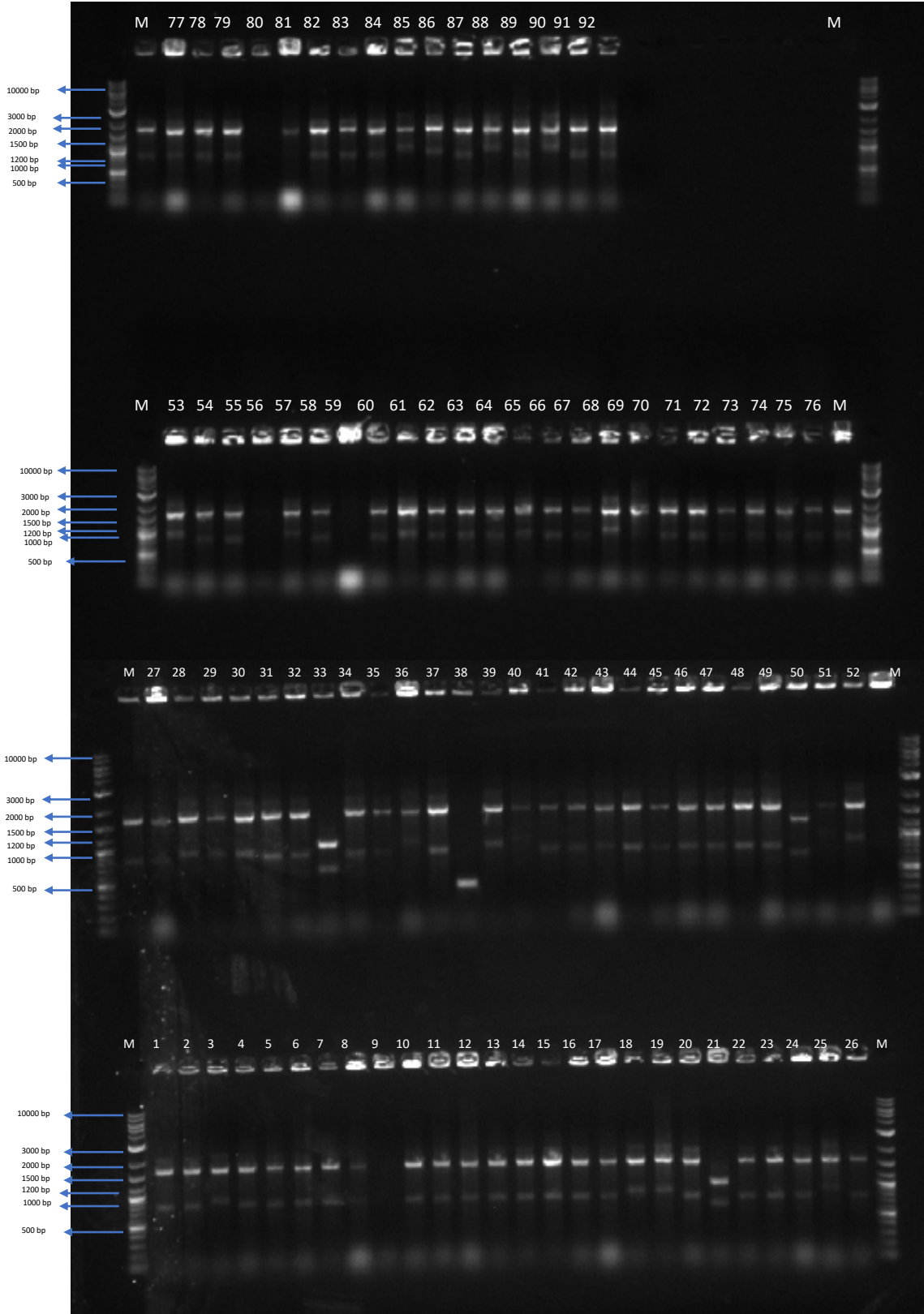
Kesimde de aynı profil elde edilince trouble shooting kısmındaki önermenin de faydalı olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle çevresel DNA’lardan bir kez daha PCR kurulmasına karar verilmiştir. Bu kez 27F ve 1492 R primer çifti kullanılarak amplifikasyon

yapılmıştır. PCR ürünleri %1 agaroz jelde yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir (Şekil 4.42).

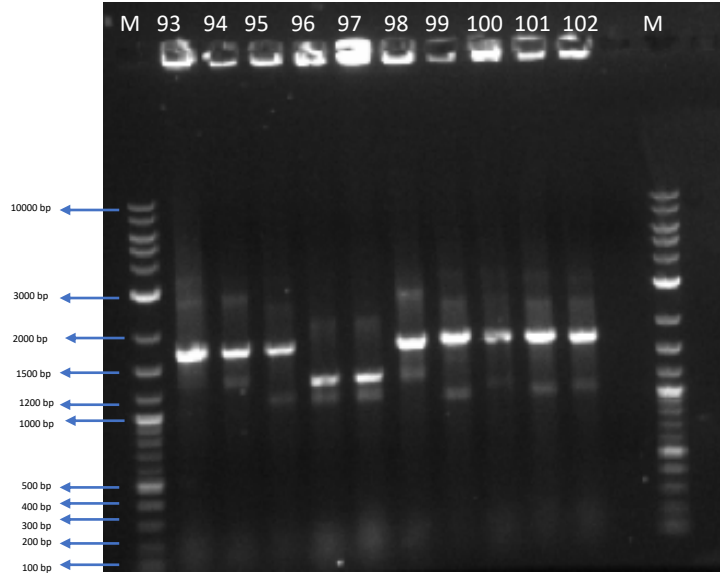


Şekil 4.42. 27F-1492R primer çifti ile amplifiye edilen PCR ürünleri. 1:K7, 2:K1, 3:K2, 4:K3, 5:K4, 6:Negatif kontrol.

K1 klon kütüphanesi oluşturması için 1492R geri primerin yer aldığı primer çifti ile amplifiye edilen PCR ürünü kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonunda 1 µl PCR ürünü kullanılmıştır. Transformasyon *E.coli* JM109 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 4 BSA plâtelere 100 µl, 200 µl, 200 µl ve kalan hacimde olmak üzere ekimi yapılmıştır. Gece boyu inkübasyon sonunda beyaz kolonilerden çarpı şeklinde ekim yapılarak kütüphanenin oluşturulması için inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen beyaz kolonilerden T7 ve SP6 primer çifti ile koloni PCR kurulmuştur. %1 agaroz jele yüklenerek 100V 70 dk süresince yürütülen jel %1 EtBr ile boyanmıştır. Biorad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemi ile görüntülenen jel Şekil 4.43 ve 4.44'te verilmiştir.



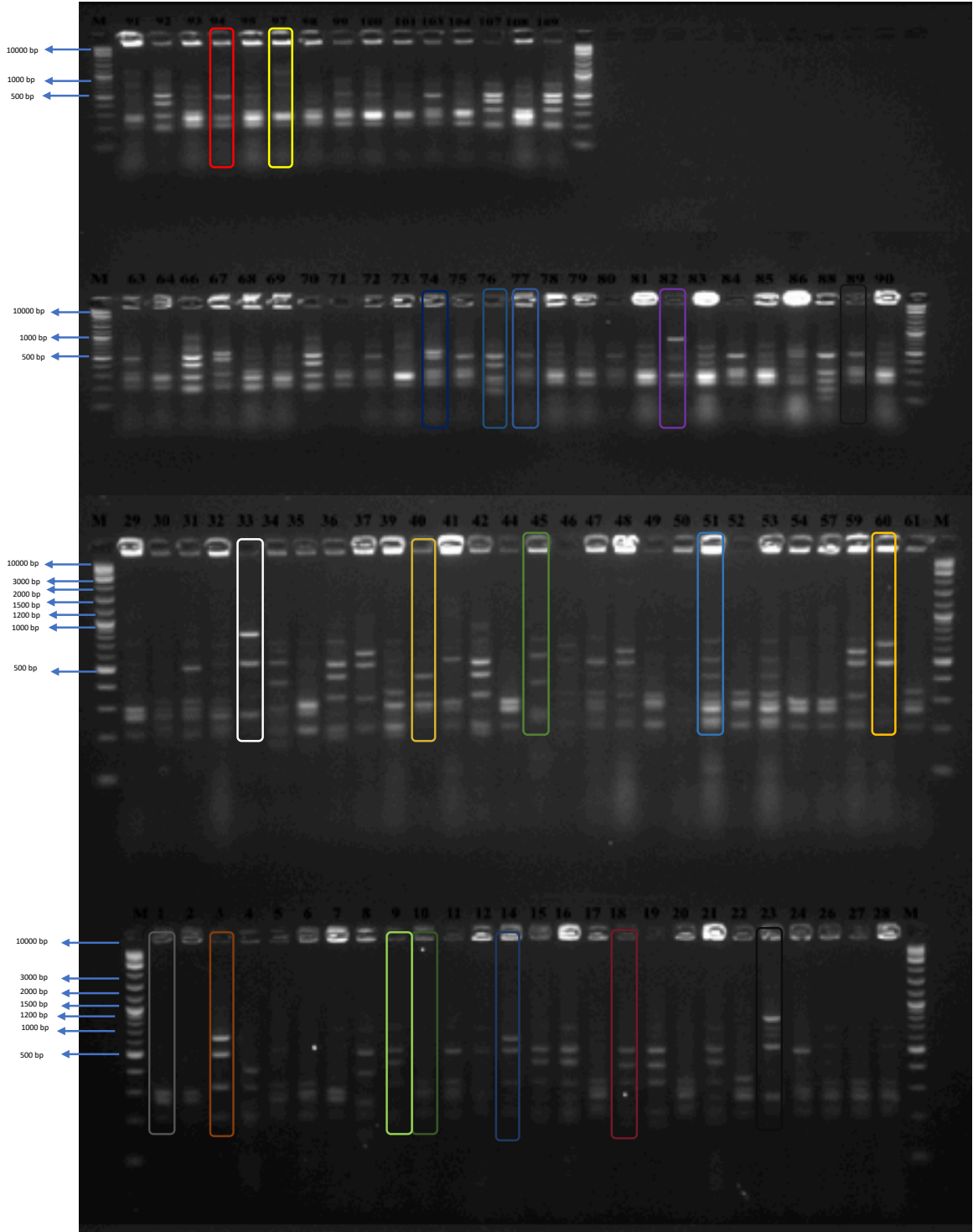
Şekil 4.43. K1 Klon Kütüphanesi koloni PCR ürünleri -1 M:Marker 1-92: K1 klon kütüphanesi K1-5 ve K1-100 arasındaki klonlar



Şekil 4.44. K1 Klon kütüphanesi koloni PCR ürünleri-2. M:Marker, 93-102:K11*1-K1-110 numaralı klonlar

Pozitif sonuç veren klonların PCR ürünleri kullanılarak *AluI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu kurulmuştur. 2 saat 37°C’de inkübasyon sonrasında ürünün tamamı %2,5 agaroz jele yüklenmiş ve 60V’da 150 dk süresince yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BoRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemil ile görüntülenmiştir. Kesim profillerinin yer aldığı jel görüntüsü Şekil 4.45’de verilmiştir.

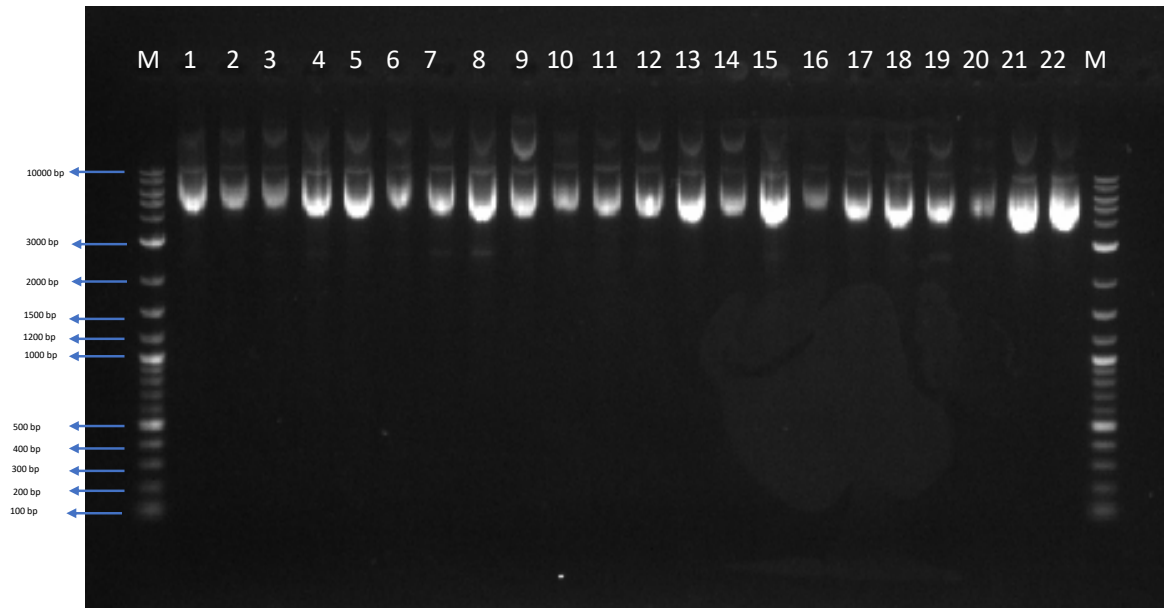
ARDRA sonucuna göre elde edilen kesim profiline ait dağılımı yapılan koloniler Çizelge 4.18’de verilmiştir. 19 profil için sırasıyla 27, 5, 6, 3, 2, 10, 5, 6, 2, 1, 13, 1, 3, 3, 2, 3, 1, 1, 1 koloni içermektedir. Elde edilen kolonilerden dizi analizine örnek göndermek için en iyi çalışma koloni PCR’lara göre karar verilmiştir. K1-1, K1-3, K1-4, K1-5, K1-8, K1-9, K1-12, K1-14, K1-18, K1-23, K1-31, K1-34, K1-40, K1-44, K1-45, K1-54, K1-62, K1-64, K1-76, K1-77, K1-87, K1-89, K1-101, K1-110 numaralı koloniler amfisilin içeren LB Brothlara ekilmiştir. 37°C’de 150 rpm çalkalamada gece boyu beklemiştir. İnkübasyon sonrası plazmidlerin kit ile izolasyonu 3.2.4.3 başlıkta verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. %1 agaroz jele yüklenmiş ve 100V’da 70 dk süresince yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BoRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. Plazmidlerin jel görüntüsü Şekil 4.46’da verilmiştir.



Şekil 4.45. K1 Klon kütüphanesinin restriksiyon analizi (*A_hI* kesim)

Çizelge 4. 18. K1 klon kütüphanesi kesim profiline göre klonların dağılımı

Profil	Klon numarası
1	1, 2, 5, 6, 7, 29, 49, 52, 54, 57, 73, 91, 101, 20, 22, 30, 31, 35, 41, 44, 61, 71, 81, 83, 85, 90,
2	3, 34, 66, 70, 92
3	14, 37, 46, 48, 59, 67
4	10, 11, 12
5	8, 76
6	9, 15, 16, 17, 21, 36, 39, 42, 107, 109
7	4, 18, 19, 68, 69, 86
8	24, 26, 27, 28, 32, 97
9	23, 33
10	45
11	47, 50, 51, 53, 6,3 64, 78, 79, 93, 95, 98, 104, 108
12	88
13	77, 80, 84
14	72, 75, 89
15	94, 103
16	60, 99, 100
17	82
18	74
19	40



Şekil 4.46. K1 klon kütüphanesinden dizi analizine gönderilmek üzere izole edilen plazmidler. M: marker, 1-22:K1-3, K1-4, K1-5, K1-8, K1-9, K1-14, K1-18, K1-23, K1-31, K1-34, K1-40, K1-44, K1-45, K1-54, K1-62, K1-64, K1-76, K1-77, K1-87, K1-89, K1-101, K1-110

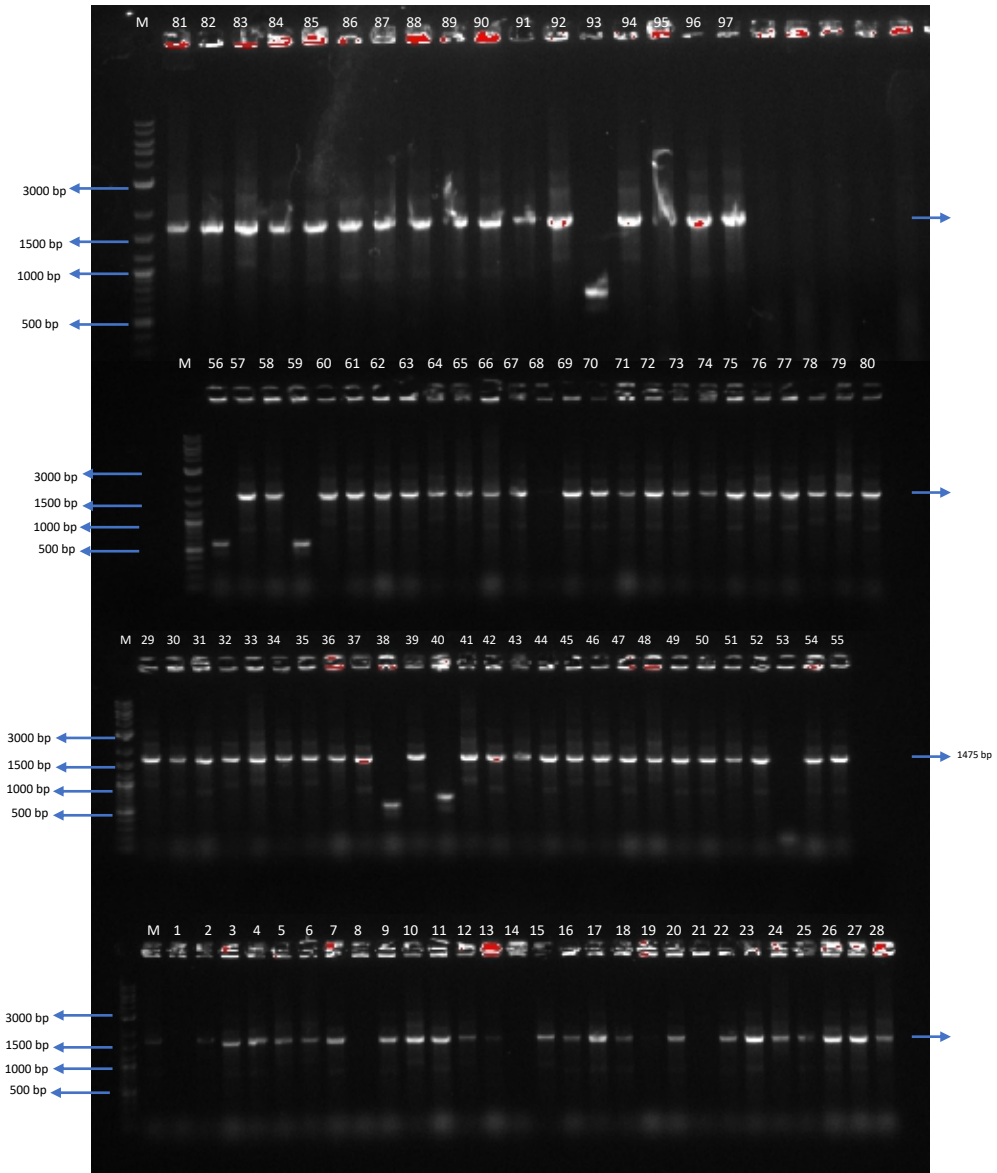
Çizelge 4.18'de verilen klonlardan K1-1, K1-3, K1-4, K1-5, K1-7, K1-8, K1-9, K1-12, K1-14, K1-18, K1-23, K1-31, K1-34, K1-40, K1-45, K1-52, K1-54, K1-62, K1-64, K1-

76, K1-77, K1-87, K1-89, K1-101 seçilerek ile dizi analizine gönderilmiştir. Gelen kromatogram sonuçları 4Peaks programı ile görünülenmiştir. İleri ve geri okumaların Fasta dizileri MEGA 7.0 programında hizalanarak (align edilerek) consensus diziler oluşturulmuştur. Oluşan diziler NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) BLAST programında blastn arayüzünde 16S ribozomal RNA veritabanı kullanılarak hizalanmıştır (align edilmiştir). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.19’da verilmiştir.

Çizelge 4. 19. K1 örneklem alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları

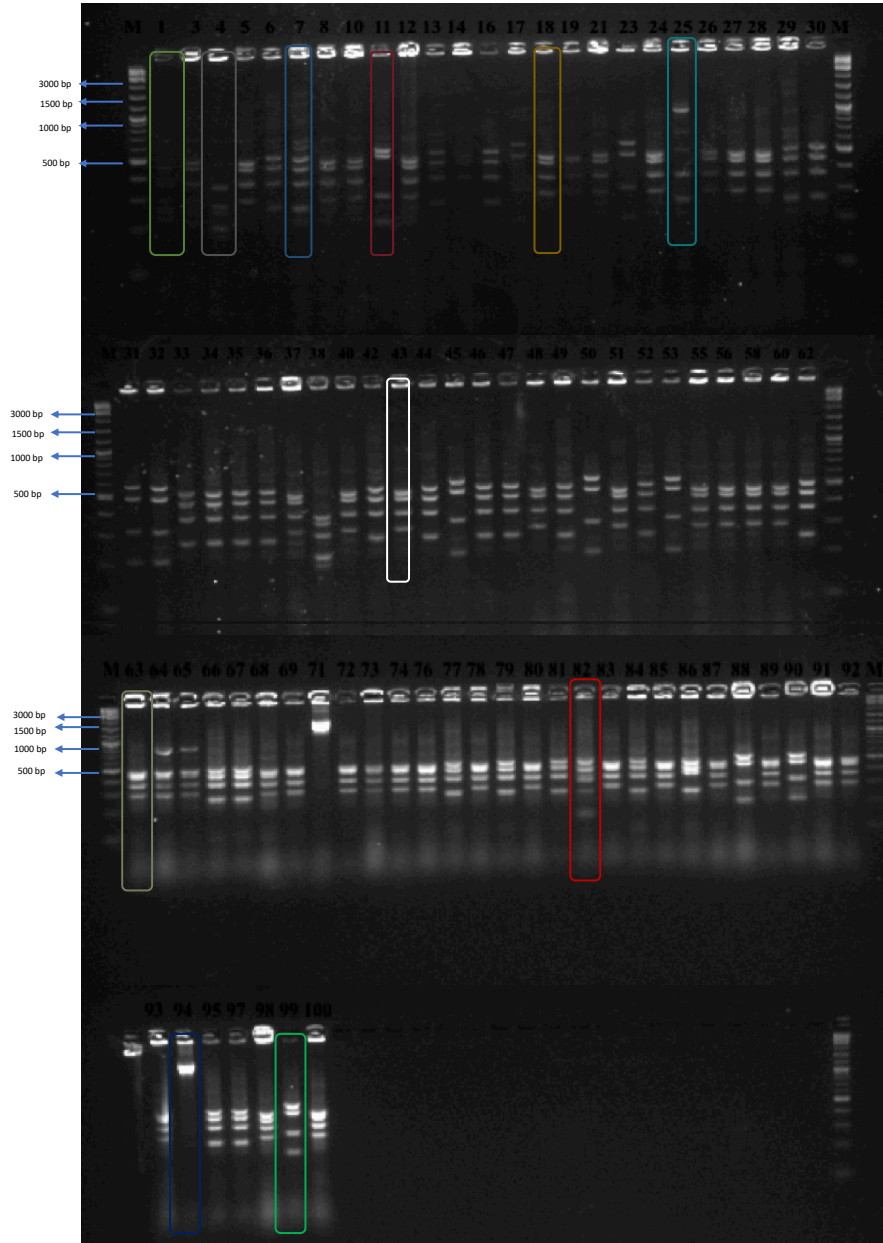
Profil	Klon numarası	Klon sayısı	Yüzde	Eşleşen tür	Baz Sayısı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen türün izole edildiği çevre
1	1, 2, 4, 5, 6, 7, 29, 49, 52, 54, 57, 73, 91, 101, 20, 22, 30, 31, 35, 41, 44, 61, 71, 81, 83, 85, 90	26	% 27	<i>Actinobacterium</i> BGR 77	1536 bp	%99 GU168000.1	Sülfid Maden Atık Yığılı
2	3, 34, 66, 70, 92	5	% 5,2	Uncultured <i>Sinobacteraceae</i> bacterium	1557 bp	%98,76 JF737888.1	Rio Tinto
3	14, 37, 46, 48, 59, 67	6	% 6,31	<i>Metallibacterium scheffleri</i>	1576 bp	%98,51 NR_118103.1	Asidik biyofilm
4	10, 11, 12	3	% 3,15	Uncultured bacterium	1586 bp	%96 AB254776.1	İndirgen sediment
5	8, 76	2	% 2,1	Uncultured <i>Alicycobacillus</i> sp	1561 bp	%92	
6	9, 15, 16, 17, 21, 36, 39, 42, 107, 109	10	% 10,5	Uncultured <i>Sulfobacillus</i>	1609 bp	%96 EF612376.1	Kürşün çinko maden su alanı
7	4, 18, 19, 68, 69, 86	6	% 6,31	<i>Metallibacterium scheffleri</i>	1551 bp	%98,76 NR_118103.1	
8	24, 26, 27, 28, 32, 97	6	% 6,31	<i>Acidimicrobium</i> sp.	1133 bp	%98,76 EF612360.1	
9	23, 33	2	% 2,1	<i>Leptospirillum</i> sp	1594 bp	%99 AJ237902.1	
10	45	1	% 1,05	<i>Legionella adelaidensis</i>	1661 bp	%93 LR134417.1	
11	47, 50, 51, 53, 63, 64, 78, 79, 93, 95, 98, 104, 108	13	% 13,68	Uncultured <i>Acidimicrobiaceae</i> bacterium	1557 bp	%98 AM749759.1	Buhar etkili jeotermal toprak
12	88	1	% 1,05	<i>Metallibacterium scheffleri</i>		%98,76 NR_118103.1	
13	77, 80, 84	3	% 3,15	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i>	1558 bp	%96 NR_112972.1	Solfatrik alan
14	72, 75, 89	3	% 3,15	<i>Ferrimicrobium</i> sp	1595 bp	%99 GU183398.1	Sülfid Maden Atık Yığılı
15	94, 103	2	% 2,1	<i>Ferrithrix thermotolerans</i> strain Y005	1188 bp	%91 NR_042751.1	
16	60, 99, 100	3	% 3,15	<i>Metallibacterium scheffleri</i>	1366 bp	%97,85 NR_118103.1	
17	82	1	% 1,05	Uncultured <i>Acidimicrobiaceae</i> bacterium	1258 bp	%93 KX035268.1	
18	74	1	% 1,05	Uncultured <i>Ferrimicrobium</i> sp.	1280 bp	%96 KF287770.1	
19	40	1	% 1,05	Uncultured bacterium	1560 bp	%97 LN880503.1	Asid maden drenaj, Svalbard

K7 klon kütüphanesi oluşturulması için 1492R geri primerin yer aldığı primer çifti ile amplifiye edilen PCR ürünü kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonunda 1 µl PCR ürünü kullanılmıştır. Transformasyon *E.coli* JM109 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 4 BSA plakelere 100 µl, 200 µl, 200 µl ve kalan hacimde olmak üzere ekimi yapılmıştır. Gece boyu inkübasyon sonunda beyaz kolonilerden çarpı şeklinde ekim yapılarak tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen beyaz kolonilerden T7 ve SP6 primer çifti ile koloni PCR kurulmuştur. %1 agaroz jele yüklenerek 100V 70 dk süresince yürütülen jel %1 EtBr ile boyanmıştır. Biorad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemi görüntülenen jel Şekil 4.47'de verilmiştir.



Şekil 4.47. K7 Klon Kütüphanesi koloni PCR ürünleri. M:Marker 1-97: K7 klon kütüphanesi K7-1-K7-109 numaralı klonlar

Pozitif sonuç veren klonların PCR ürünleri kullanılarak *AluI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu kurulmuştur. 2 saat 37°C’de inkübasyon sonrasında ürünün tamamı %2,5 agaroz jele yüklenmiş ve 60V’da 150 dk süresince yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BoRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemil ile görüntülenmiştir. Kesim profilinin yer aldığı jel görüntüsü Şekil 4.48’de verilmiştir



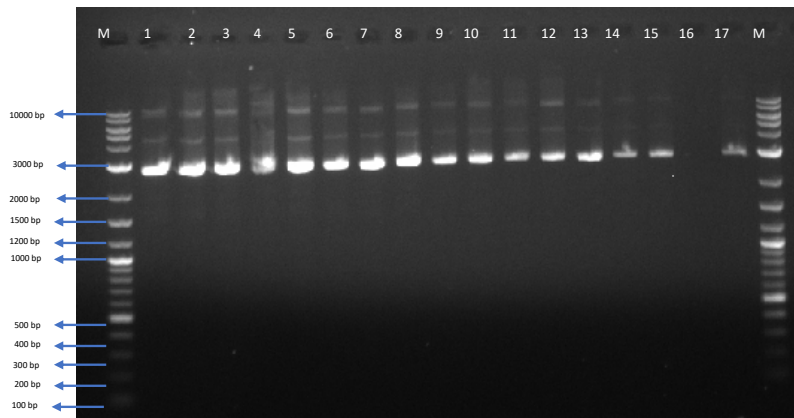
Şekil 4.48. K7 klon kütüphanesinin restriksiyon analizi

ARDRA sonucuna göre elde edilen keşim profiline ait koloniler Çizelge 4.20’de verilmiştir. 11 profil için sırasıyla 34, 5, 2, 26, 1, 1, 10, 1, 3, 1, 2 koloni içermektedir. Elde edilen kolonilerden dizi analizine örnek göndermek için en iyi çalışna koloni PCR’lara göre karar verilmiştir.

Çizelge 4.20. K7 klon kütüphanesinin kesim profiline göre klonların dağılımı

Profil Numarası	Klon numarası
1	1, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 24, 26, 27, 28, 37, 40, 55, 56, 58, 60, 68, 69, 72, 73, 74, 76, 78, 80, 83, 85, 87, 89, 91, 92, 93, 98, 100
2	18, 19, 21, 48, 51
3	4, 38
4	6,7, 13, 16, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 42, 44, 46, 47, 49, 52, 62, 66, 67, 77, 79, 81, 84, 86, 95, 97
5	11
6	43
7	17, 23, 31, 32, 45, 50, 53, 88, 90, 99
8	25
9	63, 64, 65
10	82
11	71, 94

K7-1, K7-4, K7-7, K7-11, K7-16, K7-25, K7-38, K7-43, K7-45, K7-49, K7-65, K7-76, K7-82, K7-84, K7-94, K7-100 koloniler amfisilin içeren LB Brothlara ekilmiştir. 37°C’de 150 rpm çalkalamada gece boyu beklemiştir. İnkübasyon sonrası plazmidlerin kit ile izolasyonu 3.2.4.3 başlıkta verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. % 1 agaroz jele yüklenmiş ve 100V’da 70 dk süresince yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BoRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemil ile görüntülenmiştir. Plazmidlerin jel görüntüsü Şekil 4.49’da verilmiştir.



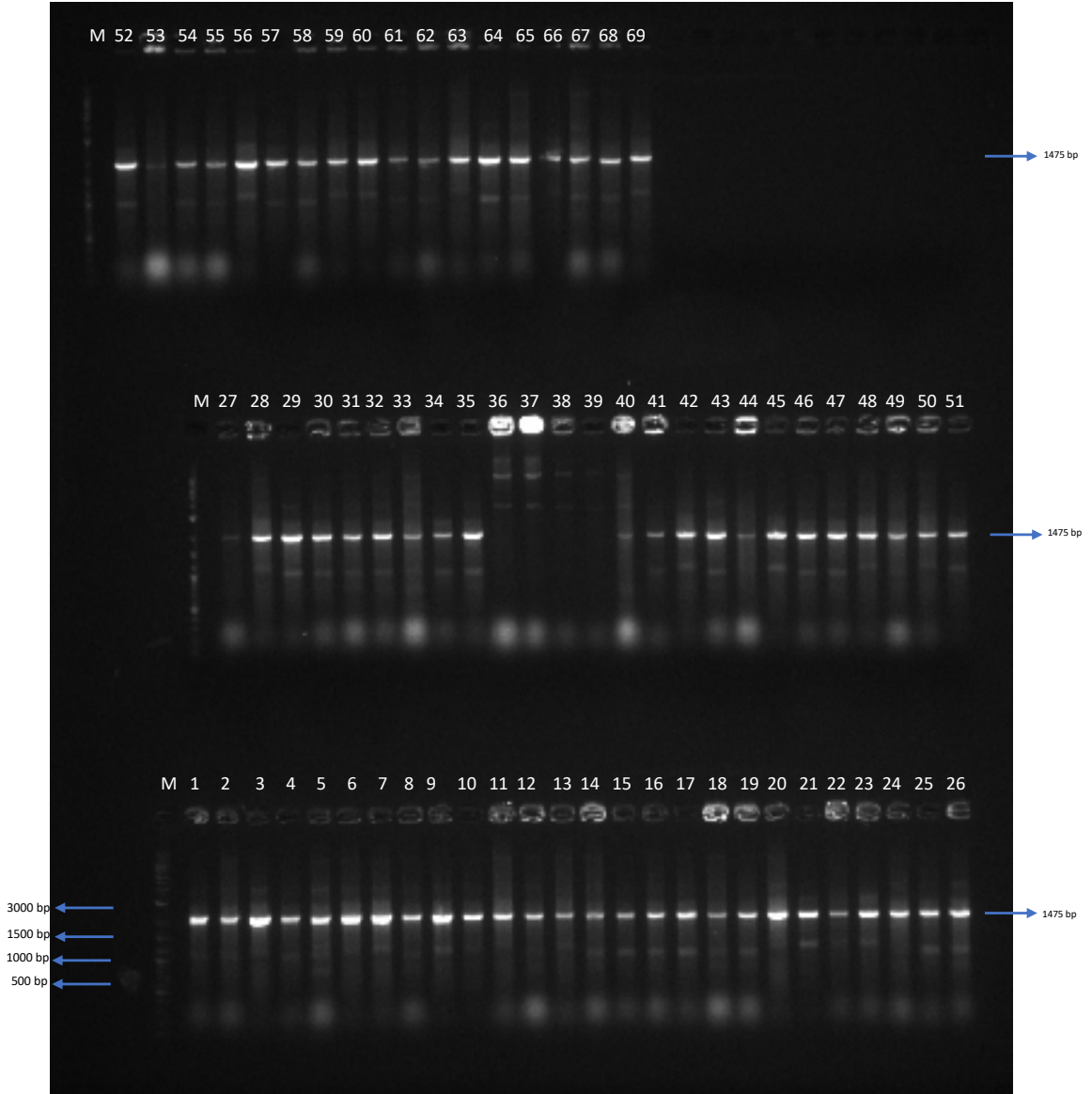
Şekil 4.49. K7 klon kütüphanesinden dizi analizine gönderilmek üzere izole edilen plazmidler. M:Marker, 1-17 (16 boş): K7-1, K7-4, K7-7, K7-11, K7-16, K7-25, K7-38, K7-43, K7-45, K7-49, K7-65, K7-76, K7-82, K7-84, K7-94, K7-100

Çizelge 4.20’de verilen klonlardan izole edilen K7-1, K7-4, K7-7, K7-11, K7-16, K7-25, K7-38, K7-43, K7-45, K7-49, K7-65, K7-76, K7-82, K7-84, K7-94, K7-100 plazmidleri dizi analizine göndermek için seçilmiştir. Gelen kromatogram sonuçları 4Peaks programı ile görünülmiştir. İleri ve geri okumaların Fasta dizileri MEGA 7.0 programında align edilmiş consensus diziler oluşturulmuştur. Oluşan diziler NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) BLAST programında blastn arayüzünde 16S ribozomal RNA veritabanı kullanılarak hizalanmıştır (align edilmiştir). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.21’de verilmiştir.

Çizelge 4. 21. K7 örneklem alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları

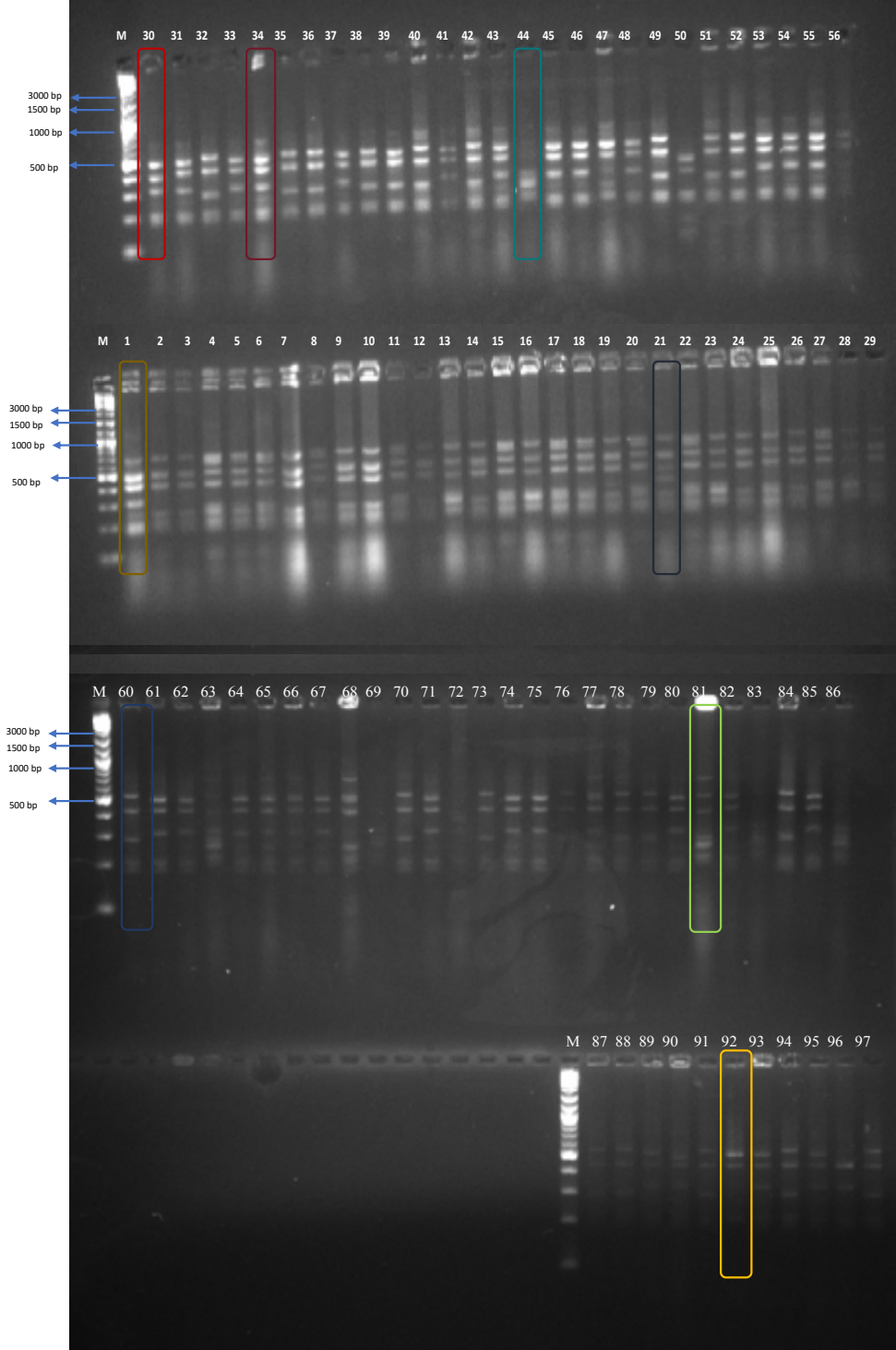
Profil	Klon numarası	Klon sayısı	Yüzde	Eşleşen tür	Baz Sayısı	Yüzde Benzerlik	Esleşen türün izole edildiği çevre
1	1, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 24, 26, 27, 28, 37, 40, 55, 56, 58, 60, 68, 69, 72, 73, 74, 76, 78, 80, 83, 85, 87, 89, 91, 92, 93, 98, 100	34	39,53 %	<i>Leptospirillum sp.</i>	1630 bp	%99 HM769765.1	Rio Tinto Maden
2	18, 19, 21, 48, 51	5	5,81 %	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	1585 bp	%99,19 NR_027216.1	Doğal asidik çevre
3	4, 38	2	2,32 %	<i>Uncultured acidiphilum sp.</i>	1547 bp	%99 KF848643.1	Asid maden drenajı (Dexing Bakır Madeni)
4	6, 7, 13, 16, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 42, 44, 46, 47, 49, 52, 62, 66, 67, 77, 79, 81, 84, 86, 95, 97	26	30,23 %	<i>Leptospirillum sp.</i>	1629 bp	%99 HM769765.1	Rio Tinto Maden
5	11	1	1,16 %	<i>Acidiphilum sp.</i>	1567 bp	%99,51 AF376026.2	Asid drenaj suları
6	43	1	1,16 %	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	1630 bp	%93,38 NR_028818.1	Asidik çevre
7	17, 23, 31, 32, 45, 50, 53, 88, 90, 99	10	11,62 %	<i>Uncultured Leptospirillum sp.</i>	1625 bp	%99 HM769765.1	Rio Tinto Maden
8	25	1	1,16 %	<i>Leptospirillum sp.</i>	1626 bp	%99 HM769765.1	Rio Tinto Maden
9	63, 64, 65	3	2,32 %	<i>Leptospirillum sp.</i>	1629 bp	%99 HM769765.1	Rio Tinto Maden
10	82	1	1,16 %	<i>Uncultured Bacteriovoracaceae bacterium</i>	1625 bp	%97,17 HQ730692	Rio Tinto
11	71, 94	2	3,48 %	<i>Leptospirillum sp.</i>	1653 bp	%99 HM769765.1	Rio Tinto Maden

K2 klon kütüphanesi oluşturması için 1492R geri primerin yer aldığı primer çifti ile amplifiye edilen PCR ürünü kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonunda 1 µl PCR ürünü kullanılmıştır. Transformasyon *E.coli* JM109 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 4 BSA platalere 100 µl, 200 µl, 200 µl ve kalan hacimde olmak üzere ekimi yapılmıştır. Gece boyu inkübasyon sonunda beyaz kolonilerden çarpı şeklinde ekim yapılarak tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen beyaz kolonilerden T7 ve SP6 primer çifti ile koloni PCR kurulmuştur. %1 agaroz jele yüklenerek 100V 70 dk süresince yürütülen jel %1 EtBr ile boyanmıştır. Biorad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemi görüntülenen jel Şekil 4.50’de verilmiştir.



Şekil 4.50. K2 Klon Kütüphanesi koloni PCR ürünleri. M:Marker 1-97: K7 klon kütüphanesi K1-1 K1-121 numaralı klonları

Pozitif sonuç veren klonların PCR ürünleri kullanılarak *AluI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu kurulmuştur. 2 saat 37°C’de inkübasyon sonrasında ürünün tamamı %2,5 agaroz jele yüklenmiş ve 60V’da 150 dk süresince yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BoRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemil ile görüntülenmiştir. Kesim profilinin yer aldığı jel görüntüsü Şekil 4.51’de verilmiştir



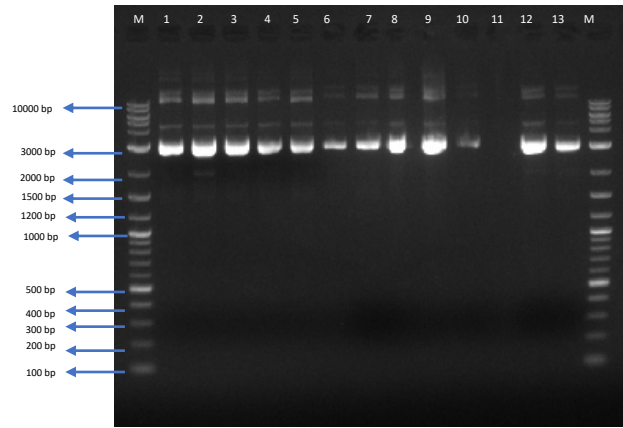
Şekil 4.51. K2 Klon kütüphanesinin restriksiyon analizi

ARDRA sonucuna göre elde edilen kesim profile ait koloniler Çizelge 4.22’de verilmiştir. 8 profil sırasıyla 29, 2, 28, 21, 1, 3, 1, 4 koloni içermektedir. Elde edilen kolonilerden dizi analizine örnek göndermek için en iyi çalışna koloni PCR’lara göre karar verilmiştir.

Çizelge 4. 22. K2 klon kütüphanesinin kesim profili göre koloni dağılımı

Profil Numarası	Klon numarası
1	1, 2, 3, 4, 5, 18, 27, 29, 31, 32, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 48, 49, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60
2	61, 62
3	63, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 80, 81, 83, 84, 89, 103, 106, 109, 112, 115, 121, 122, 125, 126, 131
4	64, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 104, 107, 108, 113, 123, 124, 127, 128, 129, 130
5	75
6	82, 102, 120
7	92
8	101, 110, 111, 114

K2-1, K2-27, K2-32, K2-61, K2-61, K2-75, K2-81, K2-82, K2-84, K2-86, K2-88, K2-92, K2-101, K2-102, K2-114 numaralı koloniler amfisilin içeren LB Brothlara ekilmiştir. 37°C’de 150 rpm çalkalamada gece boyu beklemiştir. İnkübasyon sonrası plazmidlerin kit ile izolasyonu 3.2.4.3 başlıkta verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. %1 agaroz jele yüklenmiş ve 100V’da 70 dk süresince yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BoRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemil ile görüntülenmiştir. Plazmidlerin jel görüntüsü Şekil 4.52’de verilmiştir.



Şekil 4.52. K2 klon kütüphanesinden dizi analizine gönderilmek üzere izole edilen plazmidler. M: Marker, 1:K2-1, 2:K2-27, 3:K2-32, 4:K2-61, 5:K2-61, 6:K2-75, 7:K2-81, 8:K2-82, 9:K2-84, 10:K2-86, 11:K2-88, 12:K2-102, 13:K2-114

Çizelge 4.22’de verilen klonlardan K2-1, K2-27, K2-32, K2-61, K2-61, K2-75, K2-81, K2-82, K2-84, K2-86, K2-88, K2-101, K2-102, K2-114 numaralı plazmidler dizi analizi için seçilmiştir. Gelen kromatogram sonuçları 4Peaks programı ile görünülmiştir. İleri ve geri okumaların Fasta dizileri MEGA 7.0 programında hizalanarak (align edilerek)

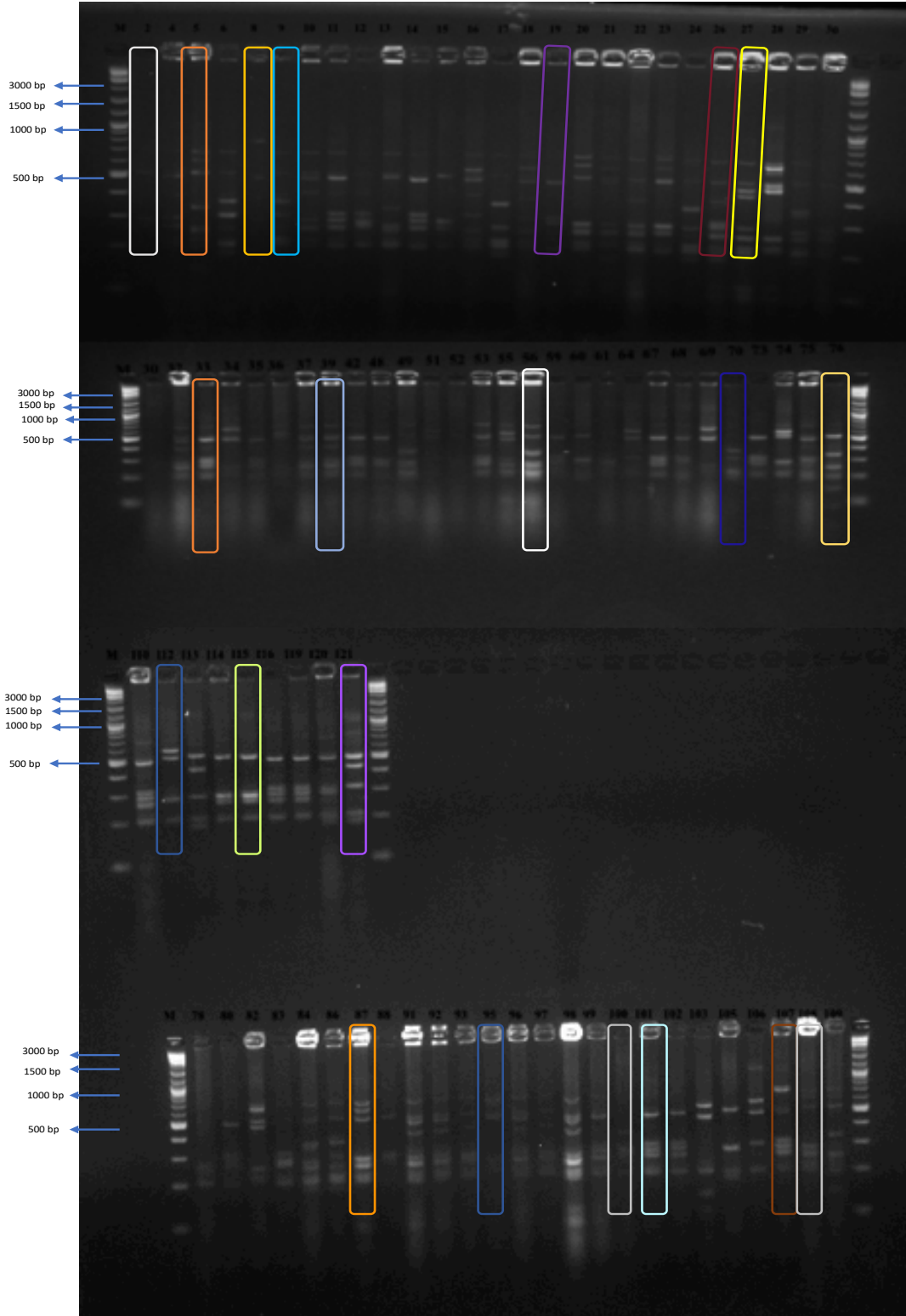
consensus diziler oluşturulmuştur. Oluşan diziler NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) BLAST programında blastn arayüzünde 16S ribizomal RNA veritabanı kullanılarak hizalanmıştır (align edilmiştir). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.23’de verilmiştir.

Çizelge 4. 23. K2 örneklem alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları

Profil	Klon numarası	Klon sayısı	Yüzde	Eşleşen tür	Baz Sayısı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen türün izole edildiği çevre
1	1, 2, 3, 4, 5, 18, 27, 29, 31, 32, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 48, 49, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60	29	32%	<i>Sulfobacillus benefaciens</i>	1588 bp	%92,7 NR_044352.1	İşlenmiş obaltife pirit konsantresi
2	61,62	2	2,24%	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	1600 bp	%90 NR_043568.1	Altın içeren sülfid konsantreleri
3	63, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 80, 81, 83, 84, 89, 103, 106, 109, 112, 115, 121, 122, 125, 126, 131	28	31,4%	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	1584 bp	%93 NR_040945.1	Kazakistan Nikolaev bakır-çinko-pirit deposu
4	64, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 104, 107, 108, 113, 123, 124, 127, 128, 129, 130	21	23,59 %	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	1093 bp	%91,9 NR_040943.1	
5	75	1	1,12 %	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i>	1522 bp	%88,7 NR_112972.1	Solfatrik alan
6	82, 102, 120	3	3,37 %	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	1567 bp	%91,17 NR_041798.1	Cae Coch pirit madeni
7	92	1	1,12 %	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	1580 bp	%89,1 NR_074390.1	Kaplica boşaltma alanı (Iceland)
8	101, 110, 111, 114	4	4,49 %	<i>Ferrithrix thermotolerans</i>	957 bp	%91,47 NR_042751.1	Kömür atığı

K4 klon kütüphanesi oluşturması için 1492R geri primerin yer aldığı primer çifti ile amplifiye edilen PCR ürünü kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonunda 1 µl PCR ürünü kullanılmıştır. Transformasyon *E.coli* JM109 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 4 BSA platelere 100 µl, 200 µl, 200 µl ve kalan hacimde olmak üzere ekimi yapılmıştır. Gece boyu inkübasyon sonunda beyaz kolonilerden çarpı şeklinde ekim yapılarak tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen beyaz kolonilerden T7 ve SP6 primer çifti ile koloni PCR kurulmuştur. %1 agaroz jele yüklenerek 100V 70 dk süresince yürütülen jel %1 EtBr ile boyanmıştır.

Pozitif sonuç veren klonların PCR ürünleri kullanılarak *AluI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu kurulmuştur. 2 saat 37°C’de inkübasyon sonrasında ürünün tamamı %2,5 agaroz jele yüklenmiş ve 60V’da 150 dk süresince yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BoRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemil ile görüntülenmiştir. Kesim profilinin yer aldığı jel görüntüsü Şekil 4.53’de verilmiştir.



Şekil 4.53. K4 klon kütüphanesinin restriksiyon analizi

ARDRA sonucuna göre elde edilen kesim profiline ait koloniler Çizelge 4.24'te verilmiştir. 21 profil için sırasıyla 3, 1, 2, 1, 4, 3, 8, 15, 4, 6, 1, 4, 8, 1, 1, 4, 1, 3, 7, 7, 2 koloni

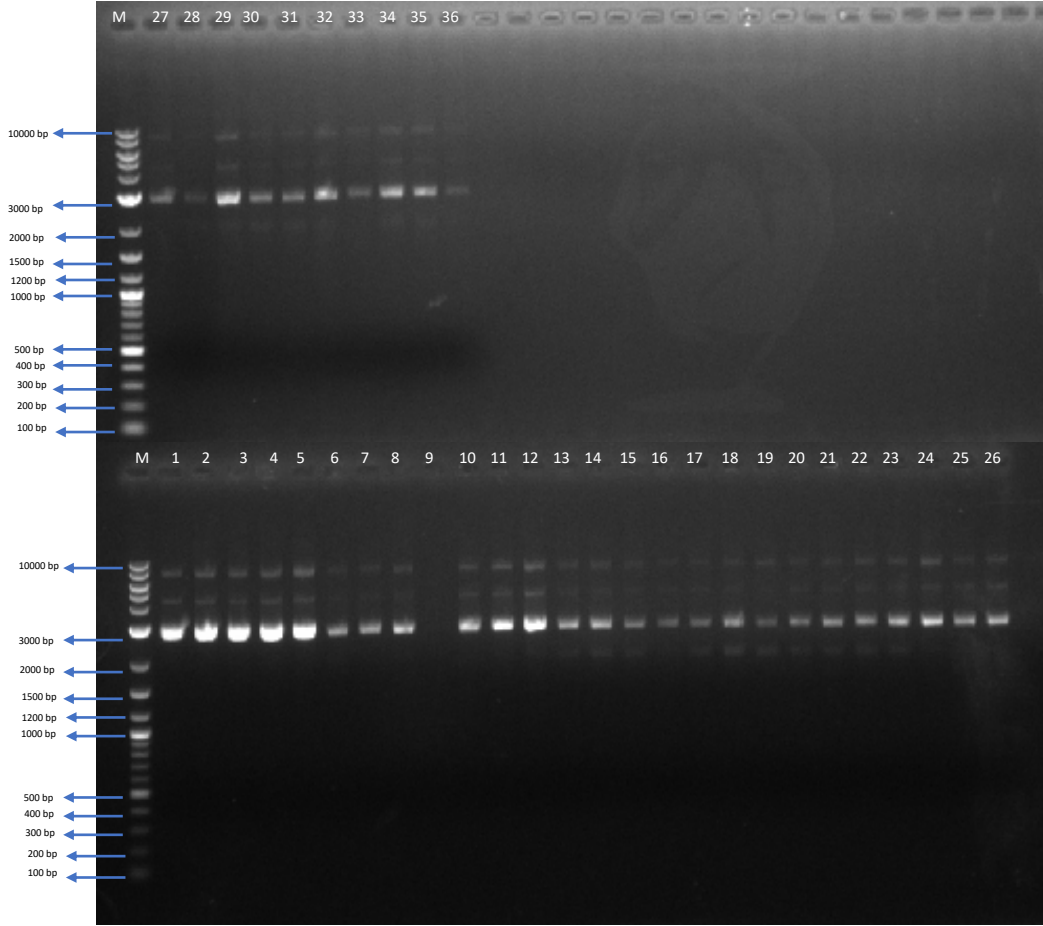
içermektedir. Elde edilen kolonilerden dizi analizine örnek göndermek için en iyi çalışna koloni PCR'lara göre karar verilmiştir.

Çizelge 4.24. K4 klon kütüphanesinin kesim profiline ait kolonilerin dağılımı

Profil Numarası	Klon numarası
1	2, 4, 30
2	5
3	6, 9
4	8
5	10, 11, 14, 19
6	12, 26, 109
7	13, 49, 56, 17, 24, 29, 84, 86
8	15, 33, 34, 35, 36, 42, 48, 51, 52, 53, 64, 67, 68, 69, 75
9	16, 18, 37, 39
10	20, 21, 22, 23, 55, 87
11	27
12	28, 106, 95, 32
13	59, 60, 61, 73, 114, 115, 100, 120
14	70
15	76
16	80, 88, 78, 105
17	108
18	103, 112, 74
19	99, 101, 102, 107, 110, 116, 119
20	91, 92, 93, 96, 97, 98, 83
21	121, 113

K4-2, K4-4, K4-5, K4-6, K4-8, K4-9, K4-10, K4-12, K4-13, K4-15, K4-16, K4-19, K4-20, K4-23, K4-27, K4-28, K4-37, K4-60, K4-70, K4-74, K4-75, K4-76, K4-80, K4-83, K4-84, K4-91, K4-95, K4-101, K4-103, K4-105, K4-108, K4-109, K4-113, K4-115, K4-116, K4-121 numaralı koloniler amfisilin içeren LB Broth besiyerleri ekilmiştir. 37°C'de 150 rpm çalkalamada gece boyu beklemiştir. İnkübasyon sonrası plazmidlerin kit ile izolasyonu 3.2.4.3 başlıkta verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. %1 agaroz jelle yüklenmiş ve 100V'da 70 dk süresince yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel

Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. Plazmidlerin jel görüntüsü Şekil 4.54'te verilmiştir.



Şekil 4.54. K4 klon kütüphanesinden dizi analizine gönderilmek üzere izole edilen plazmidler. M:Marker, 1:K4-2, 2:K4-4, 3:K4-5, 4:K4-6, 5:K4-8, 6:K4-9, 7:K4-10, 8:K4-12, 9:K4-13,10: K4-15, 11:K4-16, 12:K4-19, 13:K4-20, 14:K4-23, 15:K4-27, 16:K4-28, 17:K4-37, 18:K4-60, 19:K4-70, 20:K4-74, 21:K4-75, 22:K4-76, 23:K4-80, 24:K4-83, 25:K4-84, 26:K4-91, 27:K4-95, 28:K4-101, 29:K4-103, 30:K4-105, 31:K4-108, 32:K4-109, 33:K4-113, 34:K4-115, 35:K4-116, 36:K4-121

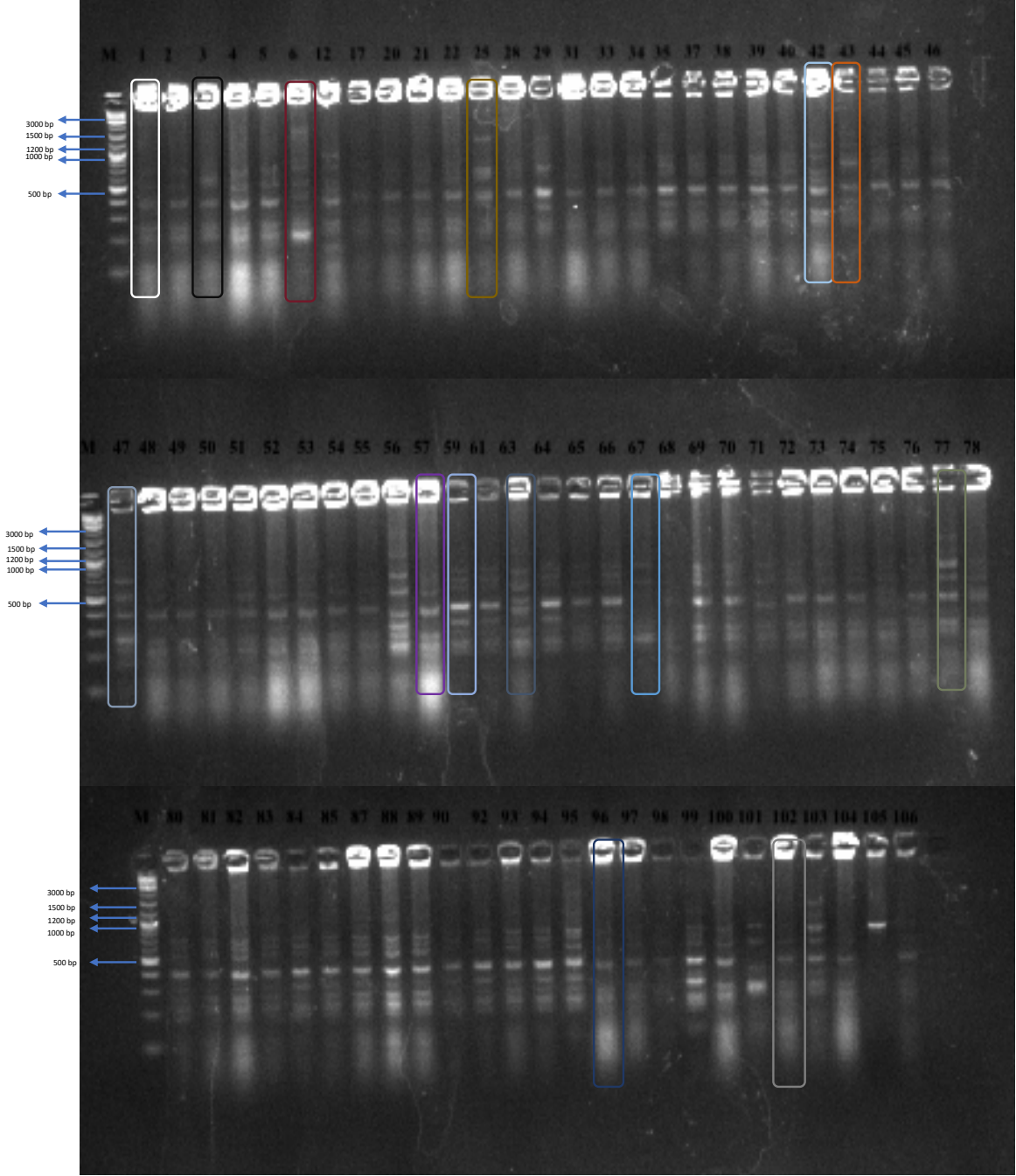
Çizelge 4.24'te verilen klonlardan K4-2, K4-5, K4-6, K4-8, K4-10, K4-12, K4-15, K4-16, K4-20, K4-27, K4-28, K4-70, K4-76, K4-83, K4-80, K4-84, K4-101, K4-108, K4-113, K4-115, K4-121 numaralı plazmid dizi analizine göndermek için seçilmiştir. Gelen kromatogram sonuçları 4Peaks programı ile görünülmiştir. İleri ve geri okumaların Fasta dizileri MEGA 7.0 programında hizalanarak (align edilerek) consensus diziler oluşturulmuştur. Oluşan diziler NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) BLAST programında blastn arayüzünde 16S ribozomal RNA veritabanı kullanılarak hizalanmıştır (align edilmiştir). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4. 25. K4 örneklem alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları

Profil	Klon no:	Klon sayısı	Yüzde	Eşleşen tür	Yüzde Benzerlik	Baz Sayısı	Eşleşen türün izole edildiği çevre
1	2, 4, 30	3	3,48 %	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i>	%97,16 NR_112972.1	946	Solfatarik alan
2	5	1	1,16 %	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	%91,3 NR_074390.1	1080	Kaplıca boşaltma alanı Iceland
3	6, 9	2	2,32 %	<i>Acidiphilium acidophilum</i>	%97,3 NR_036837.1	1523	
4	8	1	1,16 %	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	%98,41 NR_028818.1	1583	Asidik çevre
5	10, 11, 14, 19	4	4,60 %	<i>Ferritrix thermotolerans</i>	%91,3 NR_042751.1	1050	Yellowstone Ulusal Park
6	12, 26, 109	3	3,28 %	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i>	%93,5 NR_112972.1	1031	Solfatarik alan
7	13, 49, 56, 17, 24, 29, 84, 86	8	9,30 %	<i>Acidiphilium angustum</i>	%97,57 NR_025850.1	1492	
8	15, 33, 34, 35, 36, 42, 48, 51, 52, 53, 64, 67, 68, 69, 75	15	17,44 %	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	%91,3 NR_074390.1	1500	Kaplıca boşaltma alanı Iceland
9	16, 18, 37, 39	4	4,60 %	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	%91,42 NR_041798.1	1152	Cae Coch pirit madeni
10	20, 21, 22, 23, 55, 87,	6	6,97 %	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i>	%96,3 NR_112972.1		Solfatarik alan
11	27	1	1,16 %	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	%82,90 NR_074390.1	983	Kaplıca boşaltma alanı Iceland
12	28, 106, 95, 32	4	4,60 %	<i>Alicyclobacillus contaminans</i>	%91,4 NR_041475.1	982	
13	59, 60, 61, 73, 114, 115, 100, 120	8	9,30 %	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i>	%93,81 NR_112972.1	804	Solfatarik alan
14	70	1	1,16 %	<i>Acidiphilium angustum</i>	%97,35 NR_025850.1	1167	
15	76	1	1,16 %			1175	
16	80, 88, 78, 105	4	4,60 %	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i>	%91,3 NR_112972.1	1494	Solfatarik alan
17	108	1	1,16 %	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	%91,53 NR_041798.1	948	
18	103, 112, 74	3	3,48 %			1584	
19	99, 101, 102, 107, 110, 116, 119	7	8,13 %	<i>Aquihabitans daechungensis</i>	%91,3 NR_132289.1	1225	
20	91, 92, 93, 96, 97, 98, 83	7	8,13 %	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i>	%94,39 NR_112972.1	1176	Solfatarik alan
21	121, 113	2	2,32 %	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	%85,1 NR_040945.1	701	

K3 klon kütüphanesi oluşturması için 1492R geri primerin yer aldığı primer çifti ile amplifiye edilen PCR ürünü kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonunda 1 µl PCR ürünü kullanılmıştır. Transformasyon *E.coli* JM109 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 4 BSA plakelere 100 µl, 200 µl, 200 µl ve kalan hacimde olmak üzere ekimi yapılmıştır. Gece boyu inkübasyon sonunda beyaz kolonilerden çarpı şeklinde ekim yapılarak tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen beyaz kolonilerden T7 ve SP6 primer çifti ile koloni PCR kurulmuştur. %1 agaroz jele yüklenerek 100V 70 dk süresince yürütülen jel %1 EtBr ile boyanmıştır.

Pozitif sonuç veren klonların PCR ürünleri kullanılarak *AluI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu kurulmuştur. 2 saat 37°C'de inkübasyon sonrasında ürünün tamamı %2,5 agaroz jele yüklenmiş ve 60V'da 150 dk süresince yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BoRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. Kesim profilinin yer aldığı jel görüntüsü Şekil 4.55'te verilmiştir



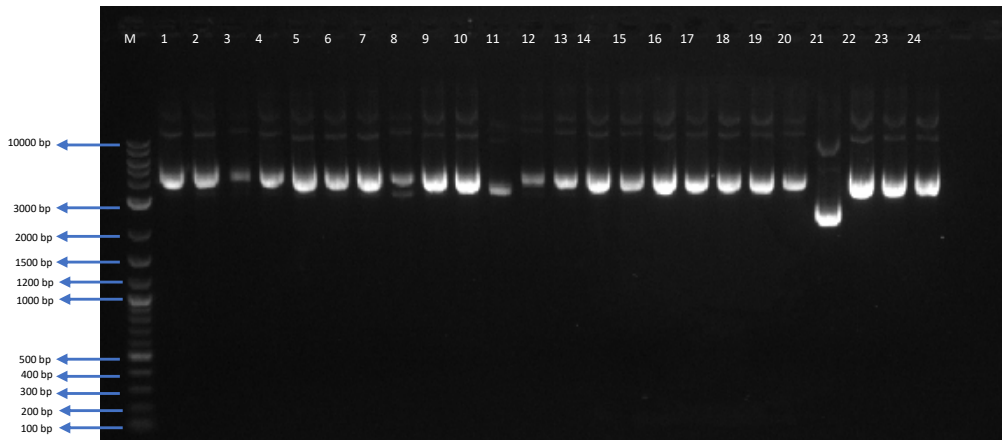
Şekil 4. 55. K3 Klon Kütüphanesi restriksiyon analizi

ARDRA sonucuna göre elde edilen kesim profiline ait koloniler Çizelge 4.26'da verilmiştir. 21 profil için sırasıyla 3, 1, 2, 1, 4, 3, 8, 15, 4, 6, 1, 4, 8, 1, 1, 4, 1, 3, 7, 2 koloni içermektedir. Elde edilen kolonilerden dizi analizine örnek göndermek için en iyi çalışan koloni PCR'lara göre karar verilmiştir.

Çizelge 4.26. K3 klon kütüphanesinin kesim profiline ait kolonilerin dağılımı

Profil Numarası	Klon numarası
1	1, 2, 4, 5, 17, 20, 21, 22, 28, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 101
2	3
3	6
4	12, 42
5	25, 29
6	31, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 59, 61, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99
7	43
8	47
9	57
10	59
11	63
12	67
13	77, 103
14	102, 104, 106

K3-3, K3-4, K3,6, K3-12, K3-25, K3-29, K3-39, K3-42, K3-43, K3-44, K3-47, K3-53, K3-57, K3-59, K3-63, K3-67, K3-69, K3-77, K3-87, K3-88, K3-101, K3-102, K3-103, K3-104 numaralı koloniler amfisilin içeren LB Brothlara ekilmiştir. 37°C’de 150 rpm çalkalamada gece boyu beklemiştir. İnkübasyon sonrası plazmidlerin kit ile izolasyonu 3.2.4.3 başlıkta verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. %1 agaroz jele yüklenmiş ve 100V’da 70 dk süresince yürütülmüştür. %1 EtBr ile boyanan jel BoRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. Plazmidlerin jel görüntüsü Şekil 4.56’da verilmiştir.



Şekil 4.56. K3 klon kütüphanesinden dizi analizine gönderilmek üzere izole edilen plazmidler. M: Marker, 1-24: K3 plazmidleri

Çizelge 4.26’ da verilen klonlardan K3-3, K3-4, K3-6, K3-12, K3-25, K3-29, K3-39, K3-42, K3-43, K3-44, K3-47, K3-57, K3-59, K3-63, K3-67, K3-69, K3-77, K3-102, K3-103, K3-104 numaralı plazmidler dizi analize göndermek için seçilmiştir. Gelen kromatogram sonuçları 4Peaks programı ile görünülmiştir. İleri ve geri okumaların Fasta dizileri MEGA 7.0 programında hizalanarak (align edilerek) consensus diziler oluşturulmuştur. Oluşan diziler NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) BLAST programında blastn arayüzünde 16S ribozomal RNA veritabanı kullanılarak hizalanmıştır (align edilmiştir). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.27’de verilmiştir.

Çizelge 4.27. K3 örneklem alanı klon kütüphanesinden seçilen klonların dizi analizi sonuçları

Profil	Klon numarası	Klon sayısı	Yüzde	Eşleşen tür	Baz Sayısı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen türün izole edildiği çevre
1	1, 2, 4, 5, 17, 20, 21, 22, 28, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 101	28	% 34	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	895 bp	%99,8 NR_114620.1	metal maden-etkili çevreler
2	3	1	% 1	<i>Metallibacterium scheffleri</i>	859 bp	%98,8 NR_118103.1	asid biyofilmi
3	6	1	% 1	<i>Ferrovum myxofaciens</i>	1140 bp	%91,7 NR_117782.1	asid maden drenajı (Parys Mountain bakır madeni)
4	12, 42	2	% 1	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	1497 bp	%97,9 NR_027216.1	Doğal asidik çevreler
5	25, 29	2	% 1	<i>Acidithiobacillus ferridurans</i>	1374 bp	%97,4 NR_114620.1	metal maden-etkili çevreler
6	31, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 59, 61, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99	34	%43	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	1447 bp	%99,6 NR_114620.1	metal maden-etkili çevreler
7	43	1	% 1	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	1454 bp	%99,8 NR_114620.1	metal maden-etkili çevreler
8	47	1	% 1	<i>Dokdonella koreensis</i>	1006	%93,3 NR_043322.1	
9	57	1	% 1	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	1446 bp	%99,7 NR_114620.1	metal maden-etkili çevreler
10	59	1	% 1	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	1452 bp	%99,7 NR_114620.1	metal maden-etkili çevreler
11	63	1	% 1	<i>Acidiphilium angustum</i>	1388 bp	%99,8 NR_025850.1	
12	67	1	% 1	<i>Ferrovum myxofaciens</i>	956 bp	%90,8 NR_117782.1	
13	77, 103	2	% 1	<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	1020 bp	%87 NR_112155.1	
14	102, 104, 106	3	%3	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	1445 bp	%99,9 NR_114620.1	metal maden-etkili çevreler

Mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında kullanılan 16S rRNA gen bölgesinin pGEMT vektöre aktarılması prensibine dayanan klon kütüphanesi, oluşturulan 3 sezon örneklerinin analizi sonucunda asid maden drenaj bölgesinin asidofil mikrobiyal komünitesinde yer alan bakterilerin (K6), *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Leptospirillum sp*, *Acidiphilium rubrum*, *Metallibacterium scheffleri*; (K5) *Leptospirillum ferriphilum*, *Leptospirillum sp.*, *Acidiphilium sp.*, *Acidithiobacillus ferriphilus*; (K1) *Sinobacteraceae bacterium*, *Actinobacterium BGR 77*, *Metallibacterium scheffleri*, *Alicyclobacillus sp.*, *Sulfobacillus*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Leptospirillum sp.*, *Legionella adelaidensis*, *Acidimicrobiaceae bacterium*, *Metallibacterium scheffleri*, *Aciditerrimonas ferrireducens*, *Ferrimicrobium sp*, *Ferrithrix thermotolerans*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Aquihabitans daechungensis*, *Ferrimicrobium acidiphilum*; (K7) *Leptospirillum sp*, *Acidiphilium sp*, *Bacteriovoracaceae bacterium*; (K2) *Sulfobacillus benefaciens*, *Sulfobacillus thermotolerans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Sulfobacillus acidophilus*, *Aciditerrimonas ferrireducens*, *Ferrimicrobium acidiphilum*, *Ferrithrix thermotolerans*; (K4) *Aciditerrimonas ferrireducens*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Acidiphilium acidophilum*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Ferrithrix thermotolerans*, *Acidiphilium angustum*, *Ferrimicrobium acidiphilum*, *Alicyclobacillus contaminans*, *Aquihabitans daechungensis*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*; (K3) *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Metallibacterium scheffleri*, *Ferrovum myxofaciens*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidiphilium angustum*, *Alicyclobacillus hesperidum* *Dokdonella koreensis* olduğu bulunmuştur.

Klon kütüphanesi oluşturularak çeşitlilik belirlenen diğer çalışmalar incelenmiştir. Yang vd., 2007 yılında yaptığı çalışmada Çin’de yer alan asid maden drenajından 3 örnek almışlardır. 16S rRNA PCR ürünleri genomik DNA’lardan 63F ve 1387R primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiştir. Vektör olarak PCR2.1 TOPO kullanılmıştır. Mavi beyaz seçilime göre seçilen klonların koloni PCR ürünleri *Hin6I* ve *MspI* ile kesilmiştir. Klon kütüphanesi taramasına göre, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidiphilium sp.*, *Leptospirillum*, *Leptospirillum ferriphilum* türleri tespit edilmiştir.

He vd, 2007 yılında yaptığı çalışmada iki acid maden drenajından 3 örnek toplamıştır. Genomik DNA’lar kalıp olarak kullanılarak 1492R ve 27F primer çifti ile PCR ürünleri amplifiye edilmiştir. p-GEMT vektör sistemi kullanılmıştır. Mavi beyaz seçilime

göre seçilen klonların koloni PCR ürünleri *AfaI* ve *MspI* enzimleri ile kesilmiştir. Klon kütüphanesinin tarama sonucuna göre *Nitrospira*, *α -Proteobacteria*, *β -Proteobacteria* ve *Proteobacteria* ailelerine ait mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir.

Bruneel ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınladığı çalışmada, kurşun ve çinko madenlerinden örnek almışlardır. Aldıkları örneklerin çevresel DNA'ları izole edilmiş, 21F ve 958R arke primerleri kullanılarak 16S rRNA PCR ürünleri amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerini TOPO klonlama vektörüne klonlayarak arkeal klon kütüphanesini kurmuşlardır. *HaeIII* ve *Hinfi* enzimleri ile restriksiyon analiz yapılmıştır. Elde edilen Arkeler Euryarchaeato şubesine ait *F. acidiphilum* olduğu tespit edilmiştir.

Yang vd., 2008 yılında yaptığı çalışmada, bakır madeninden örnek almıştır. Çevresel DNA izolasyonu yapmış, 63F ve 1387R primer çifti ile PCR ürünü amplifikasyonu yapılmıştır. TOPO klonlama vektörüne PCR ürünleri klonlanmıştır. Restriksiyon analizinde *Hin6I* ve *MspI* enzimleri kullanılmıştır. Klon kütüphanesinde baskın olan türlerin *Acidithiobacillus ferrooxidans* ve *Caulobacter crescentus* olduğu tespit edilmiştir.

He ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada kurşun çinko bakır madeninden örnek almışlardır. Çevresel DNA izolasyonu yapıldıktan sonra 27F ve 1492R primer çifti ile PCR amplifikasyonu yapılmıştır. PCR ürünleri pGEMT vektör sistemine klonlanmıştır ve restriksiyon analizi *AfaI* ve *MspI* ile yapılmıştır. Klon kütüphanesi taramasında *α -Proteobacteria* (1.1%), *β -Proteobacteria* (2.3%), *γ -Proteobacteria* (30.8%), *Firmicutes* (15.4%), *Actinobacteria* (0.3%) ve *Nitrospira* (50.1%) şubelerine tespit edilmiştir. *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, ve *Sulfobacillus* cinsleri sırasıyla *Nitrospira*, *γ -Proteobacteria*, ve *Firmicutes* şubelerinde tespit edilmiştir.

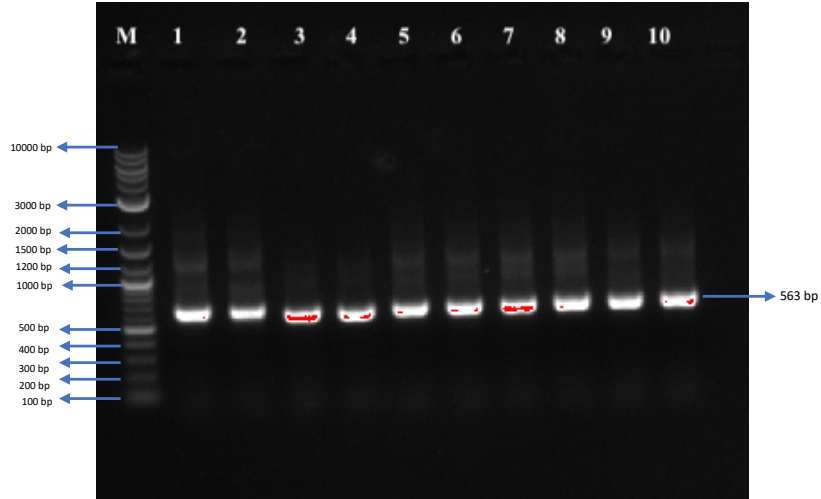
Hao vd., (2010) asid maden drenajından örnek almıştır. Çevresel DNA izole edildikten sonra 27F ve 1492R primer çifti ile bakteri 16S rRNA PCR ürünü; 21F ve 958R primer çifti ile arke 16S rRNA PCR ürünü ve 817F ve 1536R primer çifti ile ökaryo mikroorganizma 18S PCR ürünü amplifiye edilmiştir. Klonlama vektörü olarak pGEMT kullanılmıştır. Restriksiyon analizi *HhaI* ve *MspI* enzimleri ile yapılmıştır. Klon

kütüphanesinde bakteri domaininde baskın olan cins *Acidiphilium*'dur. Arkea domaininde ise Chranarcheato şubesine ait mikroorganizmalarıdır.

Bir diğer çeşitlilik çalışmasında Pepper vd., (2012) tarafından bakır maden drenajından alınan örneklerin DNA'ları ekstrakte edilmiştir. 16S rRNA PCR ürünleri 342F ve 1492R primer çifti ile amplifiye edilmiştir. TOPO10 klonlama vektörü olarak kullanılmıştır. OTU analizi sonucunda *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* ve *Bacteroidetes* şubeleri tespit edilmiştir.

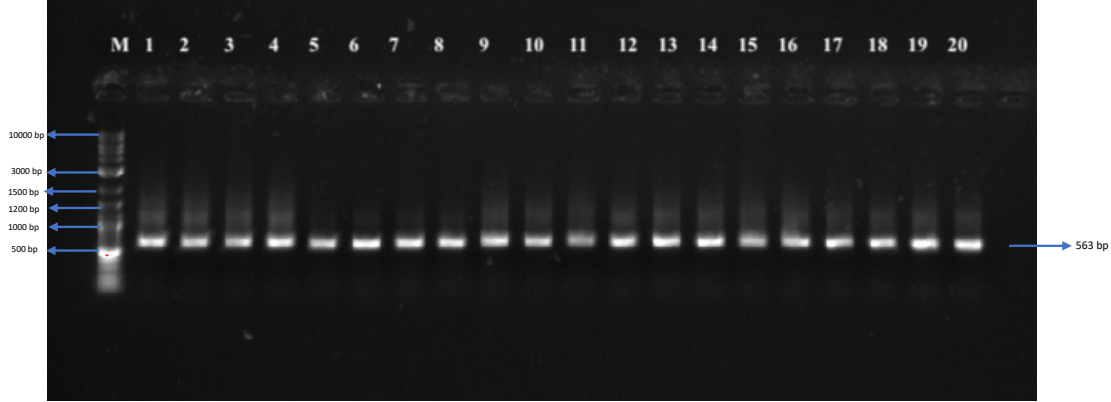
4.3.3. DGGE PCR ürünleri ve analizi

Başlık 3.2.4.3'te verilen DGGE PCR protokolüne göre kalıp olarak birinci sezon örneklerinin çevresel DNA'ları 1 µl kullanılarak 2 tüp reaksiyon kurulmuştur. PCR ürünleri %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Beş çevresel DNA kullanılarak yaklaşık 566 bp uzunluğunda elde edilen ürünlerin jel görüntüsü Şekil 4.57'de verilmiştir.



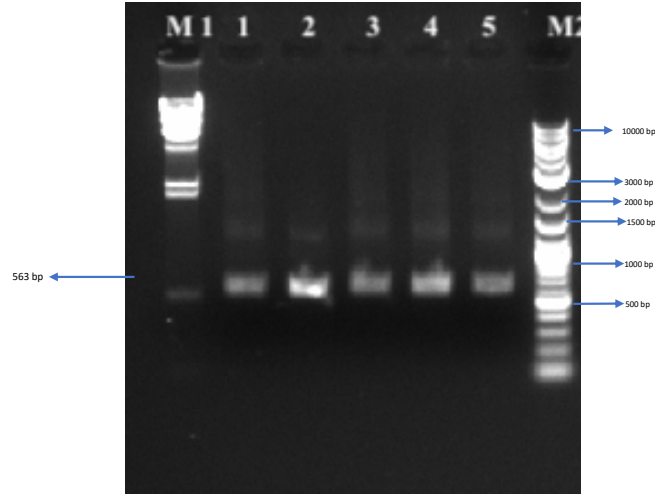
Şekil 4.57. Bakteri DGGE PCR ürünleri. M: Marker 2-log DNA ladder; 1-2: K1 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 3-4: K2 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 5-6: K3 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 7-8: K4 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 9-10:K5 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü

Başarılı PCR ürünleri elde edilmesi ile aynı bileşen ve koşullarda 4'er tüp daha reaksiyon kurulmuştur. PCR ürünleri %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Ürünlerin yürütüldüğü jel görüntüsü Şekil 4.58'de verilmiştir.



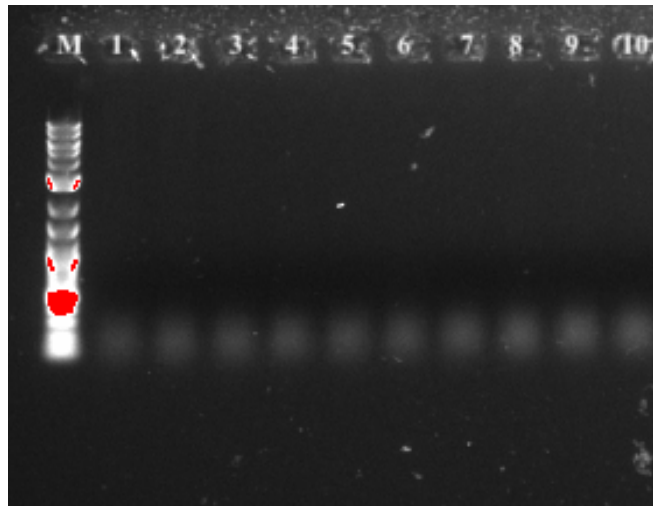
Şekil 4.58. Bakteri DGGE PCR ürünleri. M: Marker 2-log DNA ladder; 1-4: K1 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 5-8: K2 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 9-12: K3 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 13-16: K4 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 17-20:K5 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü

Şekil 4.57'da verilen jel görüntüsünde elde edilmesi gereken bantların üst kısmında zayıf bantlar görülmüştür. Bu bantların elimine edilmesi için başlık 3.2.4.3'te verilen Fermentes GeneJet Gel Extraction Kit protokolüne göre jelden saflaştırma işlemi yapılmıştır. 30 µl elüsyon tamponunda çözülen ürünler %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiş ve Şekil 4.59'da verilmiştir. Ancak elde edilen PCR ürünleri ile saflaştırılan ürünlerin aynı olduğu görülmektedir. Üstteki zayıf bant giderilememiştir.



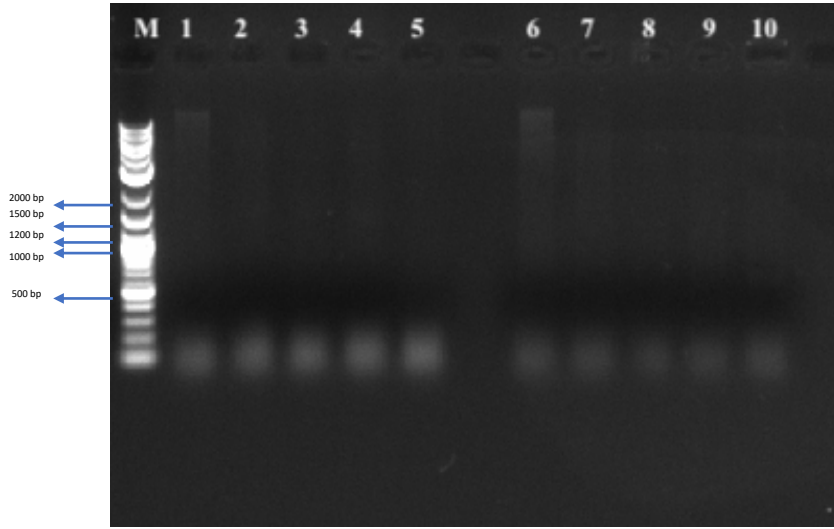
Şekil 4.59. Saflaştırılmış Bakteri DGGE PCR ürünleri. M1:Marker Lambda *Hind*III DNA ladder; 1: K1 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 2: K2 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 3: K3 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 4: K4 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 5:K5 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; M2: 2-log DNA ladder

Arke DGGE PCR başlık 3.2.4.3'te verildiği üzere benzer şekilde kurulmuştur. Kalıp olarak 1 µl DNA kullanılmıştır. PCR ürünleri %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 V'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.60'da verilmiştir. Arke PCR 1 µl kalıp DNA kullanıldığında çalışmamıştır.



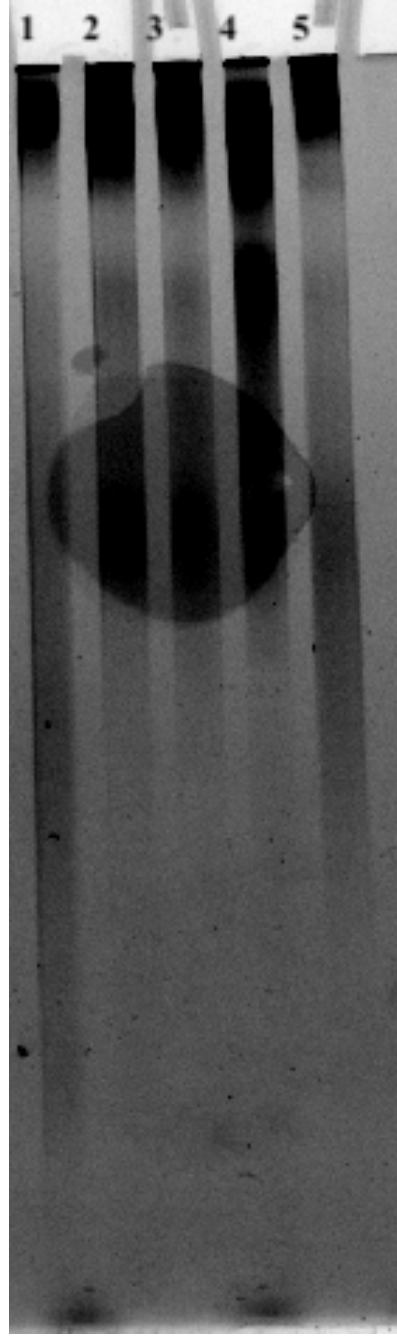
Şekil 4.60. Kalıp olarak 1 µl DNA kullanılan Arke DGGE PCR ürünleri jel görüntüsü. M: Marker 2-log DNA ladder; 1-4: K1 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 5-8: K2 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 9-12: K3 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 13-16: K4 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 17-20:K5 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü

Arke PCR için DNA kalıp miktarı değiştirilerek yeniden kurulmuştur. 2 µl ve 3 µl DNA kullanılarak elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 V'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.61'de verilmiştir. Arke PCR bir kez daha çalışmamıştır. Bu nedenle ARKE DGGE analizi yapılamamıştır.



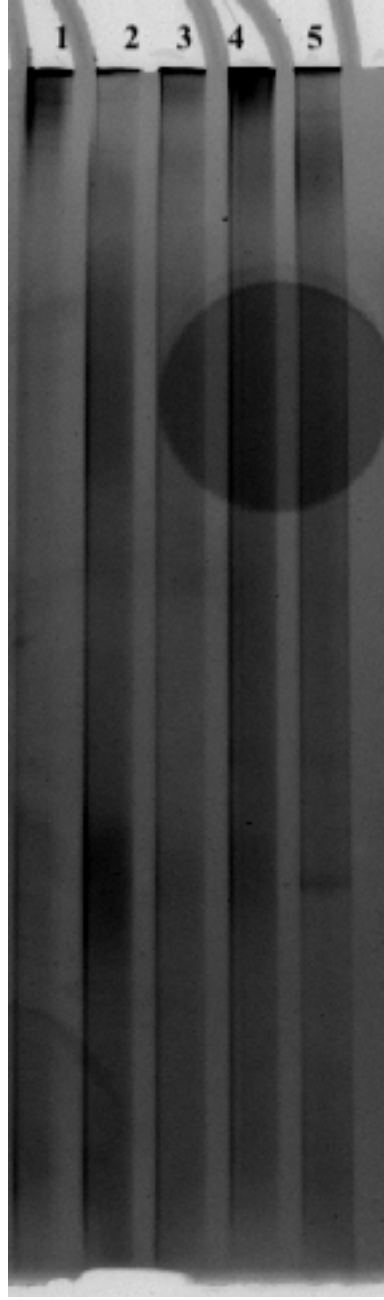
Şekil 4.61: Kalıp olarak 2 µl ve 3µl DNA kullanılan Arke DGGE PCR ürünleri jel görüntüsü. M: Marker 2-log DNA ladder; 1ve 6: K1 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 2ve7: K2 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 3 ve 8: K3 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 4ve 9: K4 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü; 5 ve 10:K5 çevresel örneğin DGGE PCR ürünü

Öncelikle %60-%40 denatüre edici ajan gradientinde jel hazırlanmıştır. Donduktan sonra PCR ürünlerinin 15 µl'si örnek yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Jelin tamponunun sıcaklığı 60 °C'deyken 18 saat süresince 90 V'da yürütülmüştür. Jel 18 saat sonunda EtBr ile boyanmış ve iki kere distile su ile yıkandıktan sonra BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Şekil 4.62'de DGGE analiz sonucu verilmiştir.



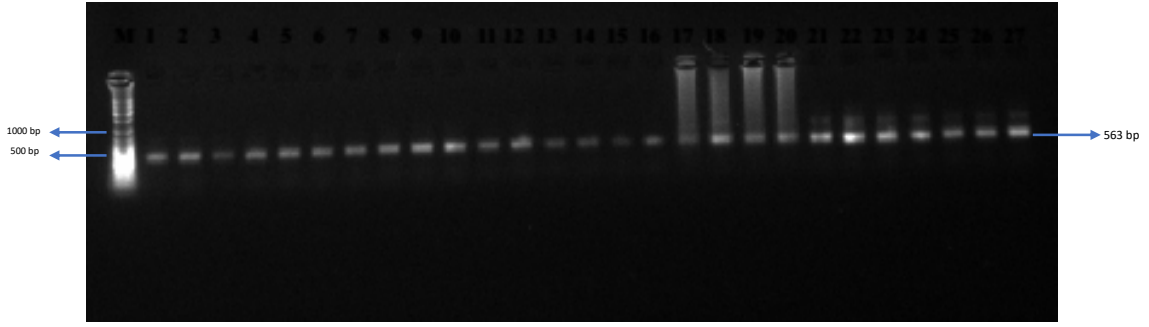
Şekil 4.62. Birinci sezon örneklerinin %60-40 konsantrasyon aralığında DGGE analizi. 1:K1, 2:K2, 3:K3, 4:K4, 5:K5

Şekil 4.46'da görülen DGGE jelinde net bir ayırım gözlemlenemediği için, gradient yüzdeleri değiştirilmiştir. DGGE jel denatüre edicilerin konsantrasyonu %50-%30 olacak şekilde tekrar hazırlanmıştır. Bunun sonucunda elde edilen görüntü de Şekil 4.63'te verilmiştir. Bu jel ile de ayırım sağlanamamış, UV altında bantlar görülmediği için kesim yapılamamıştır.



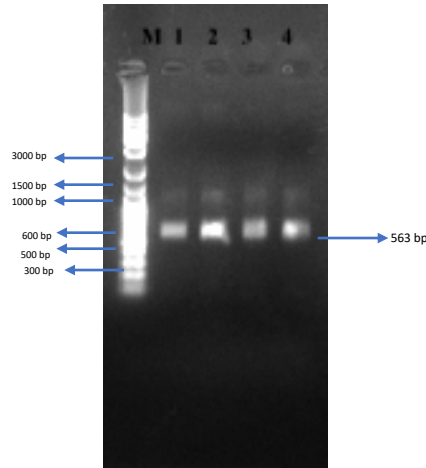
Şekil 4.63. %50-30 denatüre edici konsantrasyonu ile hazırlanan jelde DGGE analizi. 1:K1, 2:K2, 3:K3, 4:K4, 5:K5

Başlık 3.2.4.3'te verilen DGGE PCR protokolüne göre yeniden reaksiyon kurulmuştur. PCR ürünleri %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Şekil 4.64'de beş çevresel DNA kullanılarak yaklaşık 566 bp uzunluğunda elde edilen ürünlerin jel görüntüsü verilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri birleştirilerek konsantre edilmiştir.



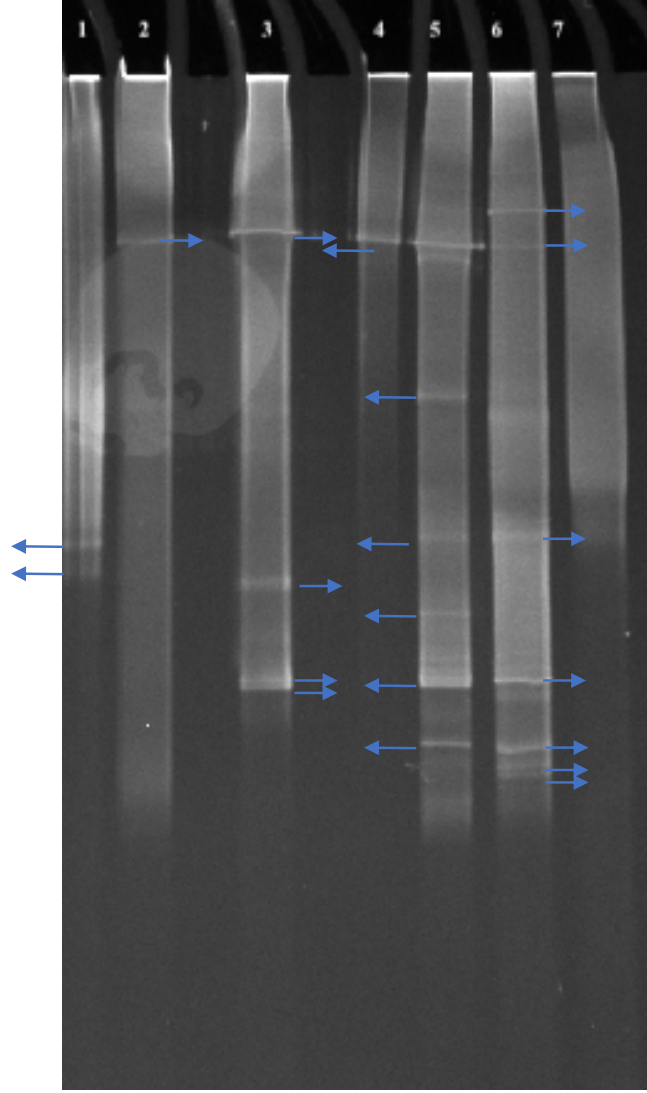
Şekil 4.64. İki sezon çevresel DNA ile amplifiye edilen bakteri DGGE PCR ürünleri jel görüntüsü. M:Marker, 2-log DNA ladder; 1-4:K1; 5-8:K2; 9-12:K3; 13-16:K4; 17-20:K5; 21-27:K6.

Jel hazırlanırken denatüre edicilerin konsantrasyon yüzdelerini daha net belirlemek için elde edilen izolatlardan iki tanesi ile bakteri DGGE PCR kurulmuştur. PCR ürünleri %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.65'de verilmiştir. BY10ve BY17 izolatların DGGE PCR ürünleri başarı ile elde edilmiştir.



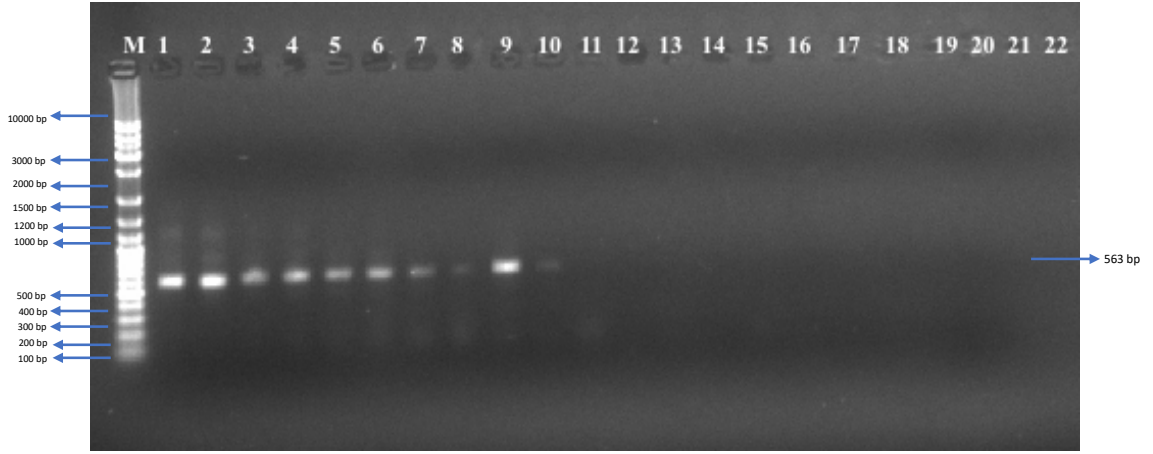
Şekil 4.65. BY10 ve BY17 izolatların bakteri DGGe PCR ürünleri jel görüntüsü. M: Marker 2-log DNA ladder; 1-2: BY10; 3-4:BY17

Jel denatüre edicilerin konsantrasyonu yeniden %60-%40 oranında olacak şekilde hazırlanmıştır. Donduktan sonra PCR ürünlerinin 20 µl'si örnek yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Jelin tamponunun sıcaklığı 60 °C'deyken 18 saat süresince 90 V'da yürütülmüştür. Jel 18 saat sonunda EtBr ile boyanmış ve iki kere distile su ile yıkandıktan sonra BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Şekil 4.66'da DGGE analiz sonucu verilmiştir.

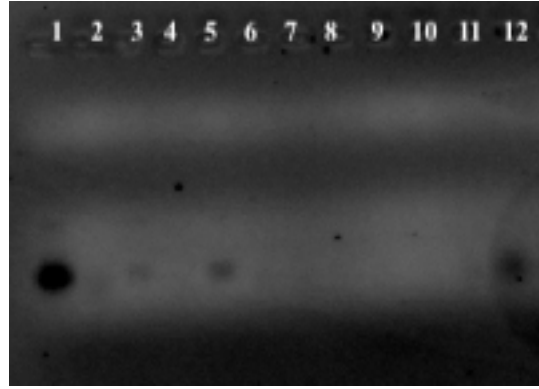


Şekil 4.66. %60-%40 denatüre edici konsantrasyonu ile hazırlanan jelde DGGE analizi. 1:K6, 2:K5, 3:K4, 4:K, 5:K2, 6:K1, 7:BY10

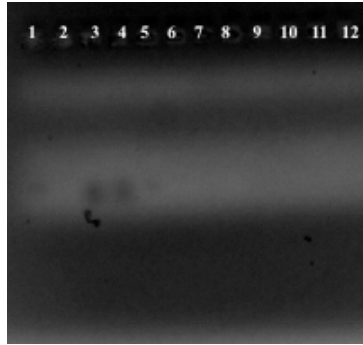
22 bant kesilmiş ve bant dağılımları K1 için 8 bant K2 için sonraki 7 bant, K3 için bir bant, K4 için 4 bant, K5 için bir bant ve K6 için 2 bant kesilmiştir. Bantlardan DNA, başlık 3.2.4.3 başlığında verilen protokole göre elde edilmiş ve aynı başlıktak, Re-PCR protokolünde kalıp olarak kullanılmıştır. Şekil 4.67, Şekil 4.68 ve Şekil 4.69’da sırasıyla kalıp DNA olarak 1 µl, 2 µl ve 3 µl kullanıldığında oluşan ürünler verilmiştir. Elde edilen 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,22 numaralı bantlar dizi analizine gönderilmiştir. İstenilen sonuçlar elde edilemediği için yeniden DGGE analizi yapılacaktır.



Şekil 4.67. 1µl kalıp DNA kullanılarak amplifiye edilen Re-PCR ürünleri jel görüntüsü



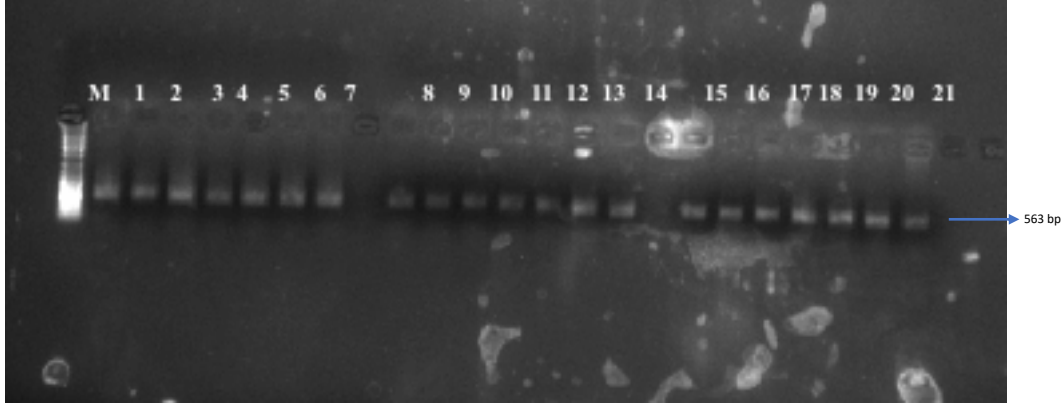
Şekil 4.68. 2µl kalıp DNA kullanılarak amplifiye edilen Re-PCR ürünleri jel görüntüsü



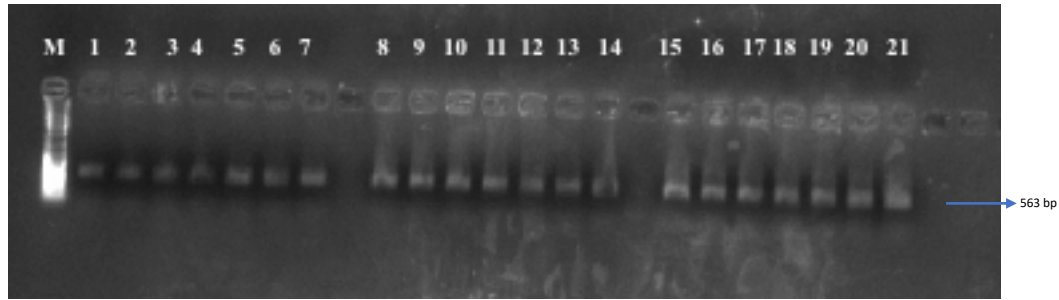
Şekil 4.69. 3µl kalıp DNA kullanılarak amplifiye edilen Re-PCR ürünleri jel görüntüsü

İki sezon örnekleri ile başlık 3.2.4.3'te verilen DGGE PCR protokolüne göre kalıp olarak çevresel DNA'ları 2 µl kullanılarak reaksiyon kurulmuştur. PCR ürünleri %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile

görüntülenmiştir. Şekil 4.70 ve Şekil 4.71’de yaklaşık 566 bp uzunluğunda elde edilen ürünlerin jel görüntüsü verilmiştir.



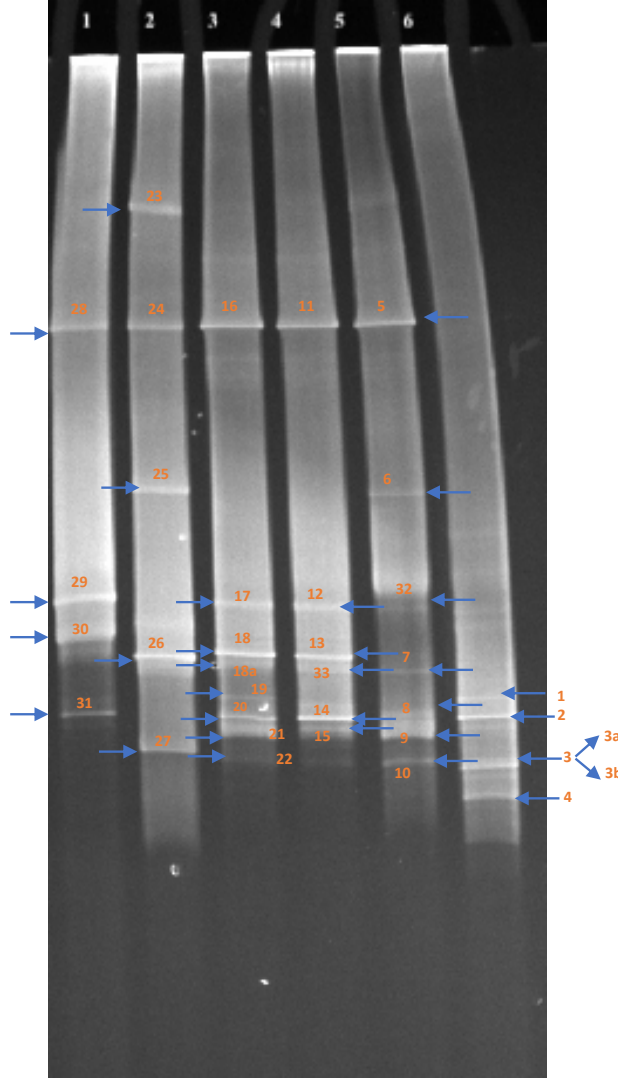
Şekil 4. 70. Birinci sezon üç örneklem alanının bakteri DGGE PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: Marker 2-log DNA ladder; 1-7:K1; 8-14:K2; 15-21:K3



Şekil 4. 71. Bakteri DGGE PCR amplifikasyon ürünleri. M: Marker 2-log DNA ladder; 1-7:K4; 8-14:K5; 15-21:K6

Reaksiyonların tamamında pozitif sonuç elde edilmiştir. Tüpler birleştirilip konsantre edilerek kullanılmıştır. %60-%40 konsantrasyonda denatüre ediciler kullanılarak protokole göre hazırlanan jelle örneklerin tamamı boya ile karıştırılarak yüklenmiştir.

DGGE jeli 18 saat süresince 90 V’da yürütüldükten sonra EtBr ile boyama ve sonrasında saf su ile yıkama işlemlerinden sonra BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Şekil 4.72’de iki sezon örneklerinin DGGE analiz sonucu yer almaktadır.



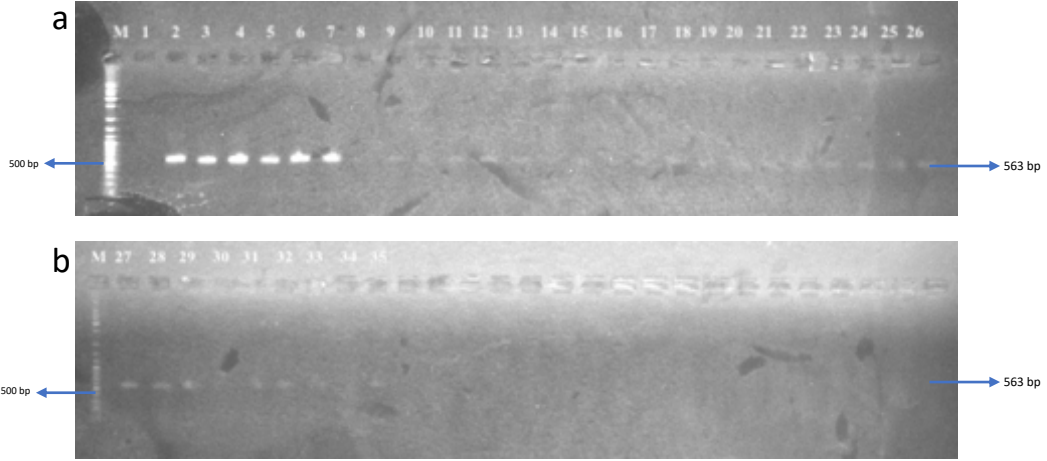
Şekil 4.72. İki sezon örneklerin DGGE jel görüntüsü. 1:K6, 2:K5, 3:K4, 4:K3, 5:K2, 6:K1

İki sezondaki altı örnek için 35 bant kesilmiş ve bant dağılımları K1 için 5 bant K2 için sonraki 7 bant, K3 için 6 bant, K4 için 8 bant, K5 için 5 bant ve K6 için 4 bant kesilmiştir. Kesilen bant dağılımları Çizelge 4.28'de verilmiştir. 3.2.4.3 başlığında verilen protokole göre DNA elde edilmiş ve aynı başlıkraki Re-PCR protokolünde kalıp olarak kullanılarak ürünler elde edilmiştir.

Çizelge 4.28. DGGE bantlarının örneklere göre dağılımı

Örnek adı	K1	K2	K3	K4	K5	K6
Bant numaraları	1, 2, 3a, 3b, 4	5,6, 7, 8, 9, 10, 32	11, 12, 13, 33, 14, 15	16, 17, 18, 18a, 19, 20, 21, 22	23, 24, 25, 26, 27	28, 29, 30, 31

Elde edilen DNA'lardan 2 µl kalıp kullanılarak aynı başlıktaki Re-PCR kurulmuştur. Elde edilen ürünler %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.73'de verilmiştir.



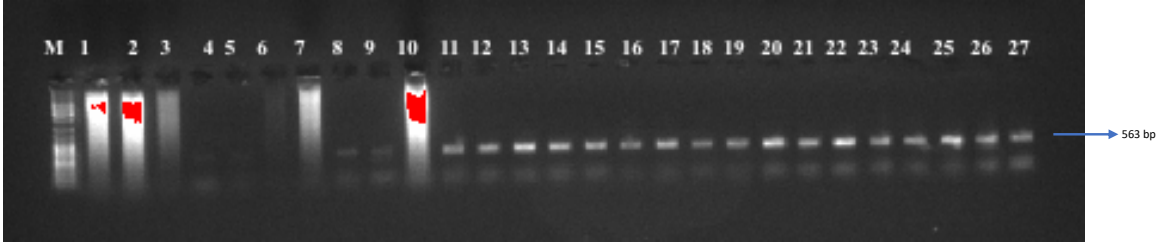
Şekil 4. 73. DGGE bantlarından elde edilen DNA'ların Re-PCR ürünlerinin jel görüntüsü a) M: Marker 2-log DNA ladder, 1:1, 2:2, 3:3a, 4:3b, 5:4, 6:5, 7:6, 8:7, 9:8, 10:9, 11:10, 12:11, 13:12, 14:13, 15:14, 16:15, 17:16, 18:17, 19:18, 20:18a, 21:19, 22:20, 23:21, 24:22, 25:23, 26:24. b) M: Marker, 2-log DNA ladder, 27:25, 28:26, 29:27, 30:28, 31:29, 32:30, 33:31, 34:32, 35:33.

Şekil 4.73'e göre 6 bant için kaliteli ürün elde edilmiştir. Diğer bantlardan aynı sonuç alınması için tekrar PCR kurulmuştur. Bu reaksiyonda kalıp olarak 3 µl DNA kullanılmıştır. Elde edilen ürünler %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.74'te verilmiştir.



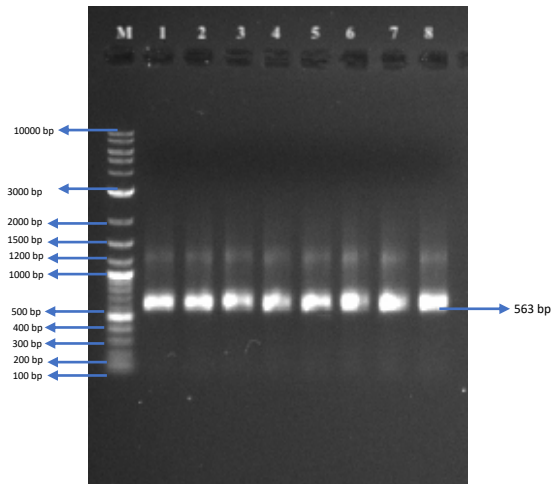
Şekil 4.74. Tekrar edilen Re-PCR ürünlerinin jel görüntüsü. a) M:Marker 2-log DNA Ladder 1:1, 2:7, 3:8, 4:9, 5:10, 6:11, 7:12, 8:13, 9:14, 10:15, 11:16, 12:17, 13:18, 14:18a, 15:19, 16:20, 17:21, 18:23, 19:24, 20:25, 21:26, 22:27, 23:28, 24:29, 25:30, 26:31, M:Marker 2-log DNA Ladder, 27:32, 28:33.

Çıkmayan bant DNA'ların tekrar 2 µl kalıp olarak kullanılması ile yeniden PCR kurulmuştur. Elde edilen ürünler %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.68'de verilmiştir. Elde edilen yüksek konsantrasyondaki PCR ürünleri gruplandırılarak dizi analizine gönderilmiştir.



Şekil 4.75. İkinci kez tekrar edilen Re-PCR ürünlerinin jel görüntüsü. a) M:Marker 2-log DNA Ladder 1:24, 2:25, 3:26, 4:27, 5:28, 6:29, 7:30, 8:31, 9:32, 10:33, 11:9, 12:18, 13:18a, 14:19, 15:20, 16:21, 17:23, 18:24, 19:25, 20:26, 21:27, 22:28, 23:29, 24:30, 25:31, 26:32, 27: 33.

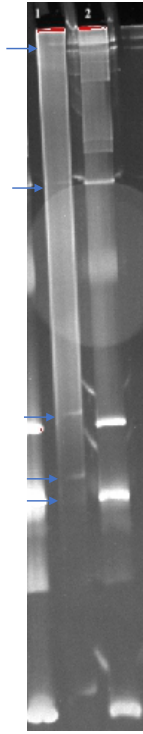
Üçüncü sezon örneğinin başlık 3.2.4.3'te verilen DGGE PCR protokolüne göre kalıp olarak çevresel DNA'sı 1 µl olarak kullanılarak reaksiyon kurulmuştur. PCR ürünleri %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Şekil 4.76'da yaklaşık 566 bp uzunluğunda elde edilen ürünlerin jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.76. Üçüncü sezon örneğinin DGGE PCR ürünleri jel görüntüsü

Reaksiyonların tamamında pozitif sonuç elde edilmiştir. Tüpler birleştirilip konsantre edilerek kullanılmıştır. %60-%40 konsantrasyonda denatüre ediciler kullanılarak protokole göre hazırlanan jele örneklerin tamamı boya ile karıştırılarak yüklenmiştir.

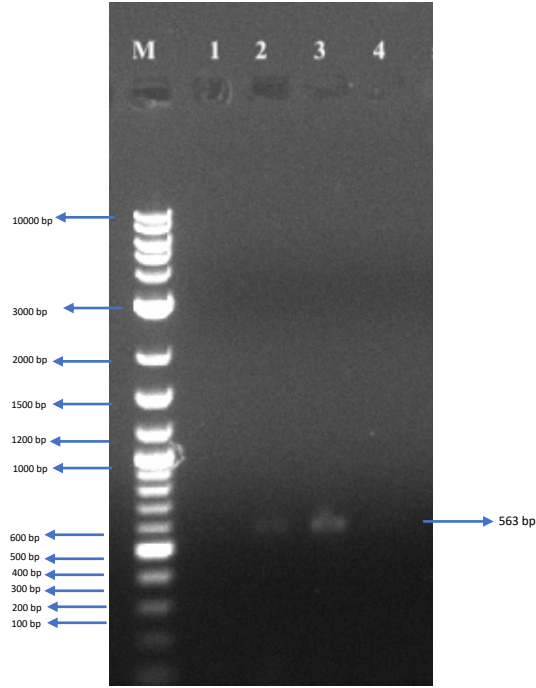
DGGE jeli 18 saat süresince 90 V'da yürütüldükten sonra EtBr ile boyama ve sonrasında saf su ile yıkama işlemlerinden sonra BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Şekil 4.77'de iki sezon örneklerinin DGGE analiz sonucu yer almaktadır.



Şekil 4.77.Üçüncü sezon örneğın DGGE analizi. 1:K7, 2:BY19

Üçüncü sezondaki tek örnek için 4 bant kesilmiştir. 3.2.4.3 başlığında verilen protokole göre DNA'lar elde edilmiş ve aynı başlıktaki Re-PCR protokolünde kalıp olarak kullanılarak ürünler elde edilmiştir.

Elde edilen DNA'lardan 2 µl kalıp kullanılarak aynı başlıkta yer alan bileşen ve koşullara göre Re-PCR kurulmuştur. Elde edilen ürünler %1 agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sisteminde 100 v'da 70 dk süresince yürütüldükten sonra %1 EtBr ile boyanan jel BioRad Jel Dökümantasyon ve Görüntüleme Cihazı ile görüntülenmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.78'de verilmiştir.



Şekil 4.78. DGGE bantlarından elde edilen DNA'ların Re-PCR ürünleri

DGGE analizi sonucunda başarılı sonuç elde edilen tüm ürünler DGGE ileri ve geri primerleri ile dizi analizine gönderilmiştir. Gelen kromatogram sonuçları 4Peaks ile görüntülenmiştir. İleri ve geri okumaların dizileri MEGA 7.0 programında hizalanarak (align edilerek) tüm dizi elde edilmeye çalışılmıştır. Diziler tamamlandıktan sonra <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Nucleotide BLAST programında 16S ribosomal RNA veritabanında hizalanmıştır (align edilmiştir). Yüksek benzerlik gösteren türler Çizelge 4.29'da verilmiştir. Her bir örnek alanı ayrı renk ile çizelgede belirtilmektedir.

Çizelge 4. 29. DGGE bantlarının eşleştiği türler ve izole edildikleri çevreler

Örnek adı	Bant numaraları	Dizilemeye gönderilen	NCBI veri tabanı	Baz Sayısı	İzole Edildiği Ortam
K1	2	2,3a,3b,4	<i>Metallibacterium scheffleri</i> strain MCF91 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 96% KC257407.1	448 bp	Metal maden gölü (IPB, Spain)
	3a		<i>Acidithrix ferrooxidans</i> strain Py-F3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 86% KC208497.1	535 bp	Asit metal kontamine akış
	3b		Uncultured bacterium clone Kili_01H_N1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 88% KX771341.1	479 bp	Uhuru Tepesinin kuzey doğu tarafı
	4		Uncultured actinobacterium clone SI-1M_D03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 96% EF221457.1	530 bp	Yosun altı topraklar
K2	5	5,6,7,8,9,10,32	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> strain YL15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% KY352776.2	537 bp	Asit maden drenaj (Tibet, China)
	6		<i>Acidiphilium cryptum</i> strain XB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 83% KM369913.1	442 bp	Yüksek pirit içeren kalkozit madeni
	7		<i>Acidiphilium</i> sp. strain MPLK-302 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 98% KX689773.1	217 bp	Yeraltı madeni (Mynydd Parys)
	8		<i>Metallibacterium scheffleri</i> strain MCF91 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 96% KC257407.1	448 bp	Metal maden gölü (IPB, Spain)
	9		<i>Acidiphilium</i> sp. strain LAMA 1487 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 92% KX689782.1	556 bp	Yeraltı madeni (Mynydd Parys)
	10		<i>Rhodovastum atsumiense</i> strain G2-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 88% NR_112776.1	320 bp	Çeltik toprağı
	32		<i>Acidiphilium rubrum</i> strain Colony12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 90% KC924950.1	309 bp	Asit madeni drenaj atık havuzu
K3	11	11,12,13,33,14,15	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> strain YL15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% KY352776.2	439 bp	Asit madeni drenaj(Tibet, China)
	12		<i>Acidiphilium</i> sp. DBS4-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 92% EU003879.1	512 bp	
	13		<i>Acidiphilium</i> sp. strain MPLK-210 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 97% KX689772.1	160 bp	Yeraltı madeni (Mynydd Parys)
	33		<i>Acidiphilium</i> sp. strain MPLK-302 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 98% KX689773.1	217 bp	Yeraltı madeni (Mynydd Parys))
	14		<i>Metallibacterium scheffleri</i> strain MCF91 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 96% KC257407.1	448 bp	Metal maden gölü (IPB, Spain)
K4	16	16,17,18,18a,19,20	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> strain YL15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% KY352776.2	445 bp	Asit madeni drenaj (Tibet, China)
	17		<i>Acidiphilium rubrum</i> strain Colony12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 97% KC924950.1	429 bp	Asit madeni drenaj atık havuzu
	18		<i>Acidiphilium</i> sp. strain MPLK-210 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 97% KX689772.1	160 bp	Yeraltı madeni (Mynydd Parys)
	18a		<i>Acidiphilium</i> sp. strain MPLK-302 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 98% KX689773.1	221 bp	Yeraltı madeni (Mynydd Parys)
	19		<i>Acidiphilium rubrum</i> strain Colony11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 92% KC924949.1	166 bp	Asit madeni drenaj atık havuzu
K5	24	24,25,26	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> strain YL15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% KY352776.2	555 bp	Asit madeni drenaj (Tibet, China)
	25		<i>Acidiphilium cryptum</i> strain XB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 83% KM369913.1	442 bp	Yüksek pirit içeren kalkozit madeni
	26		<i>Acidiphilium</i> sp. strain MPLK-210 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 97% KX689772.1	160 bp	Yeraltı madeni (Mynydd Parys)
K6	28	29,30,31	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> strain YL15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% KY352776.2	537 bp	Asit madeni drenaj (Tibet, China)
	29		<i>Acidiphilium rubrum</i> strain Colony12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 95% KC924950.1	568 bp	Asit madeni drenaj atık havuzu
	30		<i>Acidiphilium rubrum</i> strain Colony12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 98% KC924950.1	366 bp	Asit madeni drenaj atık havuzu
	31		<i>Metallibacterium scheffleri</i> strain MCF91 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 96% KC257407.1	448 bp	Metal maden gölü (IPB, Spain)
K7	b	b,c,d	<i>Metallibacterium scheffleri</i> strain MCF91 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 96% KC257407.1	448 bp	Metal maden gölü (IPB, Spain)
	c		<i>Acidiphilium rubrum</i> strain Colony12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 98% KC924950.1	303 bp	Asit madeni drenaj atık havuzu
	d		<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> strain YL15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% KY352776.2	537 bp	Asit madeni drenaj (Tibet, China)

%40 ve %60 oranlarında dentürant içeren %8 poliakrilamid jelde 341F(GC) ve 907R primer çifti ile amplifiye edilen GC kuyruklu ürünler yürütülmüştür. DGGE analiz sonucuna göre mikrobiyal komünitenin (K1) *Metallibacterium scheffleri*, *Acidithrix ferrooxidans*, *Uncultured actinobacterium*; (K2) *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidiphilium cryptum*, *Acidiphilium sp.*, *Metallibacterium scheffleri*, *Rhodovastum atsumiense*, *Acidiphilium rubrum*; (K3) *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidiphilium sp.*, *Metallibacterium scheffleri*; (K4) *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidiphilium rubrum*, *Acidiphilium sp.*, (K5) *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidiphilium cryptum*, *Acidiphilium sp.*; (K6) *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidiphilium rubrum*, *Metallibacterium scheffleri*; (K7) *Metallibacterium scheffleri*, *Acidiphilium rubrum*, *Acidithiobacillus ferrivorans* türlerinde bakterilerden oluştuğu belirlenmiştir.

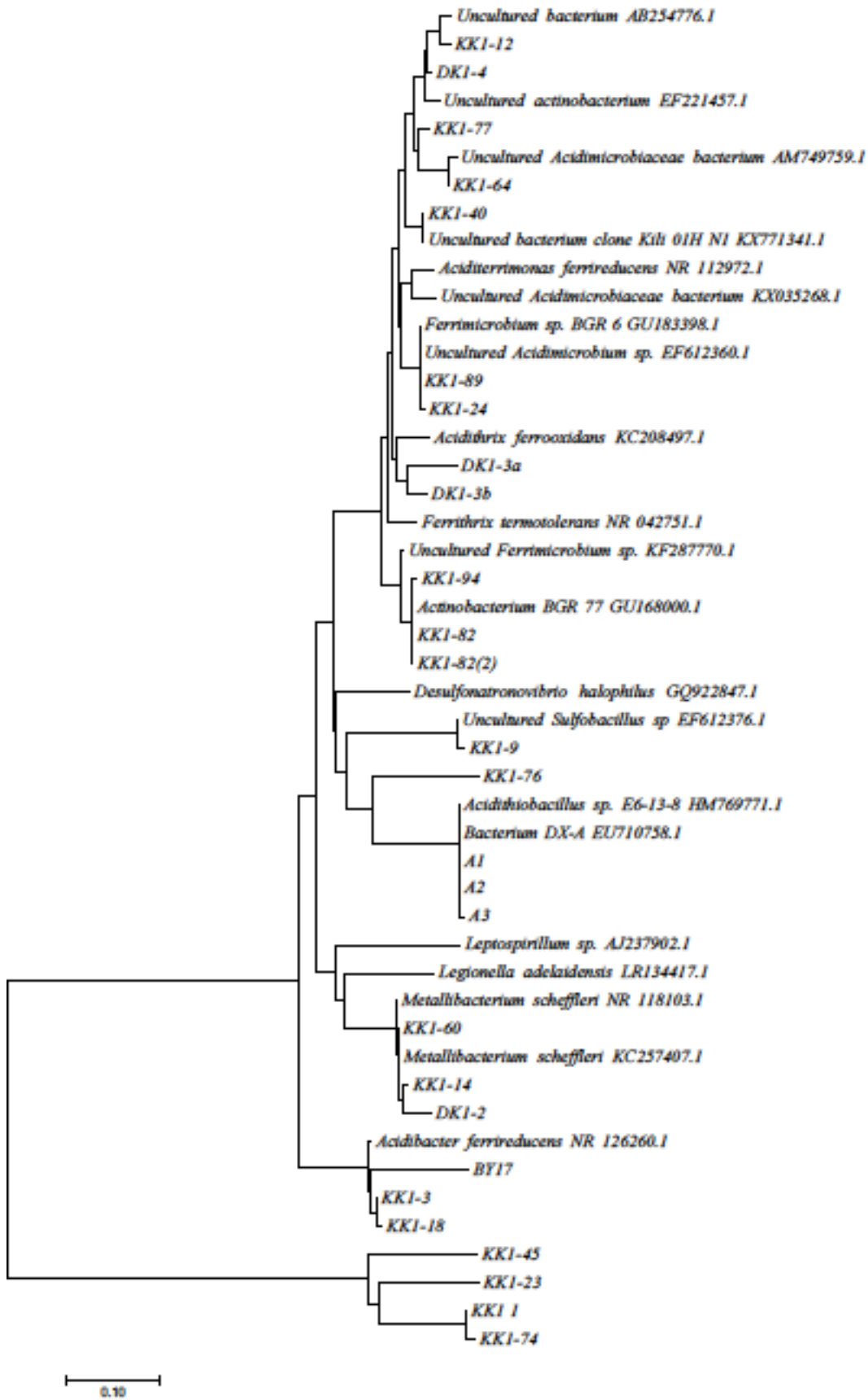
Sezonsal analiz yapılacak tek örnek K1'dir. Bahar sezonuna göre sonbahar ve kış mevsimlerinde *Acidiphilium* ve *Acidithiobacillus* cins sınıfında mikroorganizmalar belirlenmiştir. Sonbahar ve kış mevsiminde ise kendi arasında farklılık gözlenmemiştir.

DGGE analizi ile çeşitlilik belirlenen diğer çalışmalar incelenmiştir, Gonzalez-Toril ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışmada; Bakteri ve Arke domainleri için 341F(GC)-907R ve 344F (GC)-915R primer çiftlerini kullanarak DGGE PCR ürünlerini amplifiye etmiştir. DGGE analiz sonucunda bakteri domaininde *Leptospirillum spp.*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidiphilium spp.*, *Ferrimicrobium acidiphilum*, türlerini belirlemişken; Arke domaininde ise *Ferroplasma acidiphilum*, ve *Thermoplasma acidophilum* türlerini belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada, bu tez çalışmasından farklı olarak Arke domaininde mikroorganizmalar tespit etmişlerdir.

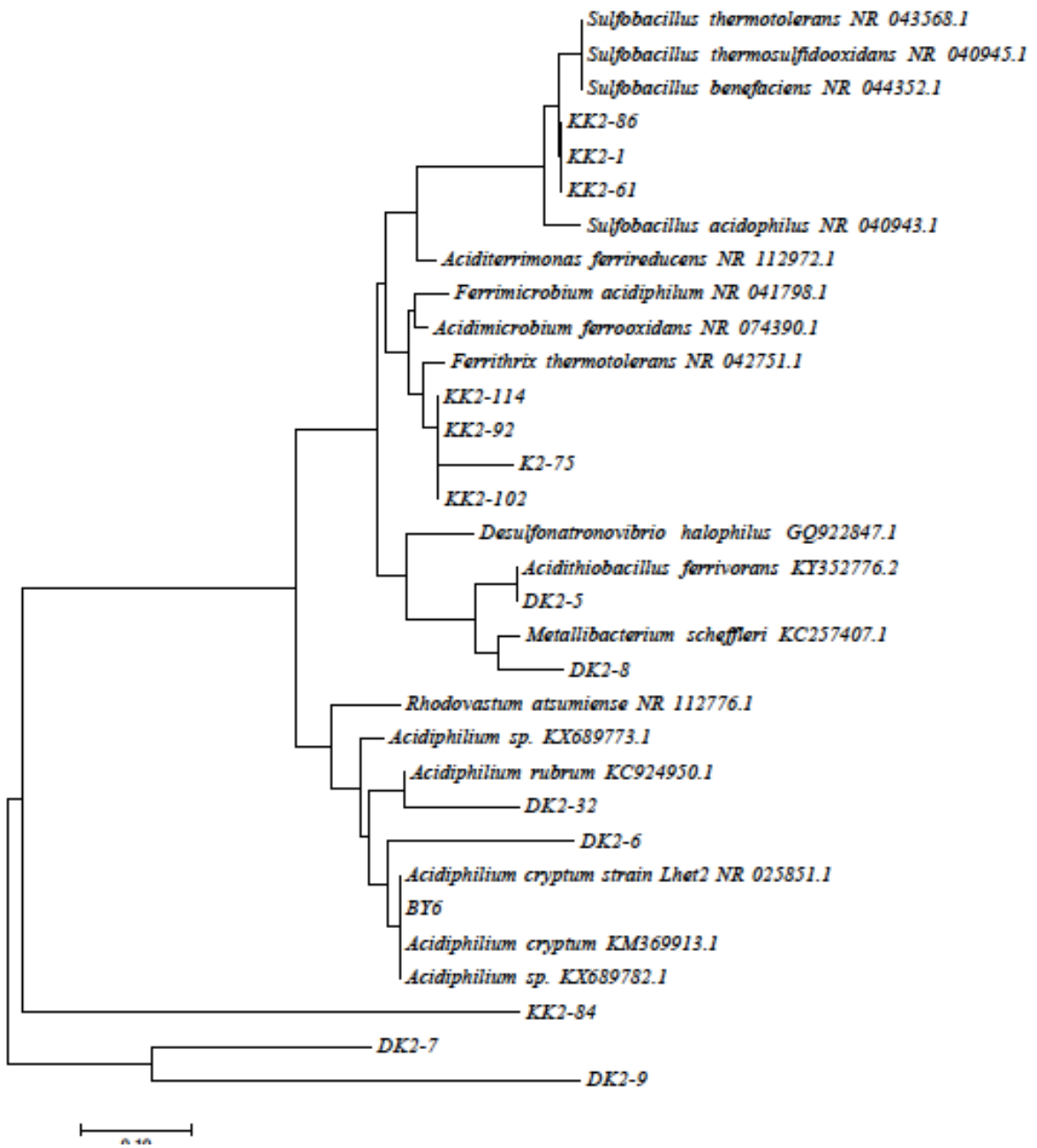
Diğer bir çalışmada Morales vd., (2005) tarafından demirce zengin sülfürlü atık sudan örnek alınmış ve kolon biyoreaktörde 16 ay boyunca inkübe edilmiştir. 12 tekrar besleme yapılarak numune toplanmıştır. DGGE analizi için örnekler %20-%80 ve %45-%80 konsantrasyonlarında denatüre gradiyenti sahip jelde yürütülmüştür. Konsorsiyumun DGGE analizinin *Pseudoxanthomonas*, *Dechlorosoma*, *Desulfovibrio*, *Agrobacterium Methylocapsa*, *Rhodococcus*, *Sulfobacillus* cinsi mikroorganizmalarda oluştuğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada bir alanın değil reaktör içinde asidofil çeşitliliğinin besleme ile nasıl değiştiği incelenmiştir.

Mikrobiyal komünite belirleme çalışmalarından bir diğerinde, Nicomrat vd. (2008) asid maden drenajından örnek almış ve DGGE analizi için %30-%70 oranında denatürant içeren %8'lik poliakrilamid jel hazırlamışlardır. Yakın olan bantları ayırmak içinse sonrasında %6'lık poliakrilamid jelde %40-%65 denatürant gradiyenti kullanılmışlardır. Analiz sonucunda *A. ferrooxidans* TRA3-20, *Arsenite-oxidizing bacterium* BEN-4, *Alcaligenes* sp., *Bordetella* sp., *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *Arsenite-oxidizing bacterium* BEN-4, *A. ferrooxidans* türleri tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada iki farklı jel konsantrasyonu denenmiş ve ayırım gücü artırılarak bantların ayrılması sağlanmıştır.

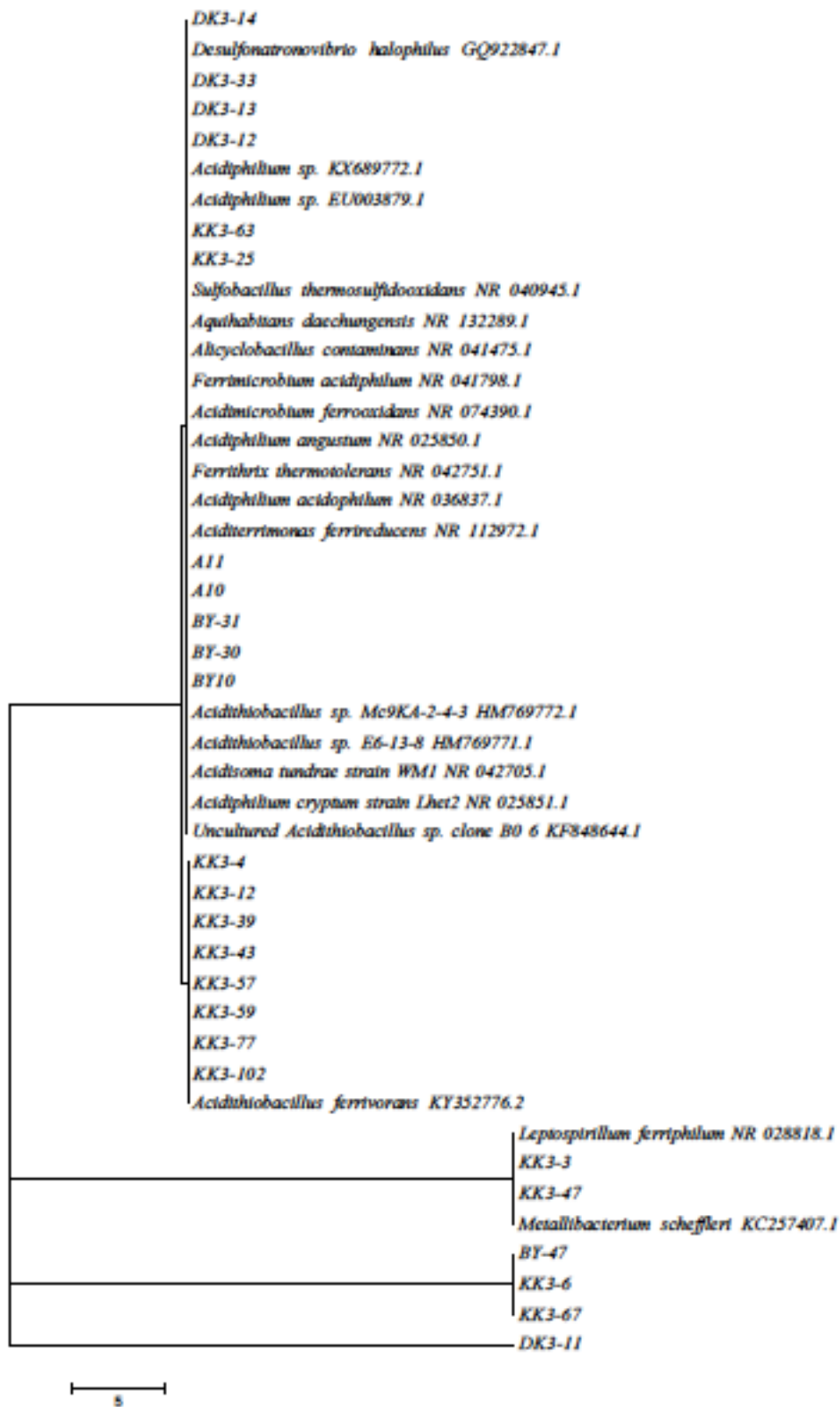
İzolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen izolatların dizileri, klon ve DGGE analiz sonucunda elde edilen eşleşmelere ait diziler filogenetik ağaç çiziminde girdi olarak kullanılmıştır. MEGA7 (Kumar vd., 2016) kullanılarak Neighbor Joining algoritmasına filogenetik ağaç çizilmiştir. Her bir örneklem alanı için kültüre bağlı ve kültürden bağımsız çalışmaların sonuçlarının yer aldığı filogenetik ağaçlar sırayla Şekil 4. 79 ve Şekil 4.85 arasında verilmiştir. Ağaç oluşturulurken dış tür olarak *Desulfonatronovibrio halophilus* (GQ922847.1)/ *Methylobacter lovis* (L20839) kullanılmıştır. Filogenetik ağaçta tek kökenden çıkarak dallanmalar oluşturulmaktadır. Tanımlanan türlerin, evrimsel olarak birbirlerine uzaklıkları bulunmuştur. En fazla çeşitliliğe sahip olan K1 örneklem alanı filogenetik ağaçta da en fazla dallanmaları göstermiştir.



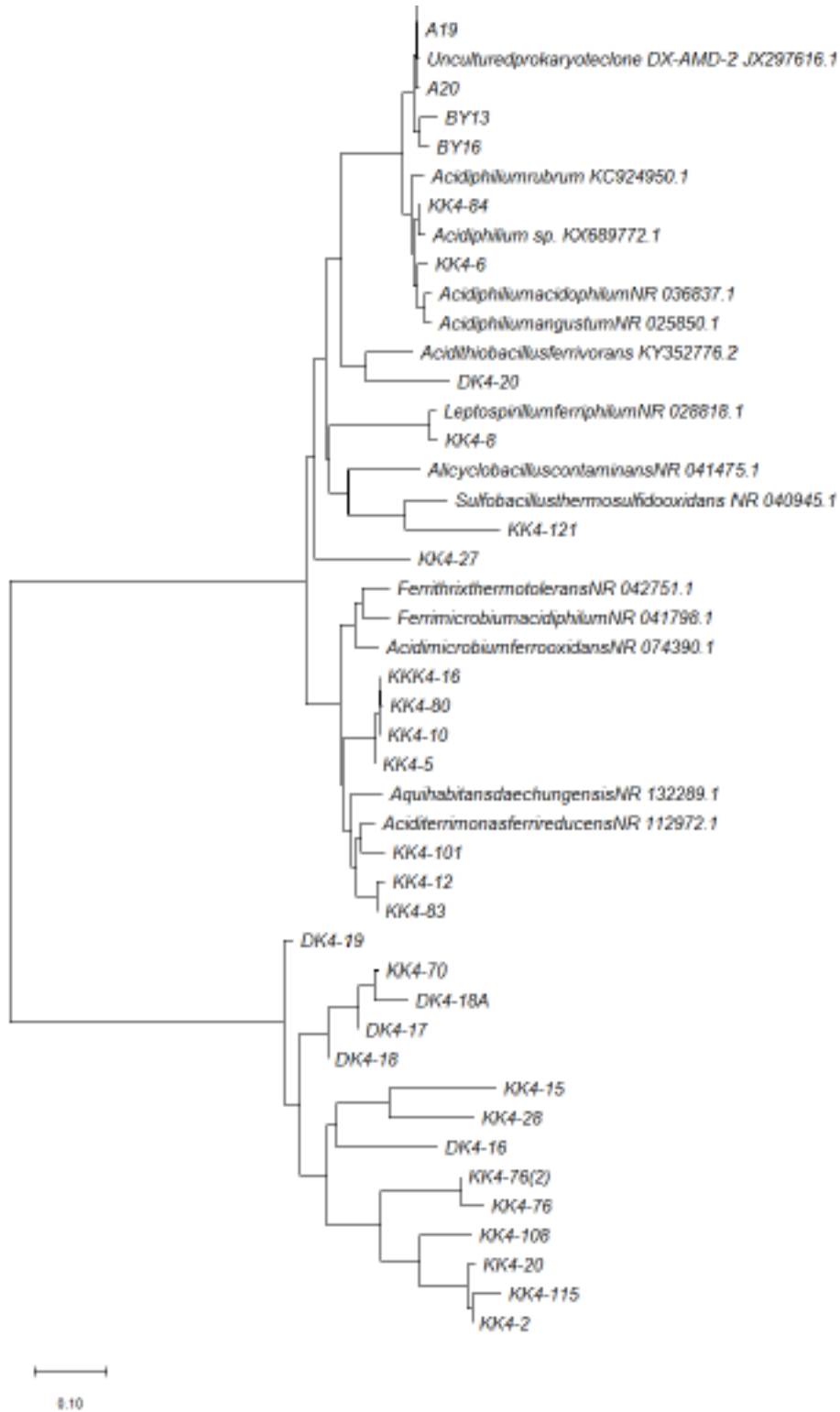
Şekil 4. 79. K1 örneklem yerinin filogenetik analizi



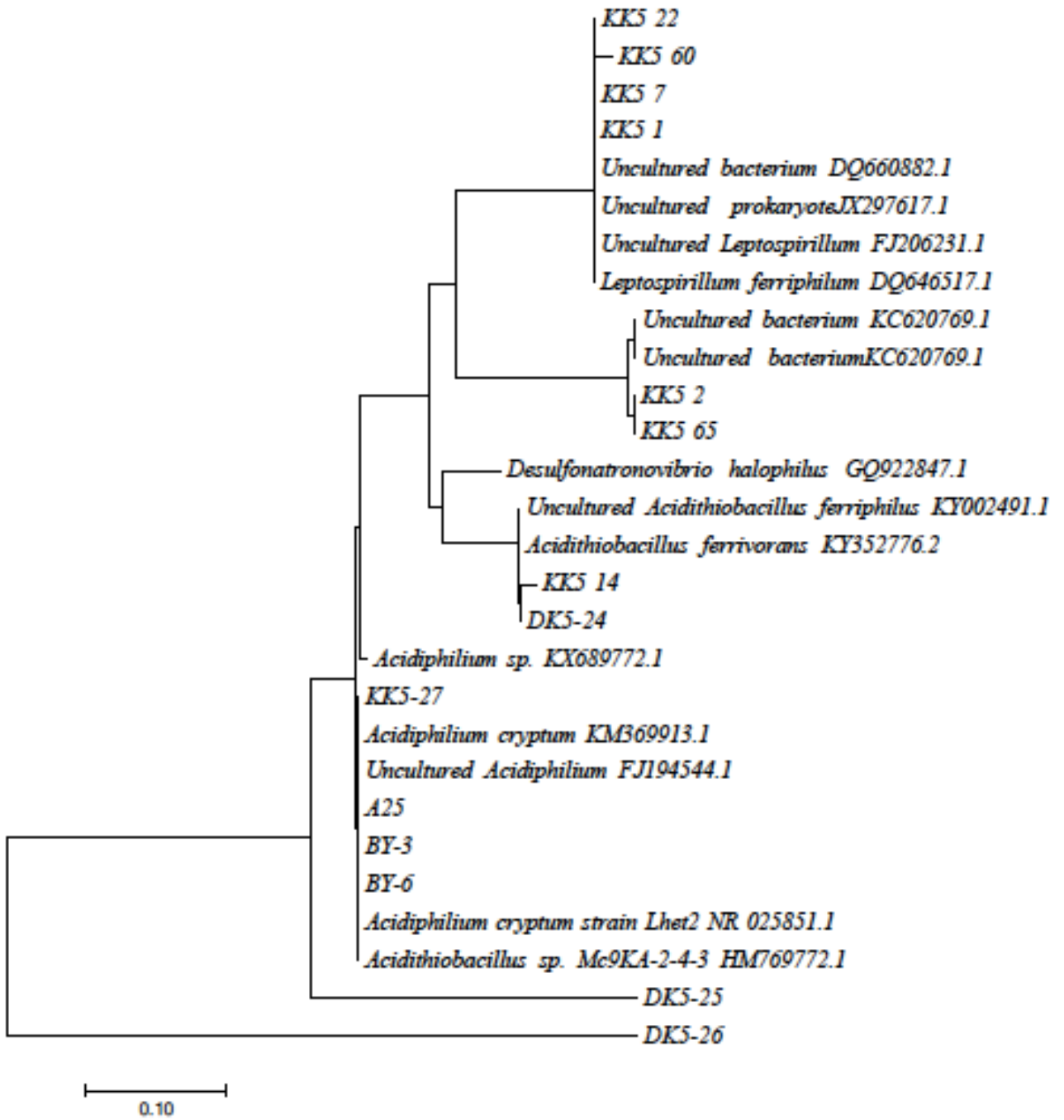
Şekil 4. 80. K2 örneklem yerinin filogenetik analizi



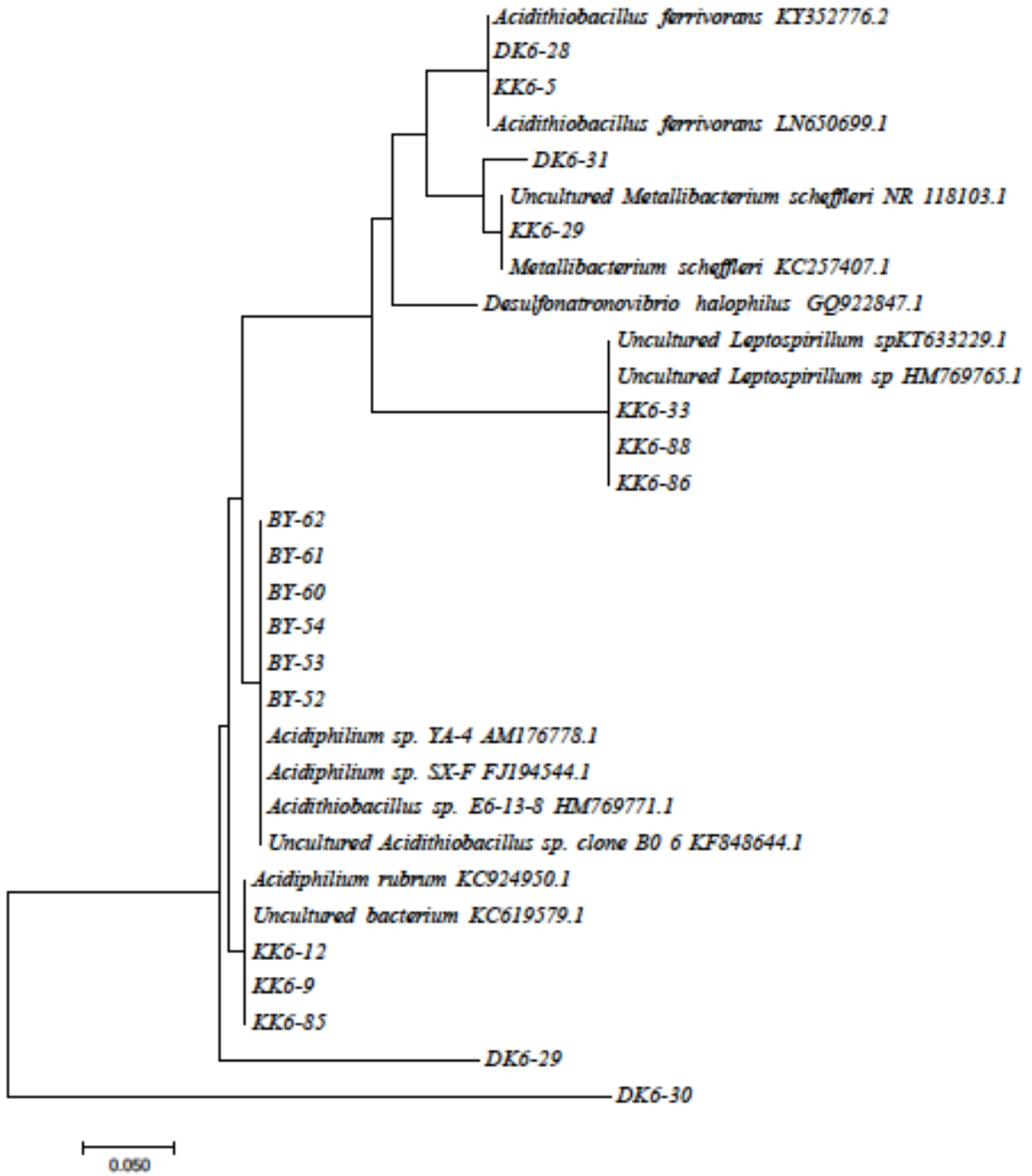
Şekil 4. 81. K3 örneklem yerinin filogenetik analizi



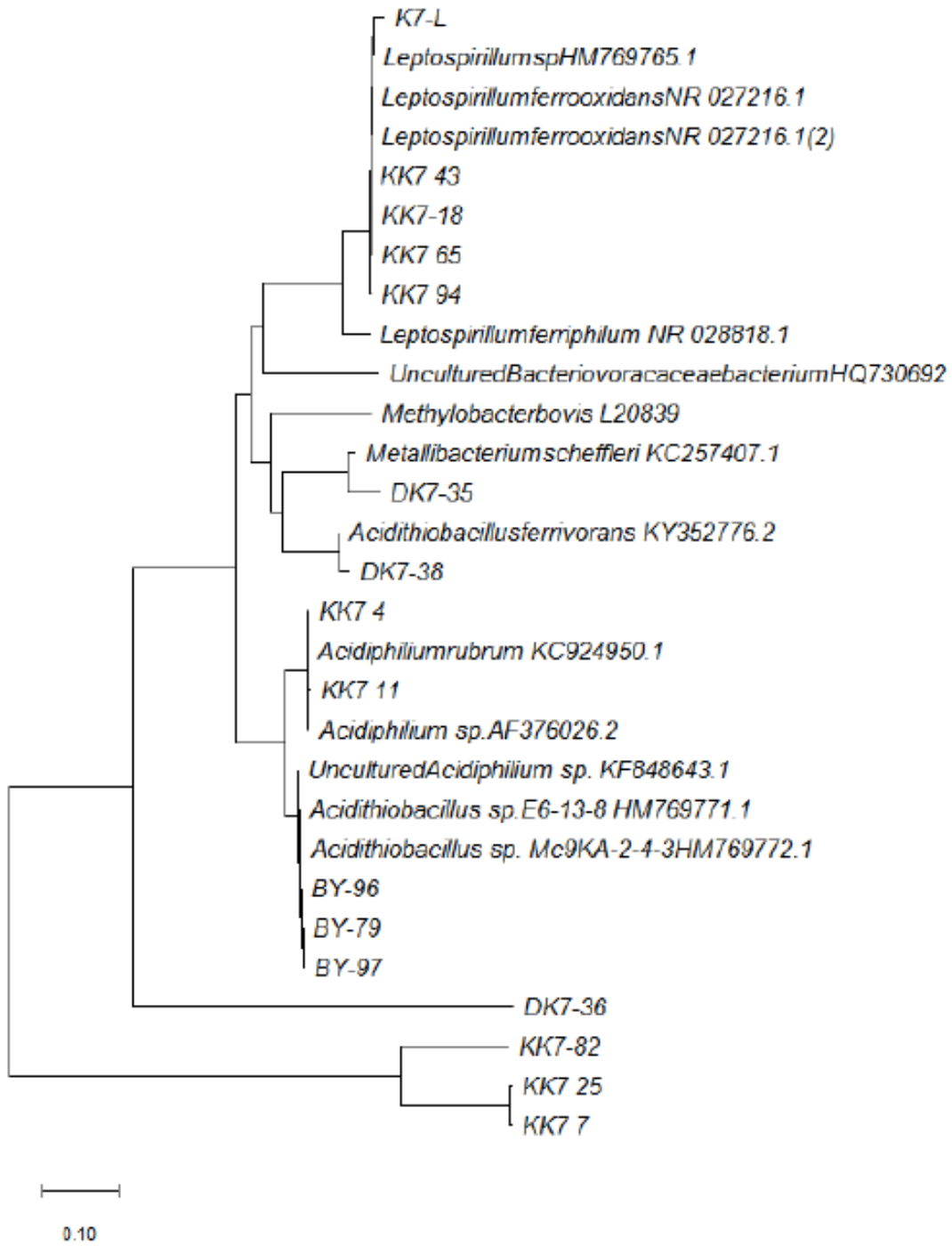
Şekil 4. 82 K4 örneklem alanının filogenetik analizi



Şekil 4. 83. K5 örneklem alanının filogenetik analizi



Şekil 4. 84 K6 örneklem alanının filogenetik analizi



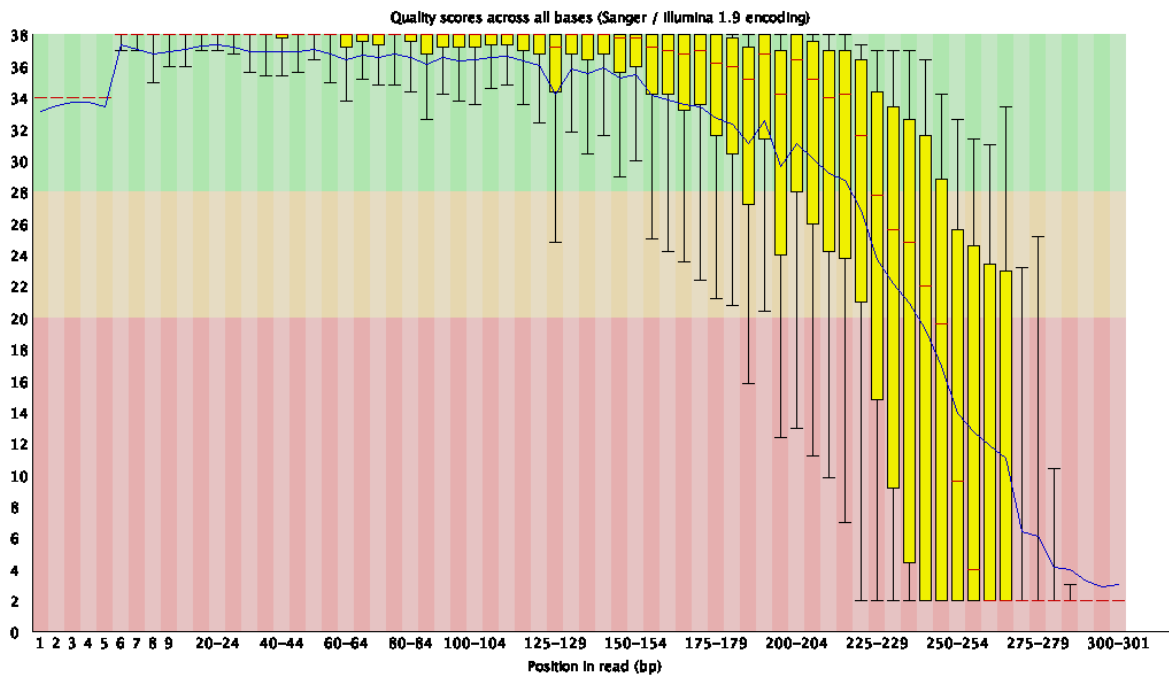
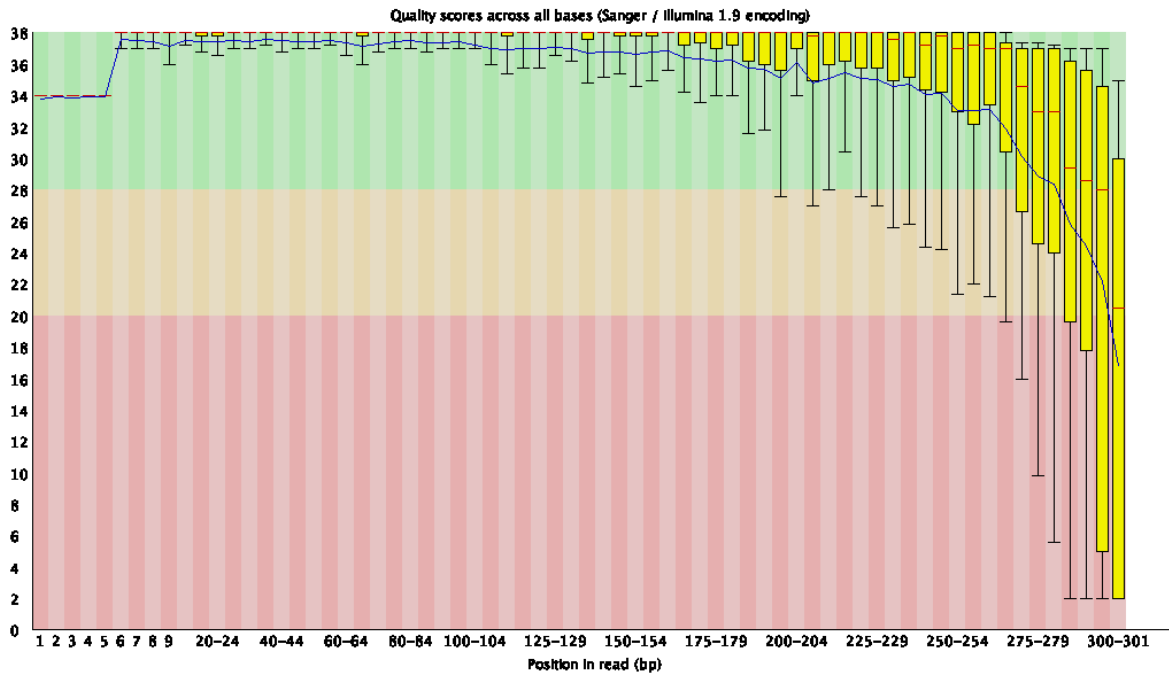
Şekil 4. 85. K7 örnekleme alanının filogenetik analizi

4.3.4. Metagenomik analiz

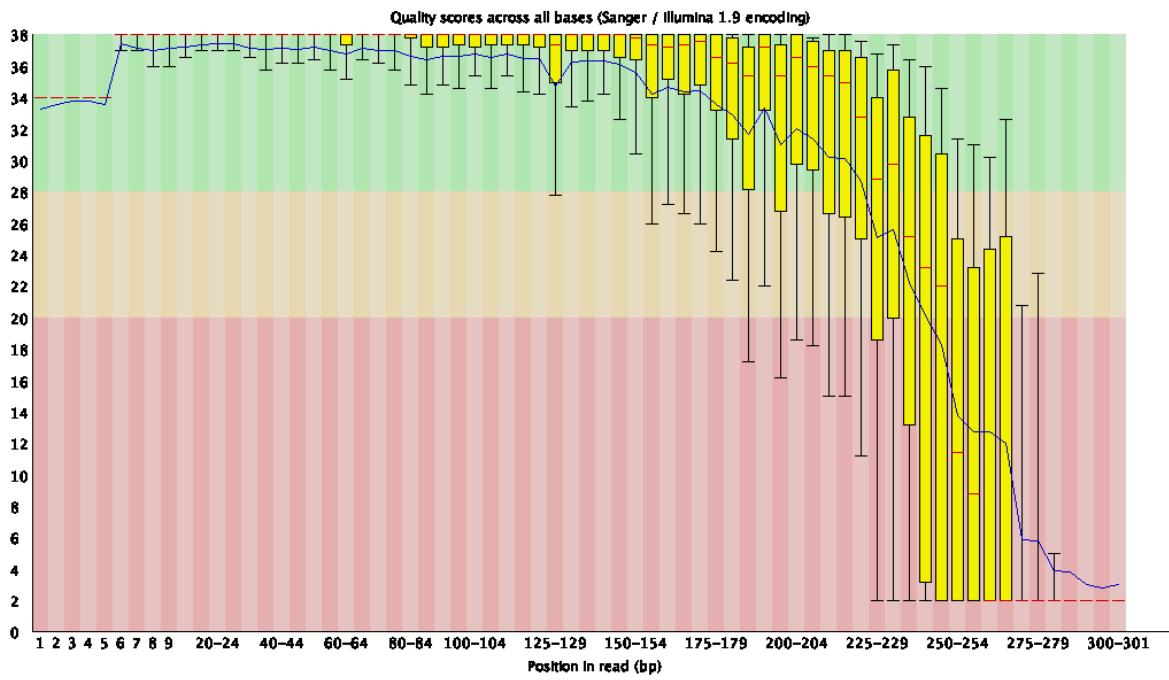
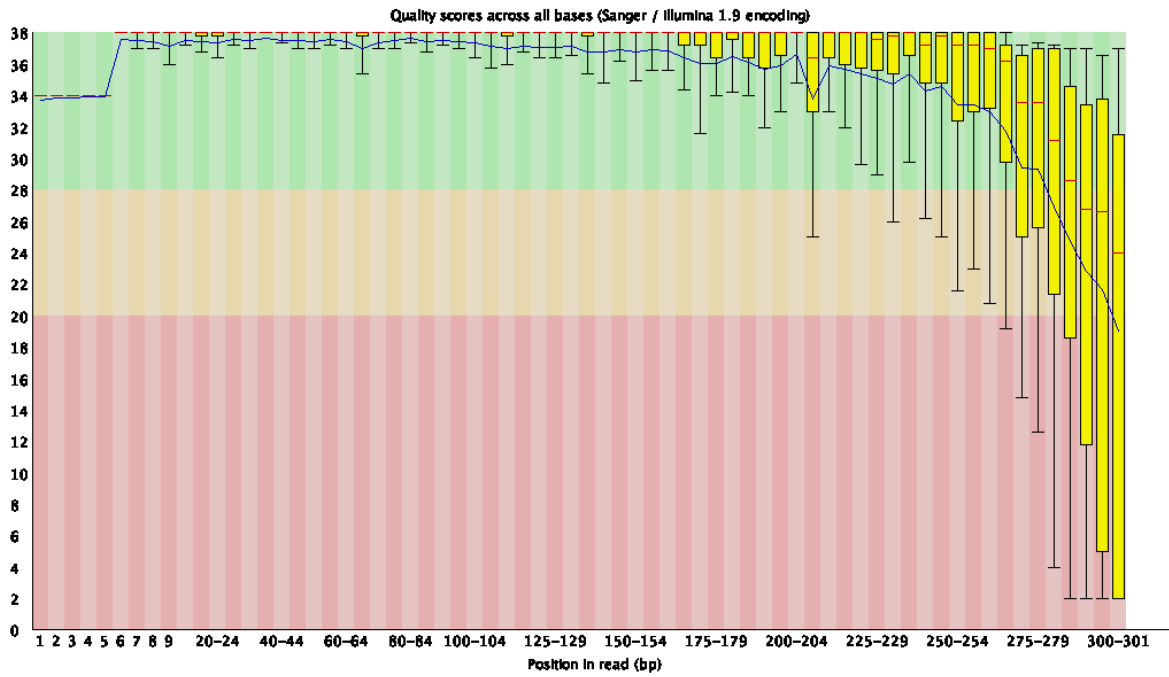
Birinci örneklem yerine ait üç sezon örneklem alanı (K1, K6 ve K7) ve birinci sezonda yer alan 4 örneklem alanının (K2, K3, K4, K5) çevresel DNA'larının Illumina Miseq 16S Amplikon dizileme sonuçları iki grup halinde ayrı yorumlanmıştır.

Biyoinformatik analiz Qiime2 (2019.4 versiyonu, <https://qiime2.org>) ile yapılmıştır. Örneklerin isim, barkod dizilerinin, primer dizilerinin, treatment ve description başlıkları ile ilgili bilgilerini içeren metadata dosyaları hazırlanmıştır. Sekanslama tamamlandıktan sonra elde edilen fastq dosyalarının kontrolü FASTQC ile yapılmıştır. FASTQC dosyaları sırasıyla Şekil 4.86 ve Şekil 4.92 arasındaki şekillerde verilmiştir. Kesimler y ekseninde yer alan Fred skorun 20 değerinin altında kalan ilk çizgi itibariyle yapılmıştır. FASTQC analizinden sonra elde edilen ham verilerin yer aldığı dosyalar QIIME 2 programına aktarılmıştır. Hataların ya da kimelerin uzaklaştırılması için hem kesim hem de birleştirme yapan DADA algoritması kullanılmıştır. Çift yönlü okumaların birleştiğinden emin olmak için kesim yapılırken birleşme bölgesinin en az 50 bp'lik kısmının üstüste gelmesi önerilmektedir. Bu yüzden QIIME 2 ile kesim yapılırken bu ayrıntıya dikkat edilmiştir. Birinci sezondaki 4 örnek için ileri okuma için kesim yapılmaksızın, geri okumalarda son 50 bp lik bölge çıkarılmıştır. Aynı şekilde primer dizilerinin de kirliliğini uzaklaştırmak için 18 bp uzunluğundaki primer ileri okumadan, geri okumadan ise 22 bp çıkarılmıştır. Benzer şekilde birinci örneklem alanının 3 sezon örneklerinin ileri okumasından 20 bp kesilirken; geri okumalarda son 60 bp lik bölge çıkarılmıştır. Primer kirliliğini önlemek için ileri okumadan 18 bp ve geri okumadan ise 22 bp çıkarılmıştır.

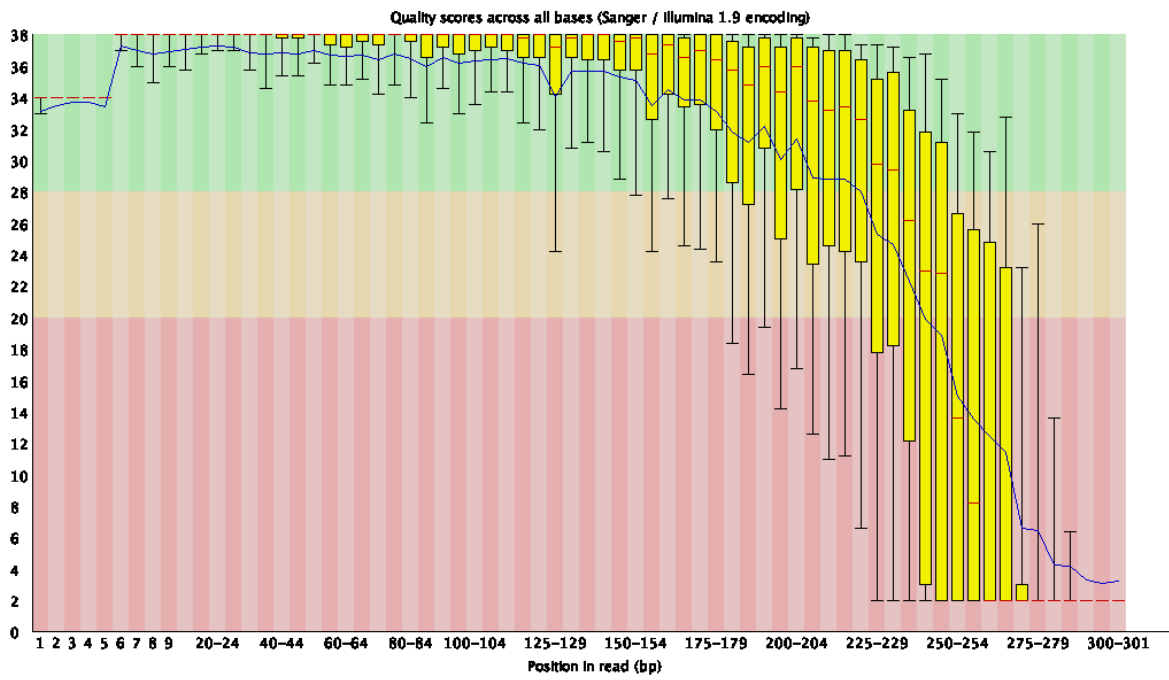
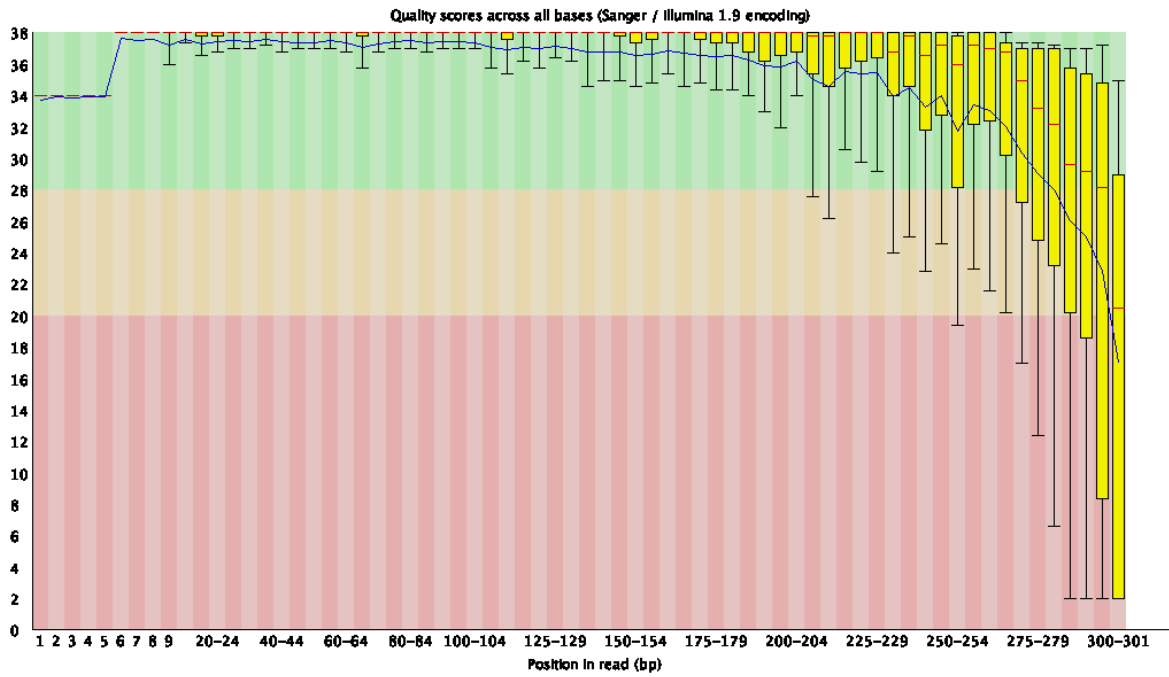
Birinci su örneğinin 3 sezonu için okunan dizi sayısı 471989 diziden 146463 diziye düşmüştür. Birinci sezondaki diğer su örnekleri içinse 678939 diziden 221519 diziye düşmüştür.



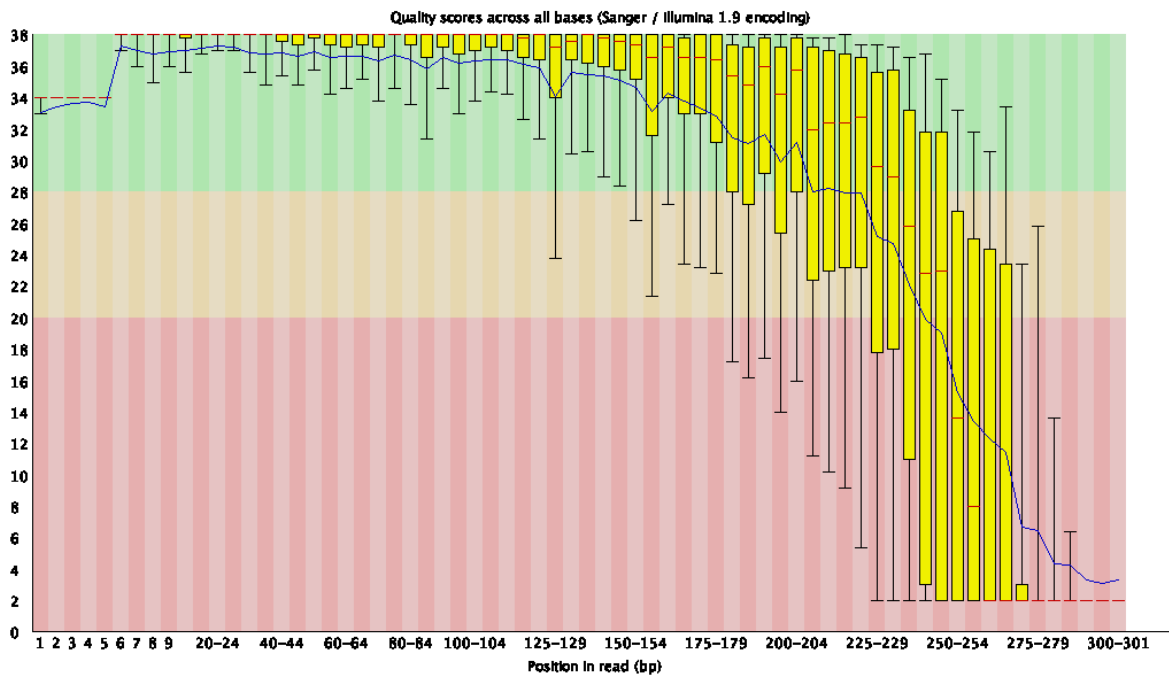
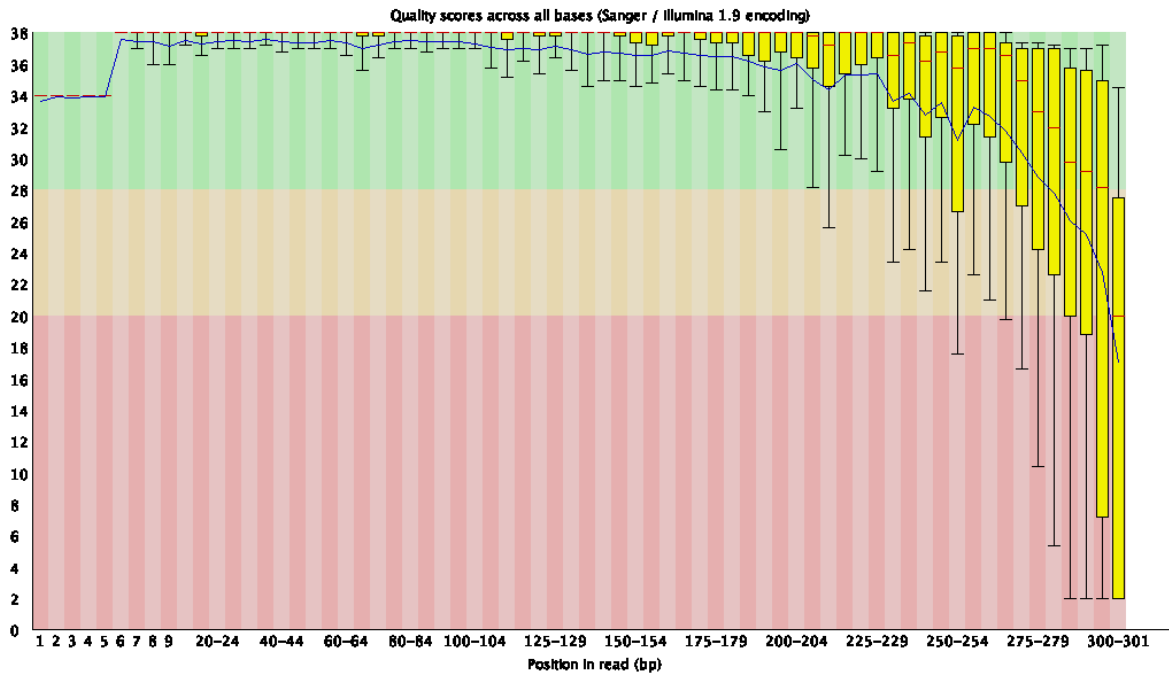
Şekil 4.86. K1 örneklem alanının FASTQC analizi



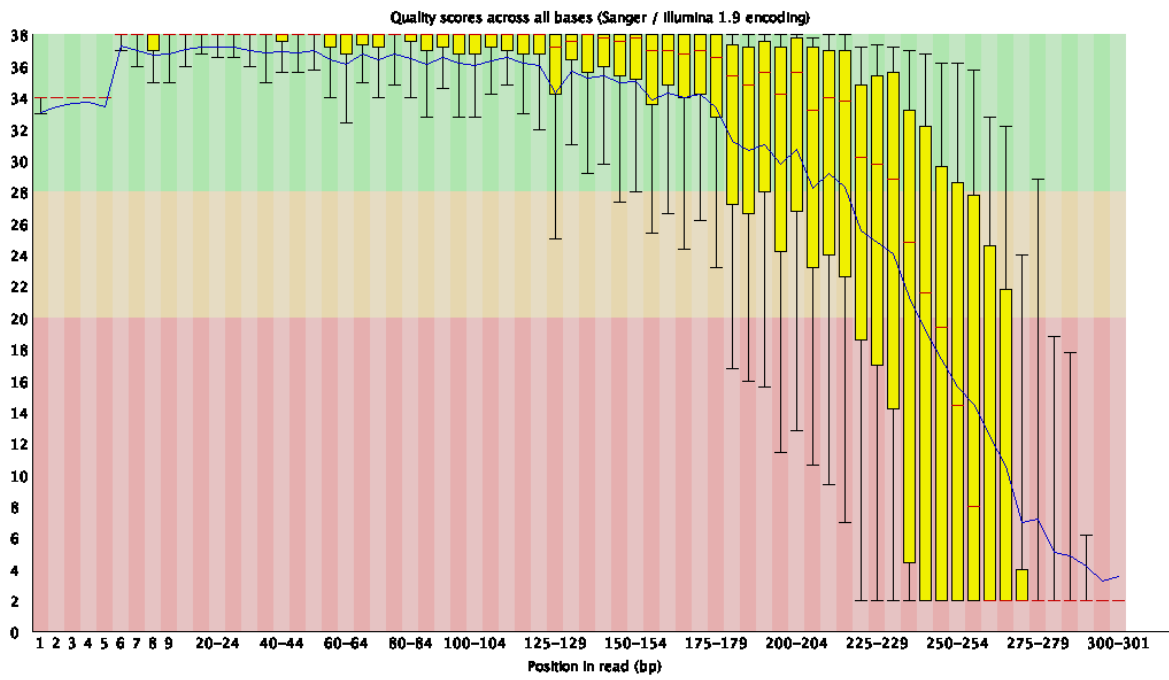
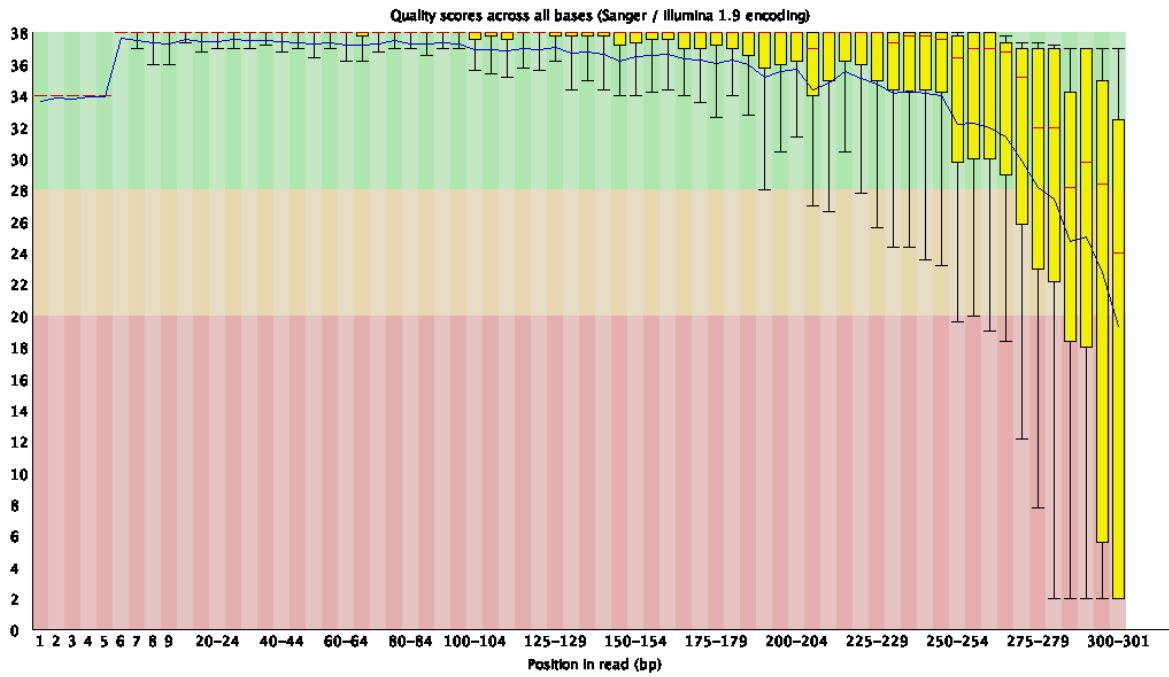
Şekil 4.87. K2 örneklem alanının FASTQC analizi



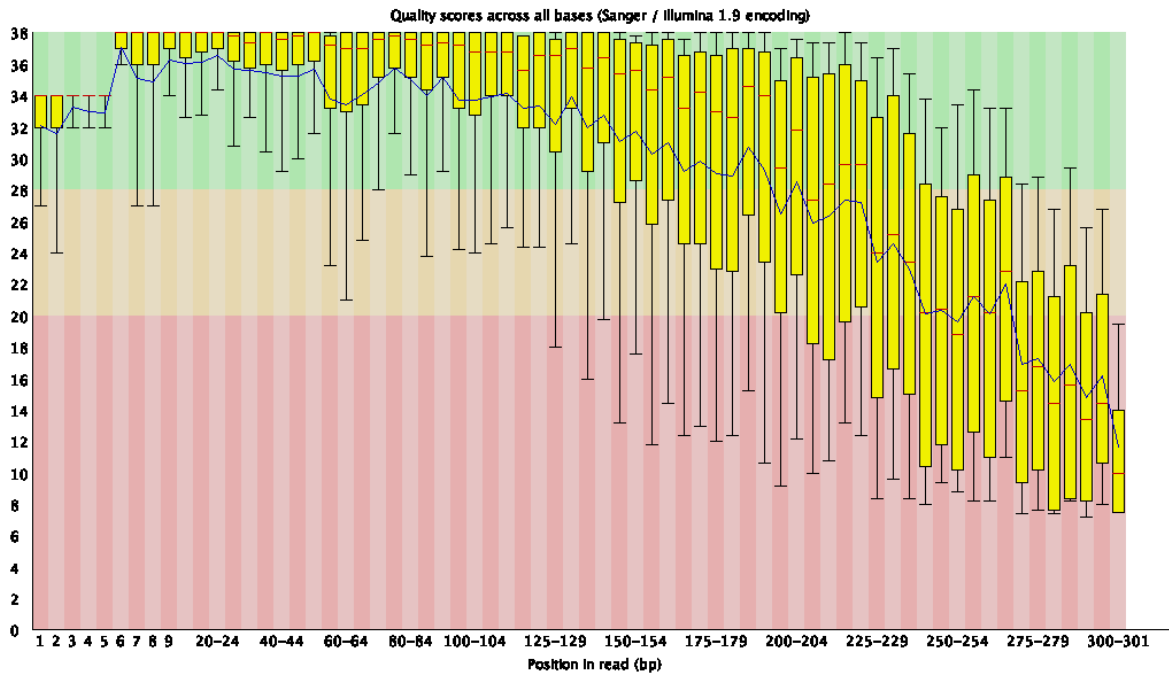
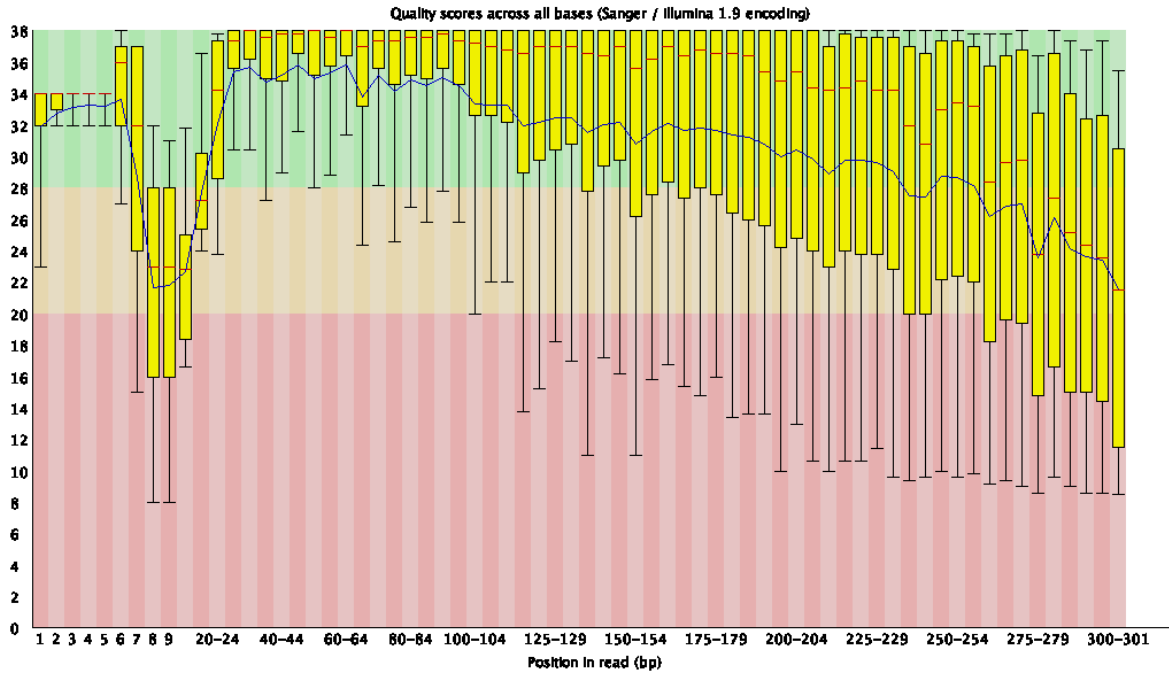
Şekil 4.88. K3 örneklem alanının FASTQC analizi



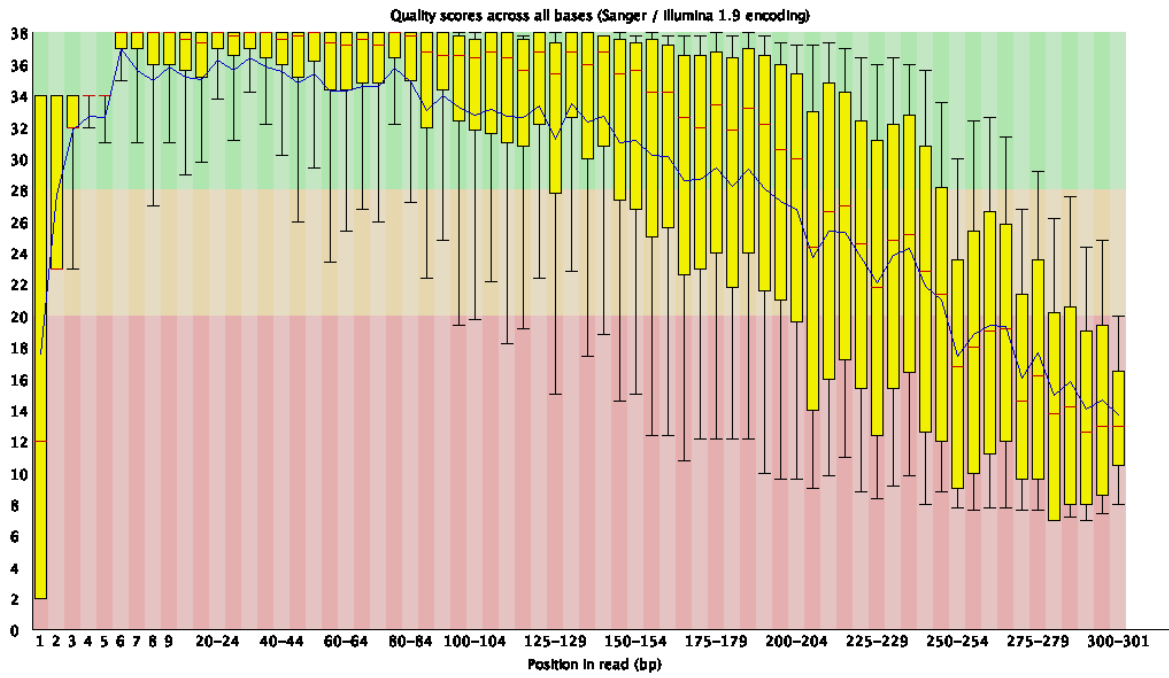
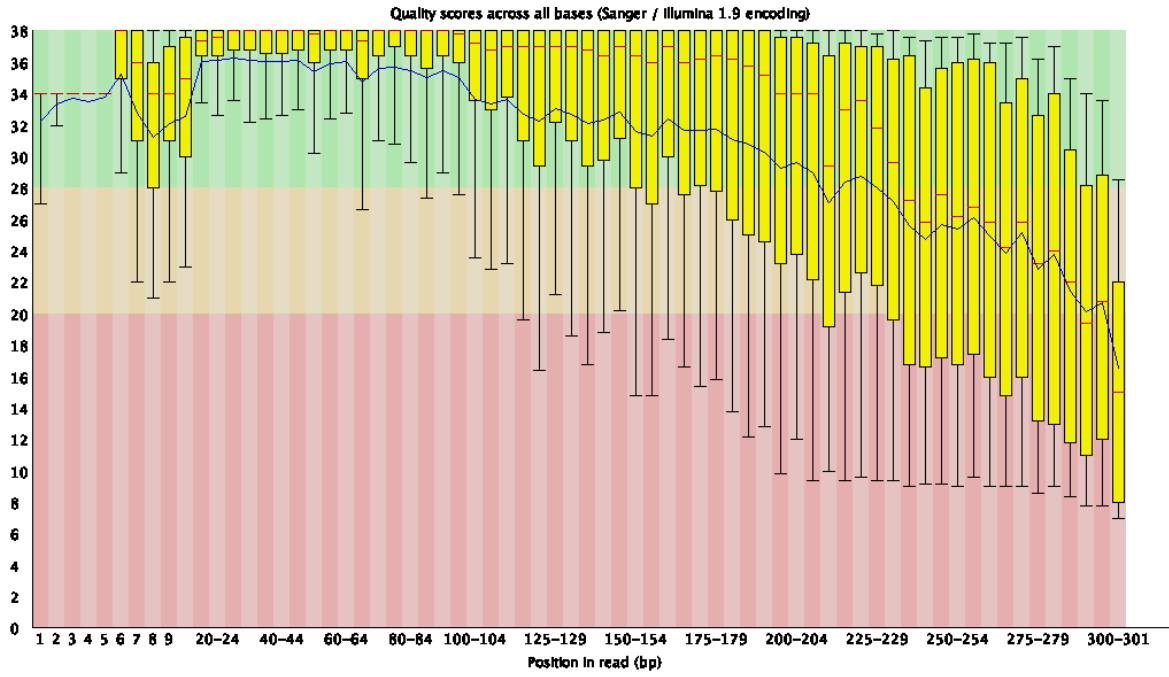
Şekil 4.89. K4 örneklem alanının FASTQC analizi



Şekil 4.90. K5 örneklem alanının FASTQC analizi

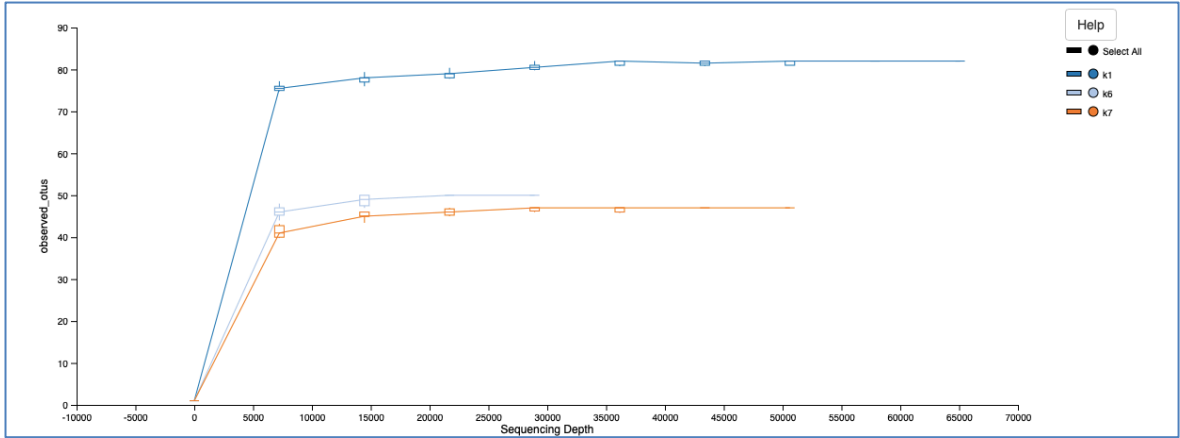


Şekil 4.91. K6 örneklem alanı FASTQC analizi

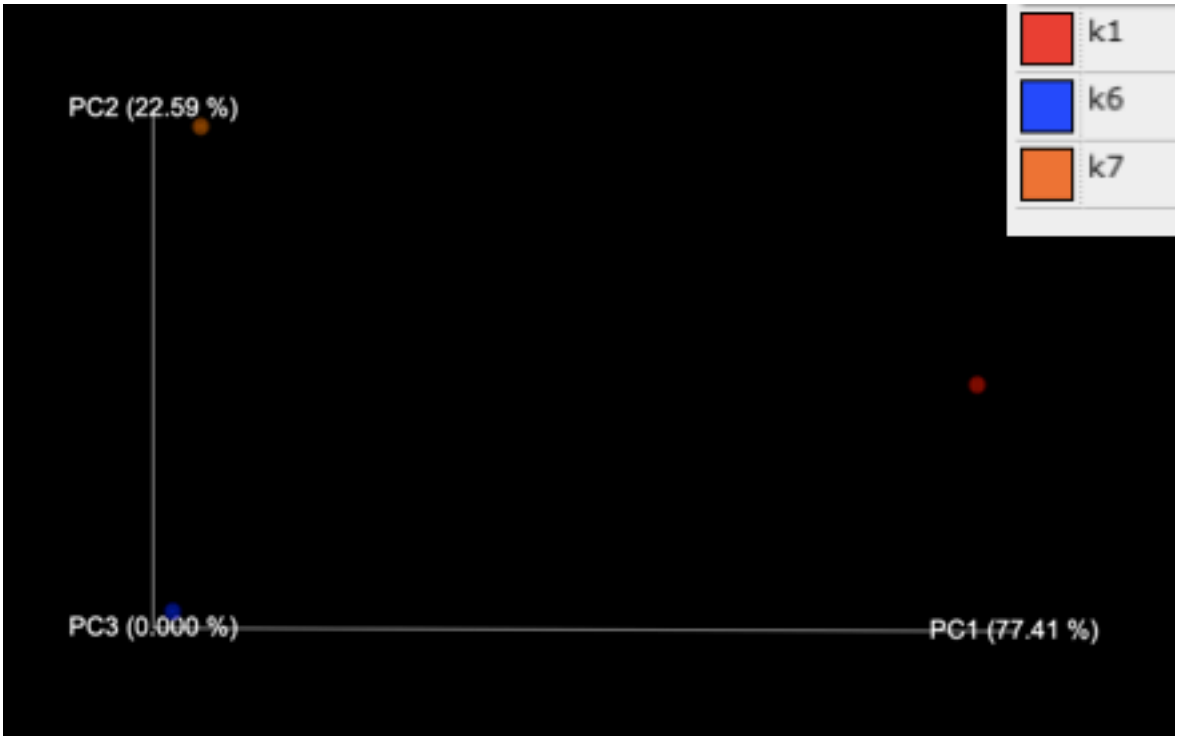


Şekil 4.92. K7 örneklem alanının FASTQC analizi

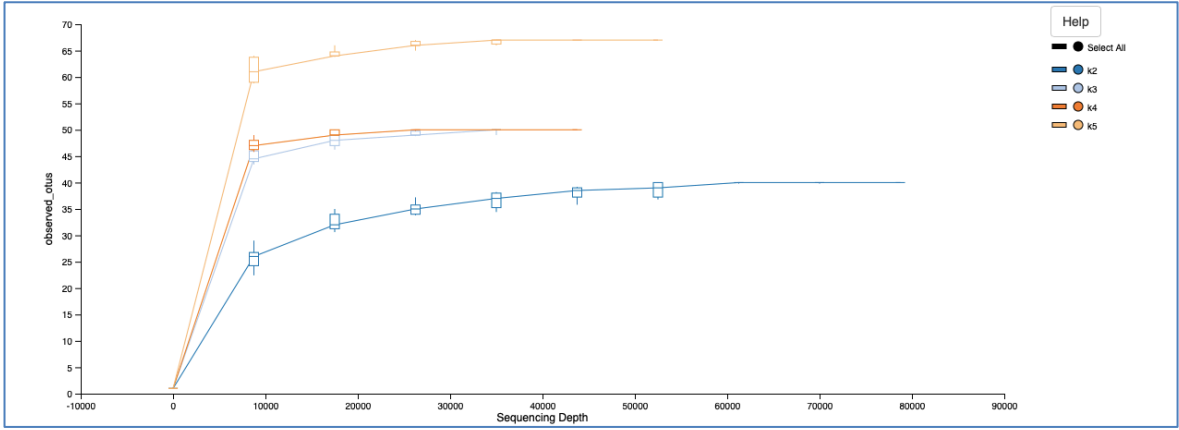
Alfa ve Beta çeşitliliğin oluşturulması için DADA komutu ile elde edilen tablo kullanılmıştır. Elde edilen alfa (örneklerin okuma sayılarının birbirine ile karşılaştırılması) ve beta (örneklerin kendi içinde birbirine benzerlikleri) çeşitlilikler sırasıyla birinci örneklem alanının üç sezonu ve birinci sezondaki dört su örneği için Şekil 4.93, Şekil 4.94, Şekil 4.95 ve Şekil 4.96'da verilmiştir.



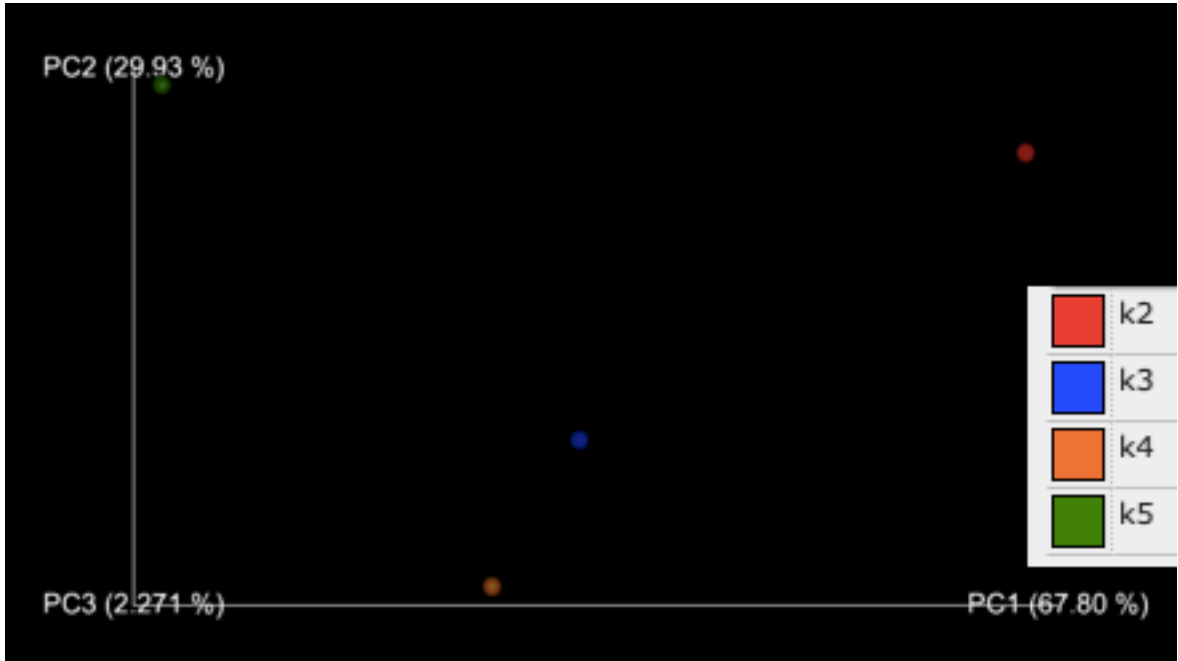
Şekil 4.93. K1, K6 ve K7 örnek alanının alfa çeşitliliği



Şekil 4.94. K1, K6 ve K7 örnek alanının beta çeşitliliği



Şekil 4.95. K2, K3, K4 ve K5 sularının alfa çeşitliliği

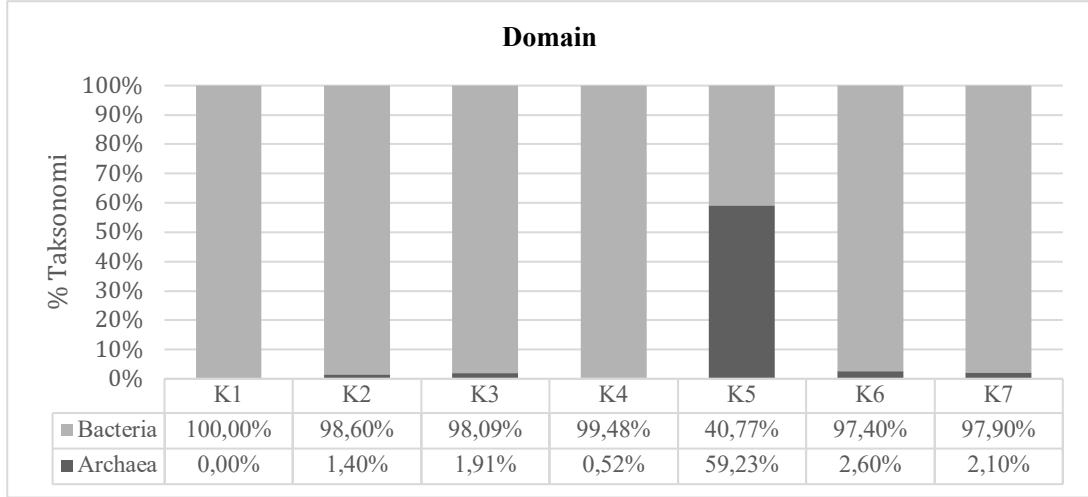


Şekil 4.96. K2, K3, K4 ve K5 sularının beta çeşitliliği

“close reference” komutuyla OTU kümeleri oluşturulmuştur ve kümelere elde edilirken NCBI veritabanı kullanılmıştır. OTUlardan oluşturulan taxa sütun grafiklerine göre domain, şube ve cins seviyesinde tanımlamaları yapılmıştır.

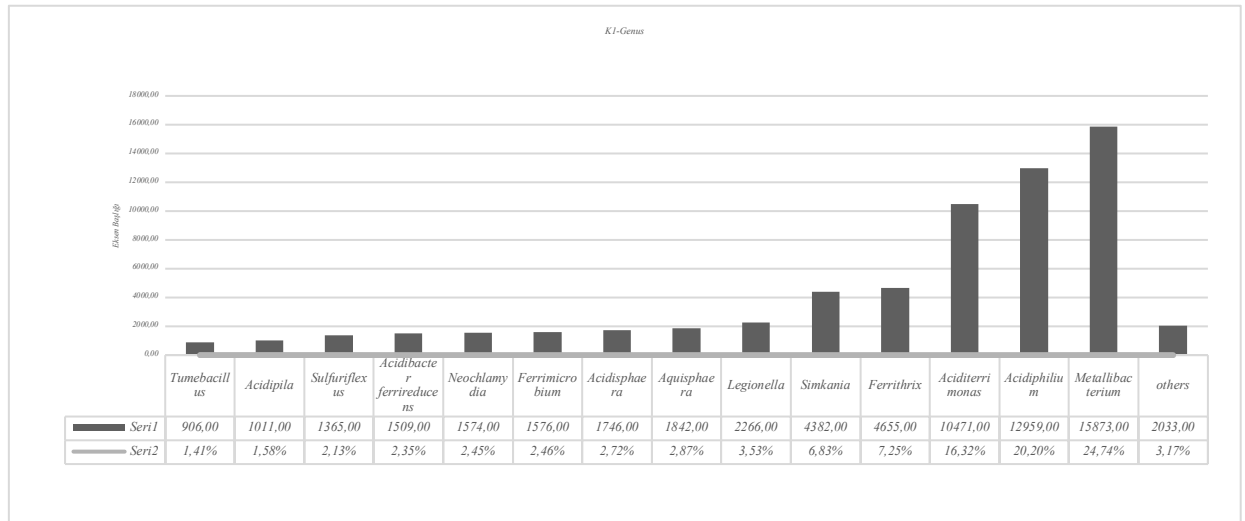
Şekil 4.97’de verilen domaine göre elde edilen grafikte arke domaininde temsiliçi olan örneklem alanı %59 oranında K5’dir. Diğer örneklem alanlarında ise %2 ve altında arke domaini bulunmaktadır. Bakteri domaininde K1 örneklem alanında %100 oranında, K2 örneklem alanında %98, K3 su örneklem alanında %98, K2 su örneklem alanında %99, K5

örneklem alanında %40, K6 örneklem alanında %97 ve K7 örneklem alanında ise %97 oranında temsilci bulunmaktadır.



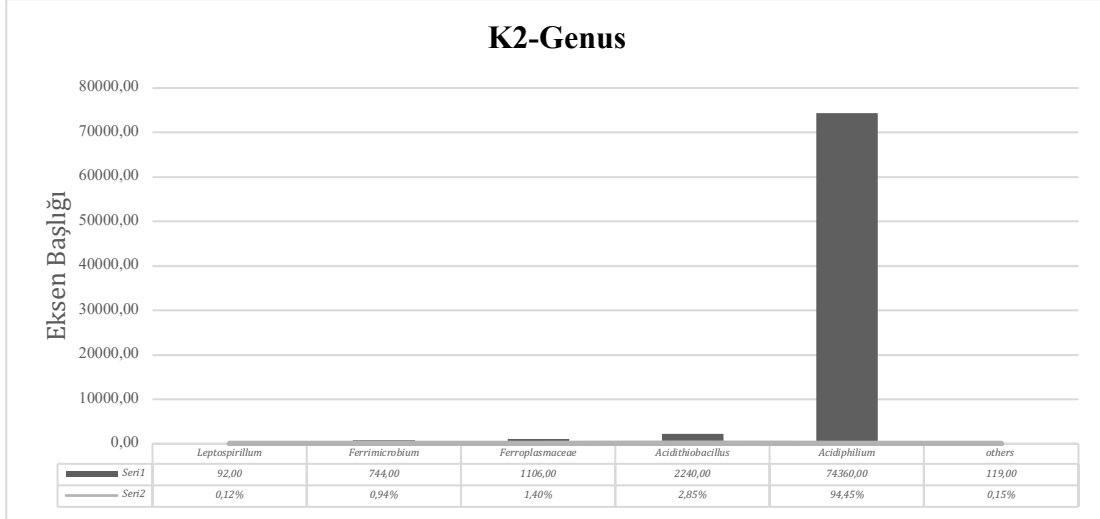
Şekil 4.97. 3 sezon örneklerinin Bakteri ve Arke domainindeki temsilcileri (16S Amplikon)

K1 örneklem alanında bakteri domainindeki cinsler tanımlanmış ve Şekil 4.98’de verilmiştir. %5’in altında temsilcisi olan cinsler *Tumebacillus*, *Acidipila*, *Sulfiriflexus*, *Acidibacter ferrireducens*, *Neochlamyda*, *Ferrimicrobium*, *Acidisphaera*, *Aquisphaera*, *Legionella*’dır. %6,83 *Simkania*, %7,25 *Ferrithrix*, %16,32 *Aciditerrimonas*, %20,20 *Acidiphilium*, %24,74 *Metallibacterium* temsilcisi bulunmaktadır.



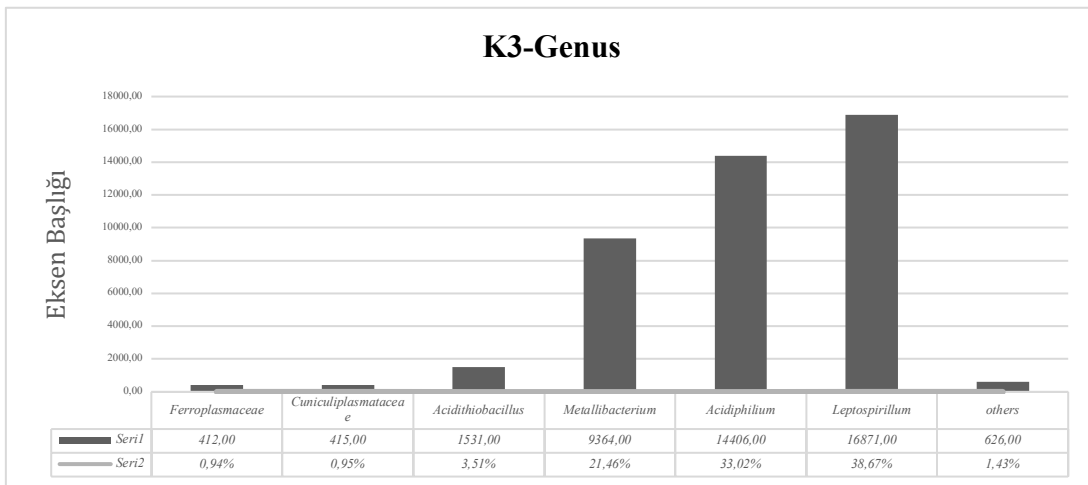
Şekil 4.98. K1 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları
K2 örneklem alanında bakteri domainindeki cins düzeyinde tanımlama yapılmış ve Şekil 4.99’da verilmiştir. %1’in altında temsilcisi olan cinsler *Leptospirillum* ve

Ferrimicrobium 'dur. %5'in altında *Ferroplasma* ve *Acidithiobacillus* temsilcisi bulunmaktadır. Baskın olan cins ise %94,45 temsilcisi bulunan *Acidiphilium*'dur.



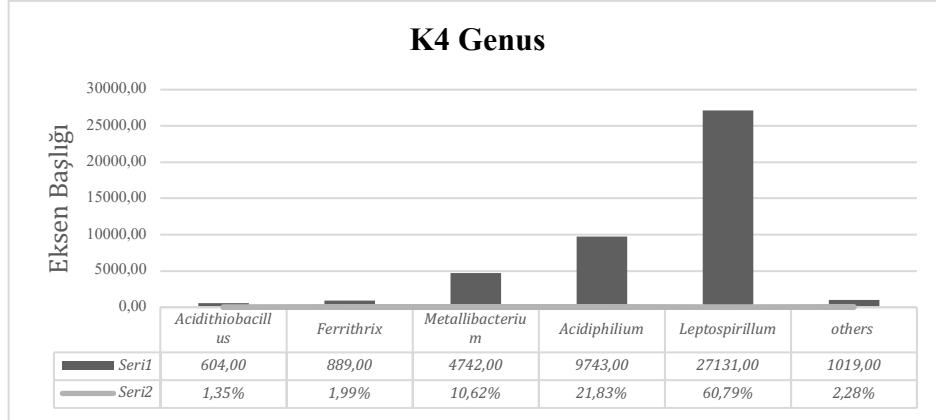
Şekil 4.99. K2 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları

K3 örneklem alanında bakteri domaininde cins düzeyinde temsilcileri tanımlanmış ve Şekil 4.100'de verilmiştir. %1'in altında temsilcisi olan cinsler *Ferroplasma* ve *Cuniculiplasmataceae* 'dur. %5'in altında *Acidithiobacillus* temsilcisi bulunmaktadır. %21,46 oranında temsilcisi bulunan cins *Metallibacterium* 'dur. Bunun yanı sıra %33,02 oranında *Leptospirillum*, %38,67 oranında *Acidiphilium* temsilcisi bulunmaktadır.



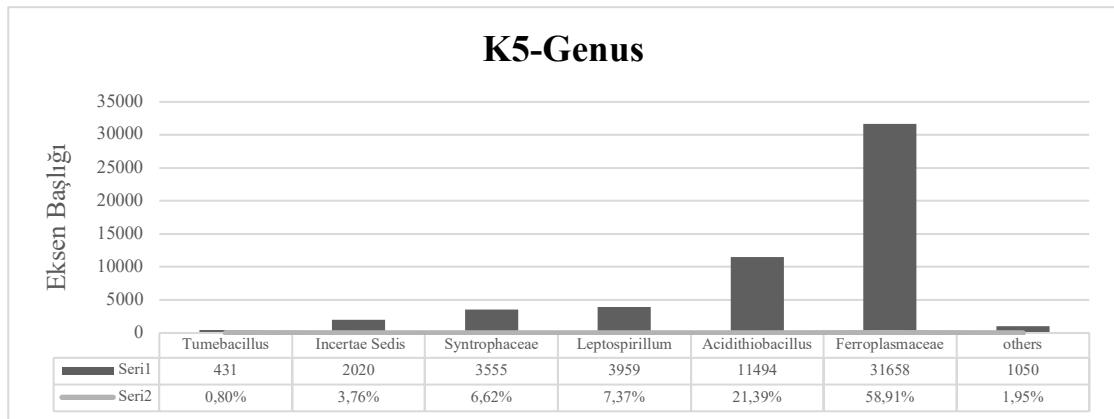
Şekil 4.100. K3 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları

K4 örneklem alanında bakteri domaininde cins düzeyinde temsilcileri tanımlanmış ve Şekil 4.101’de verilmiştir. %5’in altında ve *Acidithiobacillus* ve *Ferrithrix* temsilcisi bulunmaktadır. %10,62 oranında temsilcisi bulunan cins *Metallibacterium*’dur. Bunun yanı sıra, %21,83 oranında *Acidiphilium* temsilcisi bulunmaktadır. En baskın olan cins %60,79 oranında temsilcisi bulunan *Leptospirillum*’dur.



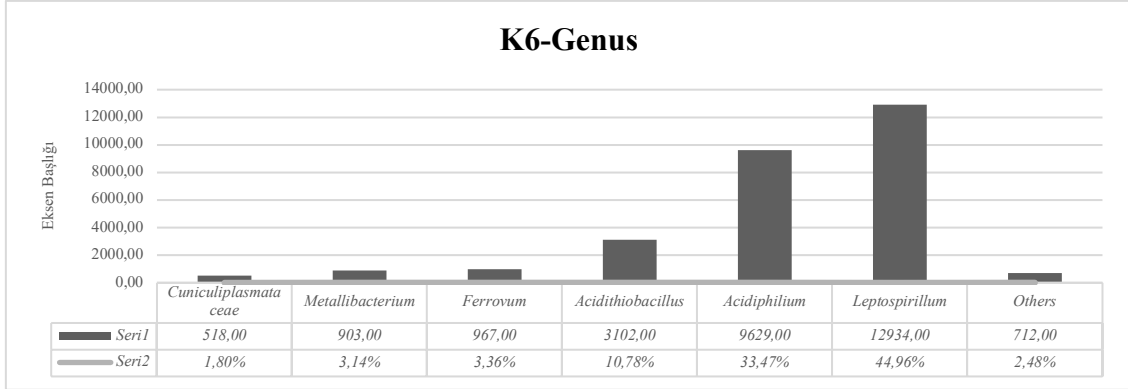
Şekil 4.101. K4 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları

K5 örneklem alanında bakteri ver arke domaininde cins düzeyinde temsilcileri tanımlanmış ve Şekil 4.102’de verilmiştir. Bakteri domaininde %1’in altında temsilcisi bulunan cins *Tumebacillus*’dur. Bunun yanı sıra, %7,37 oranında *Leptospirillum* temsilcisi bulunmaktadır. En baskın olan bakteri cinsi %21,39 oranında temsilcisi bulunan *Acidiphilium*’dur. %59 oranında arke domainin %58,91 oranında temsilcisi bulunan *Ferroplasma*’dır.



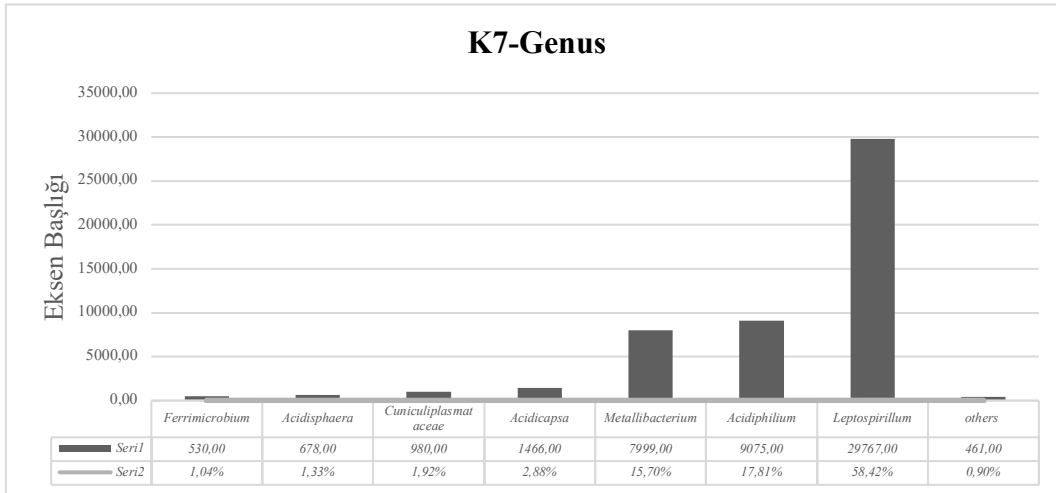
Şekil 4.102. K5 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları

K6 örneklem alanının bakteri domaininde cins düzeyinde temsilcileri tanımlanmış ve Şekil 4.103'te verilmiştir. %5'in altında *Metallibacterium* ve *Ferrovum* temsilcisi bulunmaktadır. %10,78 oranında temsilcisi bulunan cins *Acidithiobacillus*'dur. Bunun yanı sıra, %33,47 oranında *Acidiphilium* temsilcisi bulunmaktadır. En baskın olan cins %44,96 oranında temsilcisi bulunan *Leptospirillum*'dur.



Şekil 4.103. K6 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları

K7 örneklem alanının bakteri domaininde cins düzeyinde temsilcileri tanımlanmış ve Şekil 4.104'te verilmiştir. %1 oranında *Ferrimicrobium*, *Acidisphaera* ve *Acidicapsa* temsilcisi bulunmaktadır. %15,70 oranında temsilcisi bulunan cins *Metallibacterium*'dur. Bunun yanı sıra, %17,81 oranında *Acidiphilium* temsilcisi bulunmaktadır. En baskın olan cins %58,42 oranında temsilcisi bulunan *Leptospirillum*'dur.



Şekil 4.104. K7 örneklem alanı cins seviyesinde temsilcilerinin yüzde oranı ve okuma sayıları

16S Amplikon dizileme ile hedef gen bölgesinin yeni nesil dizileme yöntemi ile sekanslamasının sonucunda mikrobiyal komünite ile ilgili detaylı bilgi veren analiz sonucuna göre baskın cinslerin; (K1); *Acidiphilium*, *Metallibacterium*, *Aciditerrimonas*; (K2); *Acidiphilium*; (K3); *Acidiphilium*, *Metallibacterium*, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*; (K4); *Acidiphilium*, *Metallibacterium*, *Leptospirillum*; (K5); *Ferroplasma*, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Acidiphilium*; (K6) *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Leptospirillum*; (K7); *Metallibacterium*, *Acidiphilium*, *Leptospirillum* olduğu biyoinformatik analizler sonucunda ortaya konmuştur.

16S Amplikon dizileme sonucunda birinci su örneğinin üç sezonu arasındaki dikkat çekici farklılıklar vardır. Birinci sezon örnek alımı ilkbahar mevsiminde, ikinci ve üçüncü sezon örnek alımları kış ve sonbahar mevsimlerinde yapılmıştır. Bahar mevsimindeki mikrobiyal komünite daha zenginken, kış ve sonbahar mevsimlerinde mikrobiyal komünite çeşitliliğinde azalma meydana gelmiştir. *Acidiphilium* temsilcileri ikinci sezonda artarken üçüncü sezonda yeniden azalmıştır. İkinci sezonda birinci ve üçüncü sezonda gözlenmeyen *Acidithiobacillus* yer almaktadır. *Metallibacterium* kış sezonunda oldukça azalmışken, bahar aylarında artış gözlenmiştir. İkinci ve üçüncü sezonda baskın olan tür birinci sezonda hiç görülmeyen *Leptospirillum*'dur.

Metagenomik analiz kapsamında çeşitlilik belirlemede yapılan diğer çalışmalar incelenmiştir. Metagenomik analizi için farklı platformlar kullanılmıştır. Asidofil mikrobiyal komüniteyi belirlemek için Pyrosequencing platformunu kullanarak metagenom analizi yapan çalışmalar (Chen vd., 2015; Mardanov vd., 2018; D'Auria vd., 2018; Margaryan vd., 2019) yer alırken; Ion Torrent'ün farklı platformları da tercih edilmektedir bunlar arasında Personal Genome Instrument (Zhang vd., 2019), S5 sequencer (Gupta vd., 2017) ve PGM (Bomberg vd., 2019) yer almaktadır. Roche GS FLX Titanium tercih eden çalışmalar da yer almaktadır (Hu vd., 2015; Liljeqvist vd., 2015; Mardanov vd., 2017). Illumina Miseq (Johnson vd., 2015; Sun vd., 2015; Van Rossum vd., 2016; Sajjad vd., 2018; Sun vd., 2019; Ulloa vd., 2019; Liu vd., 2019) ve Hiseq platformları (He vd., 2016) da zaten yeni olan bu alanda son yıllarda daha sık tercih edilmektedir.

Metagenomik analizlerde diğerk kültürden bağımsız yöntemlere karşın (DGGE, Klon Kütüphanesi oluşturma) Arke domaini ve Bakteri domainlerine ait türler daha açık ve yüksek oranda tanımlanabilmektedir.

Tanımlanan mikroorganizmaların cins düzeyinde eşleştirmeleri Çizekge 4.30'da verilmiştir. K1 örneklem yerinde metagenomik analiz haricinde *Acidiphilium* tespit edilememiştir. *Acidibacter* metagenomik analizde tespit edilmiştir ve kültüre bağlı teknikler yeni tür olma potansiyeli olan bir izolat için tanımlanmıştır. Çeşitlilik ile ilgili en fazla sonucu klon kütüphanesi ve 16S amplikon dizileme ortaya koymuştur. K7. Örneklem yerinde *Leptospirillum* hem metagenomik, klon kütüphanesi hem de kültüre bağlı teknikle tespit edilmiştir. Uygulanan diğerk tekniklerden farklı olarak, K6 örneklem alanında 16S amplikon dizilemede *Ferrovum* tespit edilmiştir. K5 örneklem yerinde 16S amplikon dizileme ile Arke domaininde yer alan *Ferroplasmaceae* varlığı bulunmuştur. Uygulanan diğerk kültürden bağımsız tekniklerde Arke 16S PCR ürünleri elde edilemediği için tespit edilememiştir. K4 örneklem yerinde 16S klon kütüphanesi ve 16S amplikon dizilemede *Ferrithrix* cinsi olduğu gösterilmiş ve 16S klon kütüphanesinde çeşitliliğin olduğu görülmektedir. K3 örneklem yerinde 16S klon kütüphanesinde *Alicylobacillus* ve *Ferrovum* tespiti dışında kültürden bağımsız tekniklerde aynı mikroorganizmalar bulunmuştur. K2 örneklem yerinde ise 16S klon kütüphanesinde daha fazla çeşitlilik olduğu gösterilmiştir.

Çizelge 4. 30. Uygulanan yöntemlere göre örneklem alanlarında tanımlanan mikroorganizmaların listesi

Mikroorganizma	DGGE							Klon Kütüphanesi							Metagenomik							Kültüre bağlı çalışmalar						
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7
<i>Acidiphilium</i>		+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+		+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	
<i>Acidithiobacillus</i>		+	+	+	+	+	+			+		+	+			+	+	+	+	+				+	+	+	+	+
<i>Metallibacterium</i>	+	+	+			+	+			+			+			+	+		+	+								
<i>Leptosirillum</i>								+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+							+	
<i>Acidibacter</i>														+							+							
<i>Acidisoma</i>																							+					
<i>Actinobacterium</i>	+							+																				
<i>Sinobacteraceae</i>								+																				
<i>Alicyclobacillus</i>								+		+	+																	
<i>Sulfobacillus</i>								+	+		+																	
<i>Acidimicrobium</i>								+	+		+																	
<i>Legionella</i>								+						+														
<i>Acidimicrobiaceae</i>								+																				
<i>Aciditerrimonas</i>								+	+		+			+														
<i>Ferrimicrobium</i>								+	+		+			+	+					+								
<i>Ferrithrix</i>								+	+		+			+			+											
<i>Bacteriovoracaceae</i>													+															
<i>Ferrovum</i>										+									+									
<i>Aquihabitans</i>											+																	
<i>Acidithrix</i>	+																											

Çizelge 4.30 (devam) Uygulanan yöntemlere göre örneklem alanlarında tanımlanan mikroorganizmaların listesi

Mikroorganizma	DGGE							Klon Kütüphanesi							Metagenomik							Kültüre bağlı çalışmalar						
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7
<i>Rhodovastum</i>		+																										
<i>Tumebacillus</i>															+				+									
<i>Ferroplasmaceae</i>																+	+		+									
<i>Acidicapsa</i>																					+							
<i>Acidisphaera</i>															+						+							

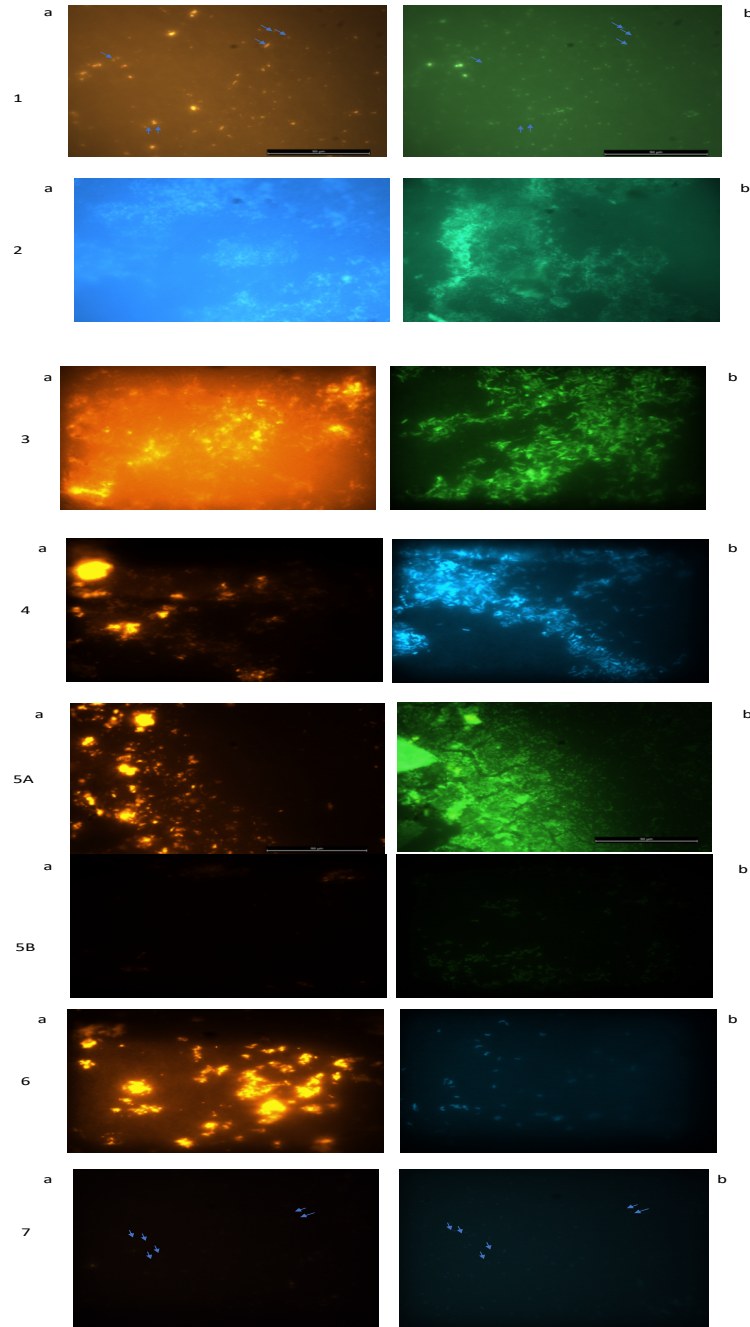
4.3.5. FISH

Uygulanan iki prokolün ardından hazırlanan FISH preparatları 100X'lük objektifte epifluoresan mikroskopta (Leica DM6000B) incelenmiştir. İnceleme sonucunda iki yöntem arasında farklılık olmaması nedeniyle 7 örnek için Eub338 ve Arc915 problemleri ile hazırlanan preparatlardan en iyi görüntüler için DAPI boyamaları sonucunda sayılan hücrelerin bilgileri Çizelge 4.31'de verilmiştir.

Çizelge 4. 31. Örneklerin DAPI boyamalarında hücre sayıları

Örnek Adı	DAPI hücre sayısı (m.organizma sayısı/ml)	Standart sapma
K1	$2,25 \times 10^5$	$\pm 0,03 \times 10^3$
K2	$3,32 \times 10^4$	$\pm 0,02 \times 10^3$
K3	$6,88 \times 10^5$	$\pm 0,25 \times 10^3$
K4	$9,18 \times 10^5$	$\pm 0,25 \times 10^3$
K5	$1,80 \times 10^6$	$\pm 0,45 \times 10^3$
K6	$2,97 \times 10^5$	$\pm 0,07 \times 10^3$
K7	$3,80 \times 10^5$	$\pm 0,14 \times 10^3$

Preparatlar incelendiğinde örnekler arasında farklı hücre yoğunlukları tespit edilmiştir. K5 örnekleme alanı hariç diğer preparatlarda Arke domainine rastlanmamıştır. K1 örnekleme alanının Eub338 probu kullanılarak hazırlanan preparatında uzun ve kısa basiller ile kok morfolojisinde bakterilere rastlanmıştır. K2 örnekleme alanı ise yoğun basiller ve koklar gözlenmiştir. K3 örnekleme alanında ise yoğun basiller gözlenmiştir. K4 örnekleme alanında uzun basil ve kok morfolojisinde bakteriler belirlenmiştir. K5 örnekleme alanında uzun ve kısa basil morfolojisinde bakterilerin var olduğu tespit edilmiştir. K6 örnekleme alanı ağırlı olarak kokobasil ve spiral morfolojisinde bakterileri içermektedir. K7 örnekleme alanı ise çoğunlukla basil morfolojisinde bakterilerin varlığı belirlenmiştir. Örneklere ait FISH ve DAPI görüntüleri Şekil 4.105'te verilmiştir.



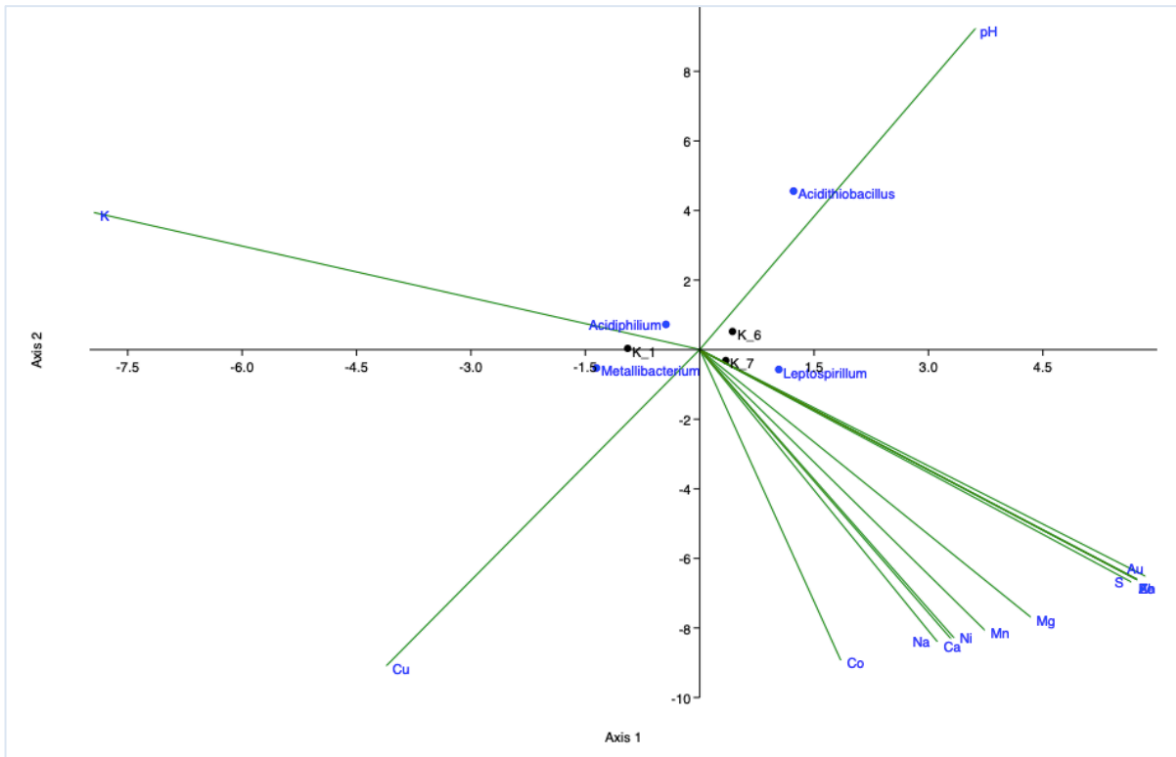
Şekil 4.105. FISH preparatlarının DAPI ve FISH görüntüleri a:FISH b: DAPI görüntüleri. 1:K1 bakteri (Eub338 probu), 2:K2 bakteri (Eub338 probu), 3:K3 bakteri (Eub338 probu), 4:K4 bakteri (Eub338 probu), 5A:K5 Arke, (Arc915) 5B: K5 bakteri (Eub338 probu), 6:K6 bakteri (Eub338 probu), 7:K7 bakteri (Eub338 probu)

FISH analizi ile bu tez çalışmasında, örneklem alanının ml'deki hücre sayısı ile bakteri ve arke domainindeki mikroorganizmaların varlığı tespit edilmiştir. Ancak Morales vd., 2005 yılında yaptığı çeşitlilik çalışmasında SRB100 probunu kullanarak sülfat indirgeyen mikroorganizmaları tanımlamışlardır.

4.4. İstatiksel Analizler

Çeşitlilik ve çevresel faktörlerin arasındaki korelasyonu bulabilmek için Canonical Correspondence Analysis algoritması kullanılmıştır.

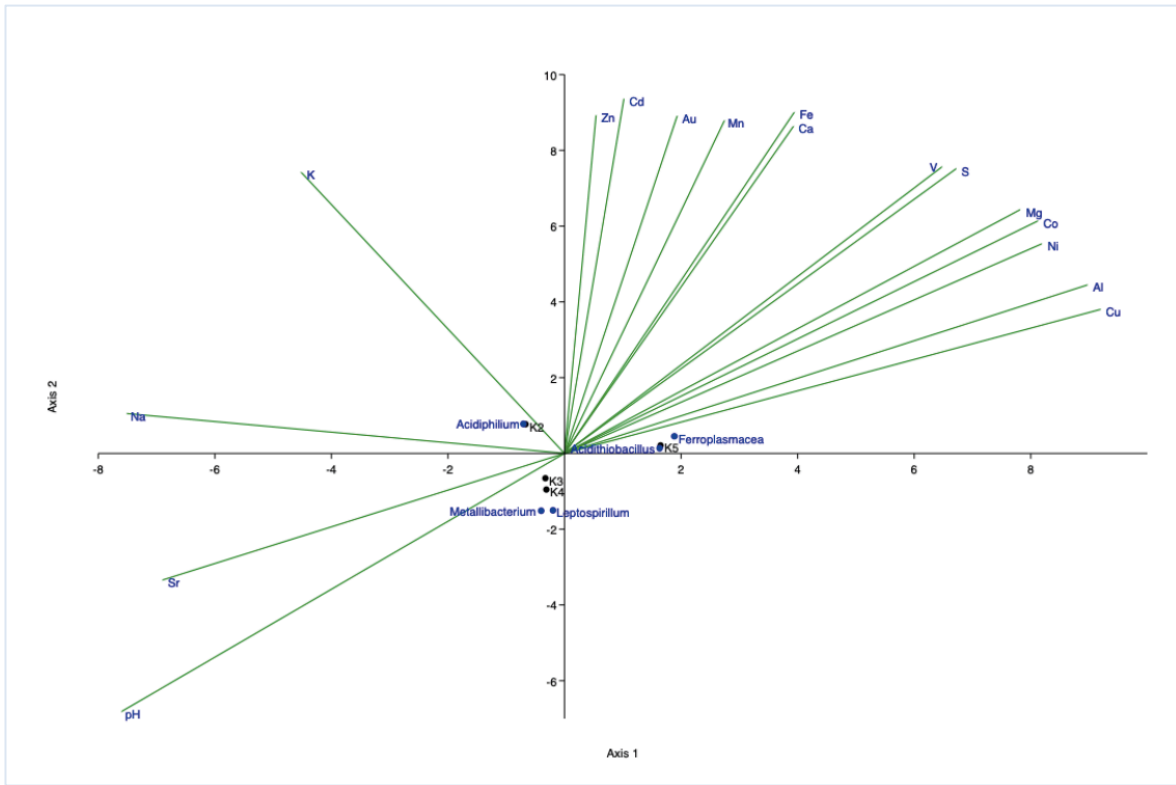
Şekil 4.106’da birinci örneklem alanının üç sezonda alınan örneklerdeki metageomik analize göre mikrobiyal komünitenin çevresel faktörlerle etkileşimi verilmiştir. Lineer etkinin olduğu türler ve çevresel faktörler bulunmaktadır. *Acidiphilium* ile potasyum konsantrasyonu arasında; *Acidithiobacillus* ve pH arasında ve *Metallibacterium* ile Cu konsantrasyonu arasında doğrudan ilişkili bulunmuştur. *Leptospirillum* ise kobalt, sodyum, nikel, kalsiyum, manganez, magnezyum, kükürt, altın, çinko konsantrasyonu ile ilişkili bulunmaktadır.



Şekil 4.106. OTU sayıları ile elde edilen CCA analizi (Birinci örneklem alanı)

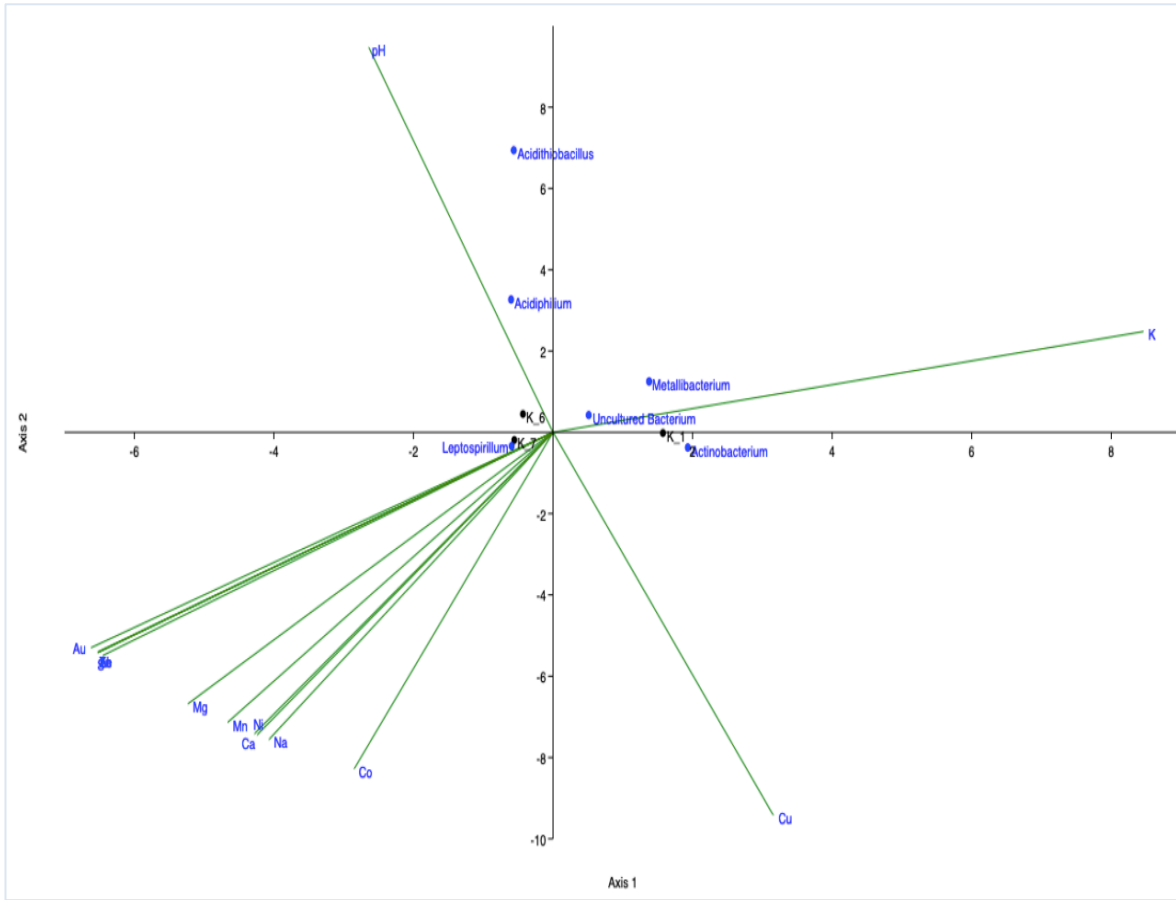
Şekil 4.107’de birinci sezonda alınan 4 örneğin metageomik analize göre mikrobiyal komünitenin çevresel faktörlerle etkileşimi verilmiştir. Lineer etkinin olduğu türler ve çevresel faktörler bulunmaktadır. *Acidiphilium* ile potasyum konsantrasyonu arasında; *Acidithiobacillus* ve *Metallibacterium* ile stronsiyum konsantrasyonu ve pH arasında

doğrudan ilişkili bulunmuştur. *Leptospirillum* ve *Ferroplasma* ise kobalt, kadmiyum, demir, alüminyum, bakır, sodyum, vanadyum, nikel, kalsiyum, manganez, magnezyum, kükürt, altın, çinko konsantrasyonu ile ilişkili bulunmaktadır.



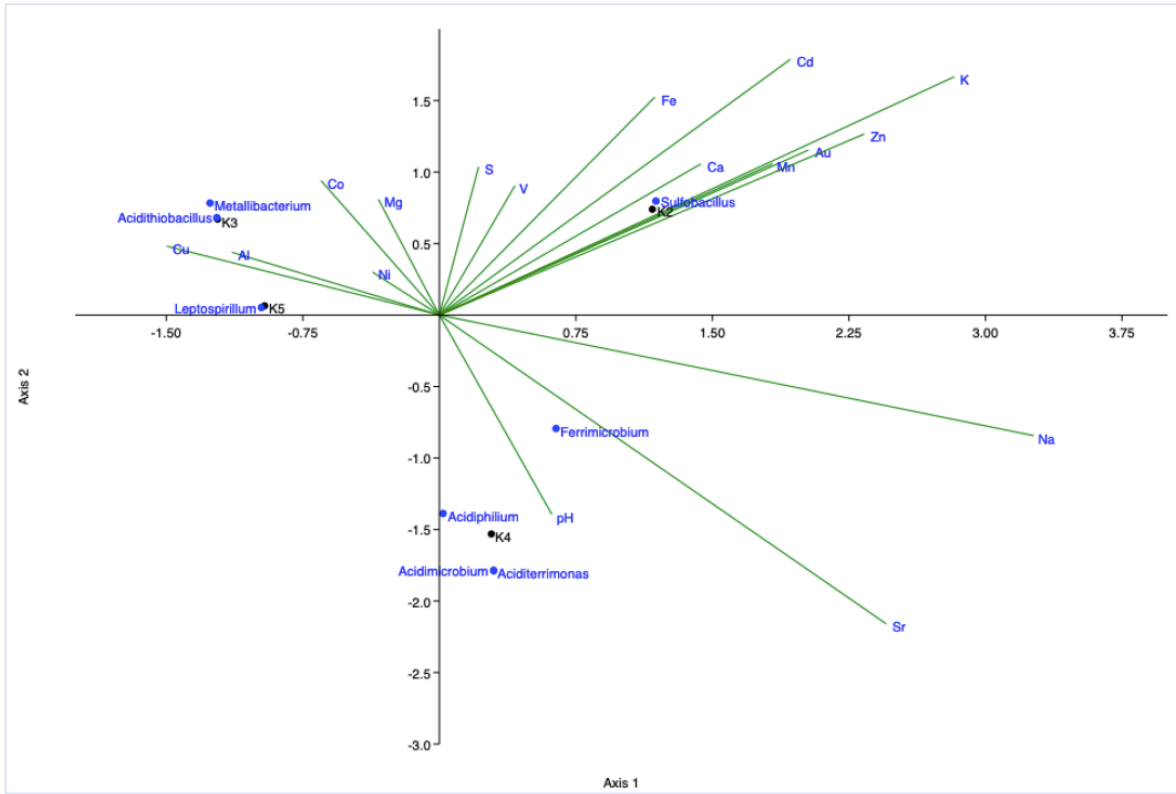
Şekil 4.107 Birinci sezon örneklem alanının mikrobiyal çeşitliliğin (OTU sayısı ile) CCA analizi

Şekil 4.108’de birinci örneklem alanının üç sezon örneklerindeki klon kütüphanesi analizi ile belirlenen mikrobiyal komünitenin çevresel faktörlerle etkileşimi verilmiştir. Lineer etkinin olduğu türler ve çevresel faktörler bulunmaktadır. *Acidiphilium* ve *Acidithiobacillus* ile pH arasında; *Actinobacterium* ile bakır konsantrasyonu arasında; *Metallibacterium* ile potasyum konsantrasyonu arasında doğrudan ilişkili bulunmuştur. *Leptospirillum* ise kobalt, sodyum, nikel, kalsiyum, manganez, magnezyum, altın konsantrasyonu ile ilişkili bulunmaktadır.



Şekil 4.108. Birinci örneklem alanının üç sezona ait mikrobiyal çeşitliliğin (klon sayısı) CCA analizi

Şekil 4.109’da birinci sezonda alınan 4 örneğin klon kütüphanesi analize göre mikrobiyal komunitenin çevresel faktörlerle etkileşimi verilmiştir. *Acidithiobacillus*, *Metallibacterium* ve *Leptospirillum* ile alüminyum, bakır, kobalt, nikel konsantrasyonları arasında ilişki bulunmuştur. *Sulfobacillus* kükürt, vanadyum, demir, kadmiyum, potasyum, kalsiyum, çinko, altın ve manganez arasında linner etkileşim bulunmuştur. *Acidiphilium*, *Acidimicrobium*, *Ferromicrobium* ve *Aciditerrimonas* ile pH, stronsiyum ve sodyum arasında ilişki bulunmuştur.

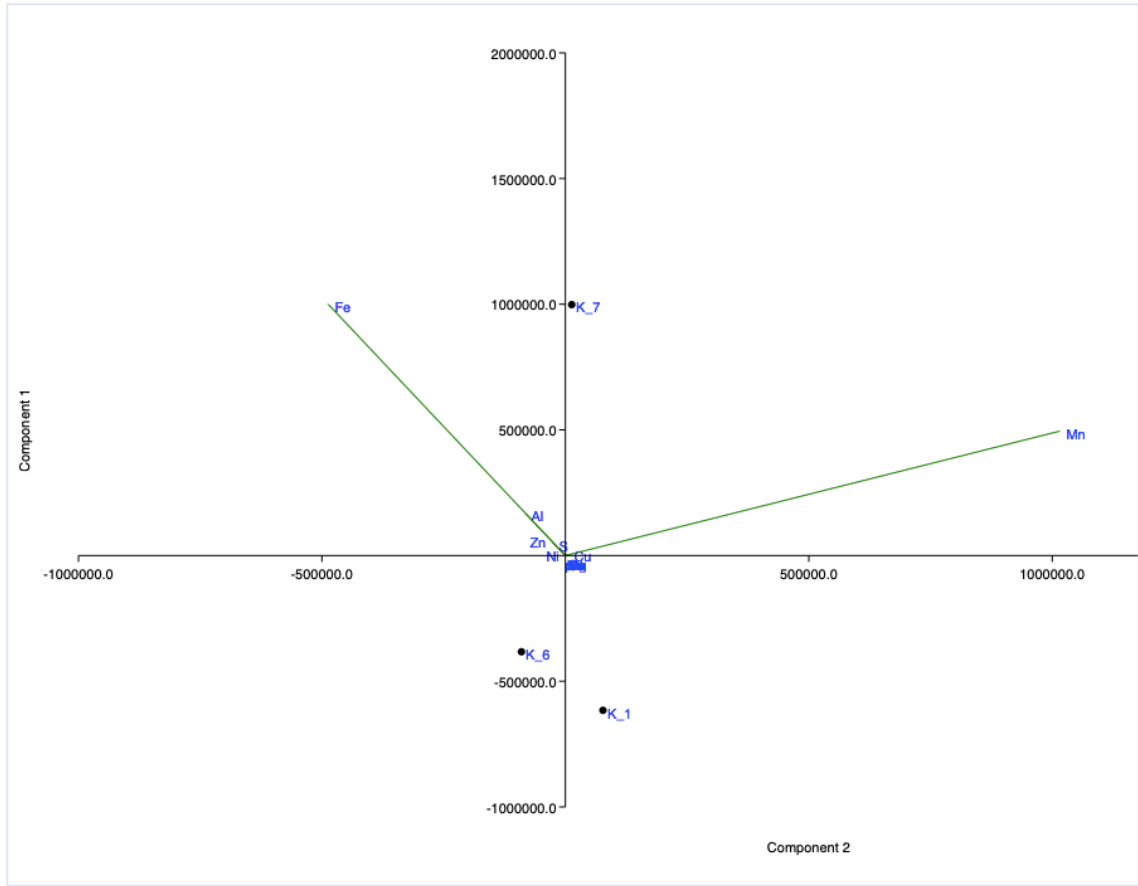


Şekil 4. 109. Birinci sezon örneklem alanlarının mikrobiyal çeşitliliğin (klon sayısı) CCA analizi

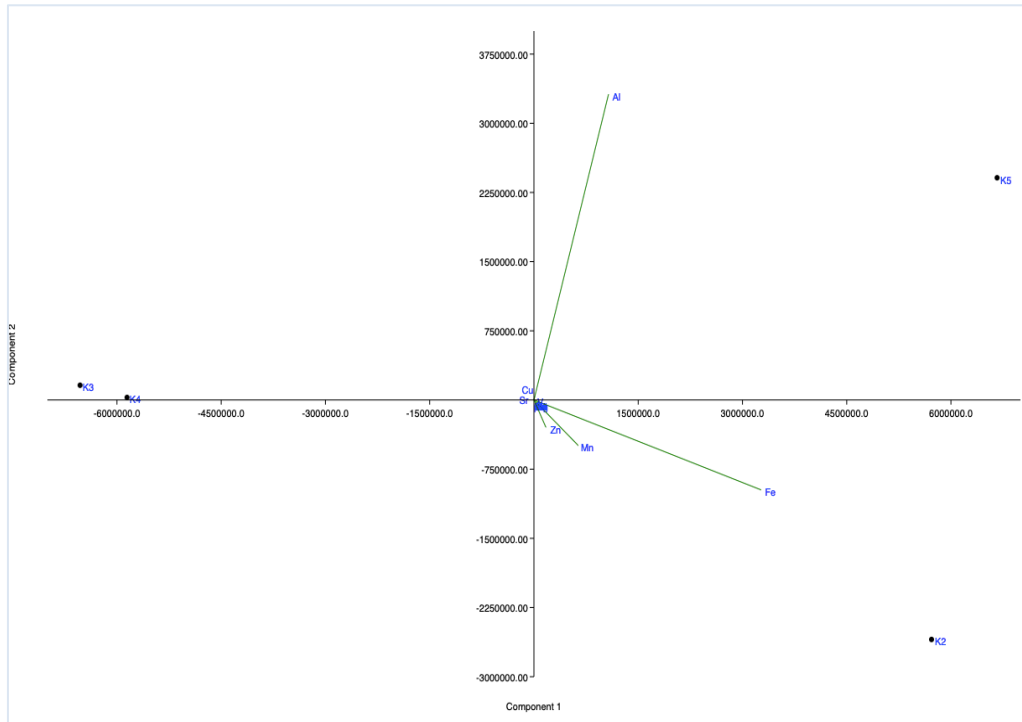
Temel bileşen analizi (Principle Component Analysis) çeşitlilik üzerinde etkili olabilecek çevresel faktörleri göstermektedir. Şekil 4.110'da verilen birinci örneklem alanının üç sezon örneklenmesinde etkili olan parametrelerin demir, alüminyum, çinko, bakır, nikel ve manganez olduğunu öne sürmektedir.

Birinci sezonda alınan diğer 4 örneklem alanı için temel bileşen analizi, Şekil 4.101'de verilen grafikte gösterilmektedir. En etkili bileşenlerin alüminyum, demir, çinko, manganez olduğunu öne sürmektedir.

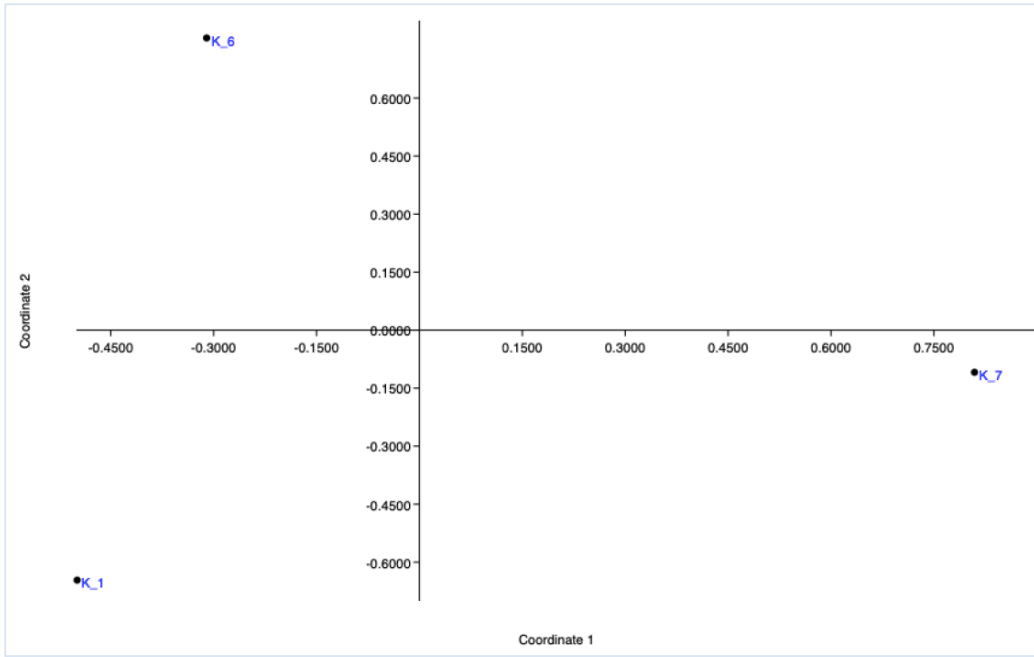
Birinci örneklem alanının üç sezon ile Temel Koordinat Analizi (Principle Coordinate Analysis) ile benzerlikleri değerlendirilmiştir. Üç örneklem alanının birbirinden oldukça farklı olduğu Şekil 4.112'de verilen grafikte gösterilmektedir. Metal analiz sonuçları ile de açıkça görülen farklılık analiz sonucunda görselleştirilmiştir.



Şekil 4.110. Birinci örneklem alanlarının üç sezona ait PCA analizi

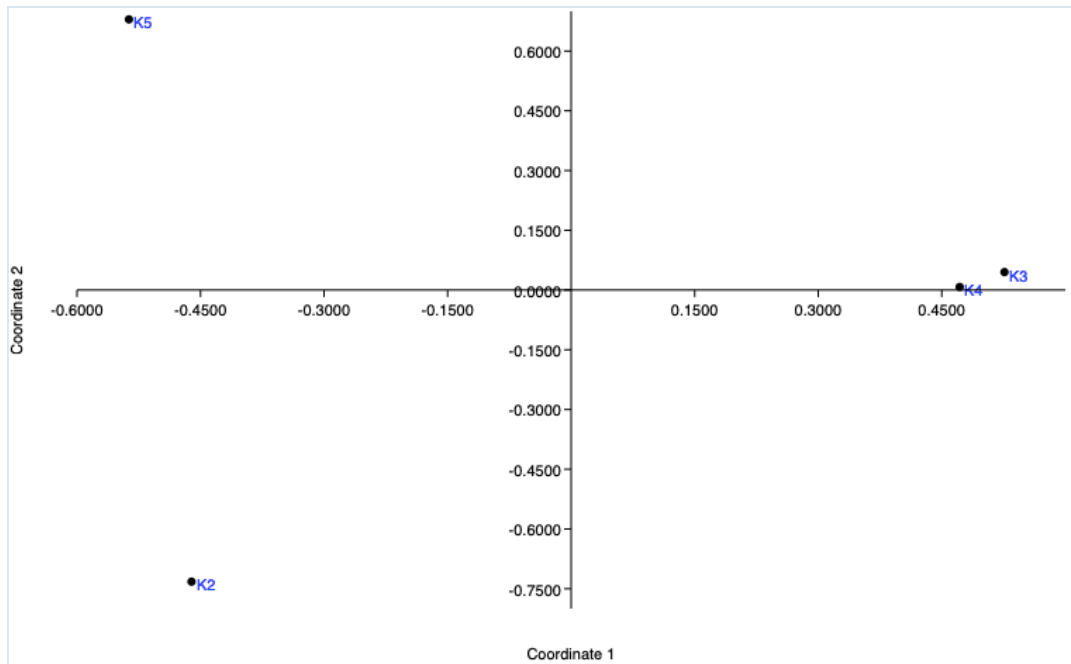


Şekil 4.111. Birinci sezon örneklem alanlarının PCA analizi



Şekil 4.112. Birinci örneklem alanlarının üç sezona ait PCoA analizi

Birinci sezonda alınan örneklerin temel koordinat analizi ise Şekil 4.113'te verilmiştir. K3 ve K4 'ün benzer özellikte olabileceği ancak K5 ve K2'den oldukça farklı kompozisyonda olduğu görülmektedir. Aynı şekilde K5 ve K2 de birbirinden farklılık göstermektedir.



Şekil 4.113. Birinci sezon örneklem alanlarına ait PCoA analizi

4.5. Biyoteknolojik Uygulamalar

4.5.1. Fe⁺² için standart eğri çizilmesi

Stok çözülden hazırlanan dilusyonlarda Fe⁺² konsantrasyonuna karşılık gelecek absorpsiyon değerleri fenantrolin yöntemi ile belirlenmiştir. Konsantrasyon değerleri, 510 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri ve kalibrasyon sonucu bulunan değerleri Çizelge 4.32’de verilmiştir

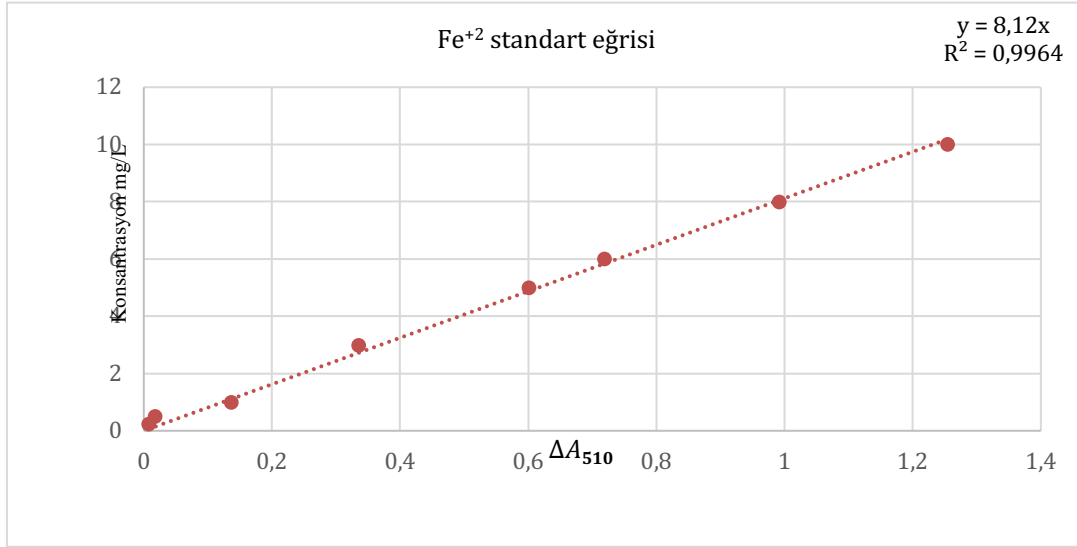
Çizelge 4. 32. Standart eğri noktalarının absorpsiyon değerleri

Konsantrasyon Fe ⁺² (mg/L)	ΔA_{510}	Kalibrasyon
0,25	0,007	0,2868906
0,5	0,017	0,3654486
1	0,136	1,3002888
3	0,335	2,863593
5	0,601	4,9532358
6	0,719	5,8802202
8	0,991	8,0169978
10	1,254	10,0830732

Konsantrasyona karşılık absorpsiyon değerleri Excel’de grafiğe dönüştürülmüştür. Fe⁺² miktarının tamamen tükeneyeceği göz önüne alınarak eğri sıfırdan geçirilmiştir. Elde edilen eşitlik Denklem 4.1’de verilmiştir.

$$y = 8,12 \times x \quad (4.1)$$

Oluşturulan standart eğri Şekil 4.114’te verilmiştir. Y ekseninde konsantrasyon, x ekseninde absorpsiyon değerleri yer almaktadır.

Şekil 4. 114. Fe²⁺ standart eğrisi

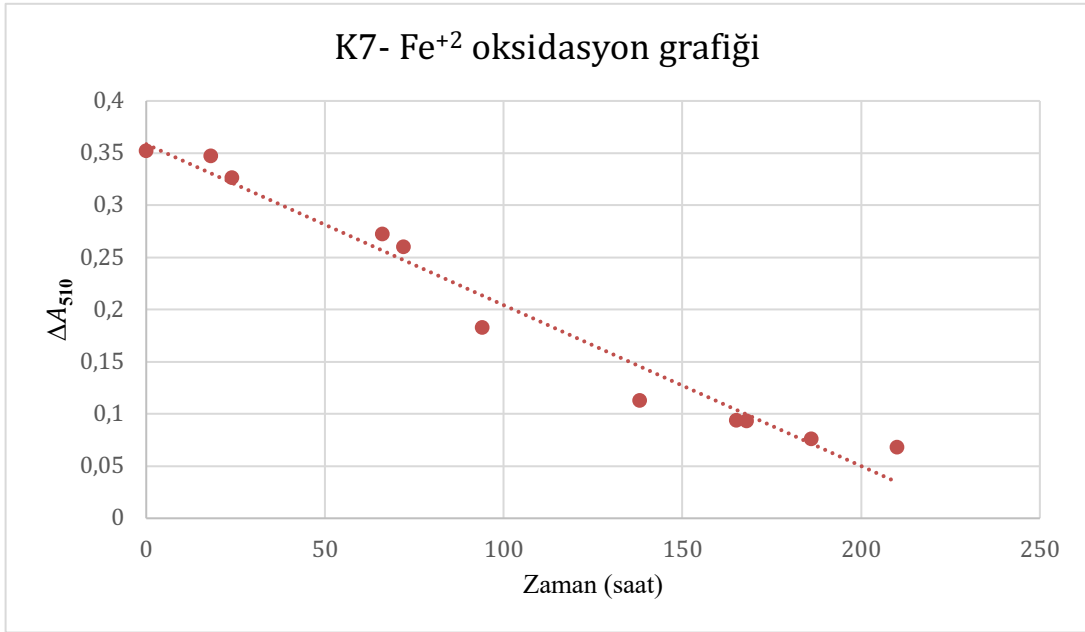
4.5.2. Fe²⁺ → Fe³⁺ oksidasyon seviyelerinin belirlenmesi

3 farklı su örneğinden elde edilen *Leptospirillum* kültürlerinin besiortamındaki çözülmüş halde bulunan Fe²⁺'nin Fe³⁺'e oksidasyonu tarama çalışmasında kullanılmıştır. Belli aralıklarla alınan numunelerin Phenanthroline yöntemine göre Fe²⁺ konsantrasyonu ölçülmüş ve 3 numune için Çizelge 4.33'te verilmiştir.

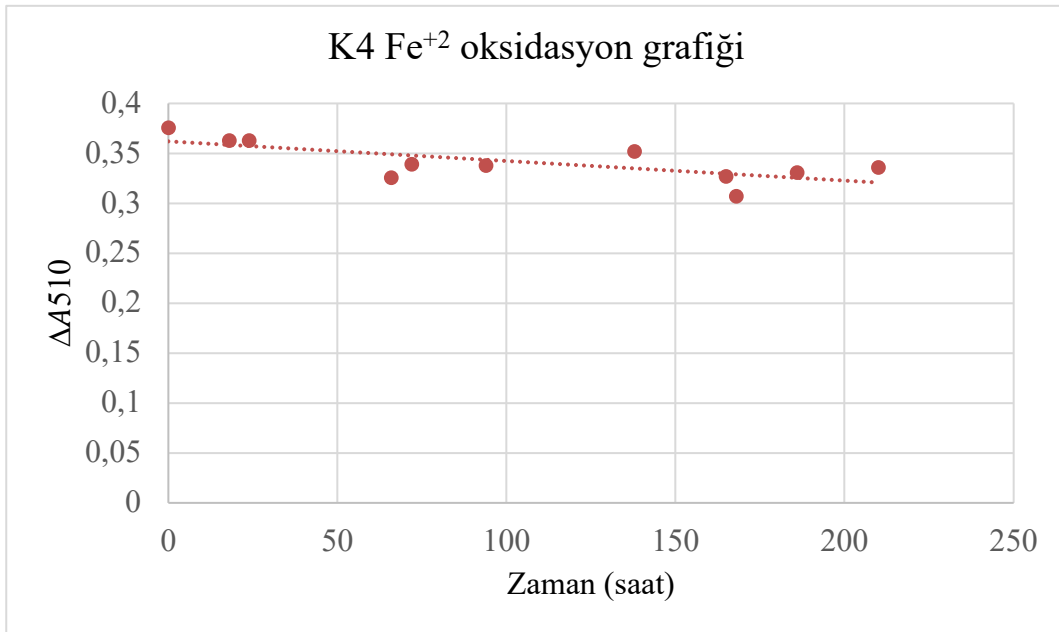
Çizelge 4. 33. Fe²⁺ oksidasyon tarama sonuçları

Saat	K7			K4			K3		
	Absorbans	Konsantrasyon mg/L	Oksidasyon	Absorbans	Konsantrasyon mg/L	Oksidasyon	Absorbans	Konsantrasyon mg/L	Oksidasyon
0	0,352	3572,8		0,376	3816,4		0,347	3522,05	
18	0,347	3522,05	1%	0,363	3684,45	-3,13%	0,334	3390,1	5,11%
24	0,326	3308,9	7%	0,363	3684,45	-3,13%	0,33	3349,5	6,25%
66	0,272	2760,8	23%	0,326	3308,9	7,39%	0,349	3542,35	0,85%
72	0,26	2639	26%	0,339	3440,85	3,69%	0,313	3176,95	11,08%
94	0,183	1857,45	48%	0,338	3430,7	3,98%	0,349	3542,35	0,85%
138	0,113	1146,95	68%	0,352	3572,8	-4,83%	0,262	2659,3	25,57%
165	0,094	954,1	73%	0,327	3319,05	7,10%	0,402	4080,3	-14,20%
168	0,093	943,95	74%	0,307	3116,8	12,84%	0,324	3288,6	7,95%
186	0,076	771,4	78%	0,331	3359,65	5,97%	0,395	4009,25	-12,22%
210	0,068	690,2	81%	0,336	3410,4	10,63%	0,494	5014,1	-40,34%

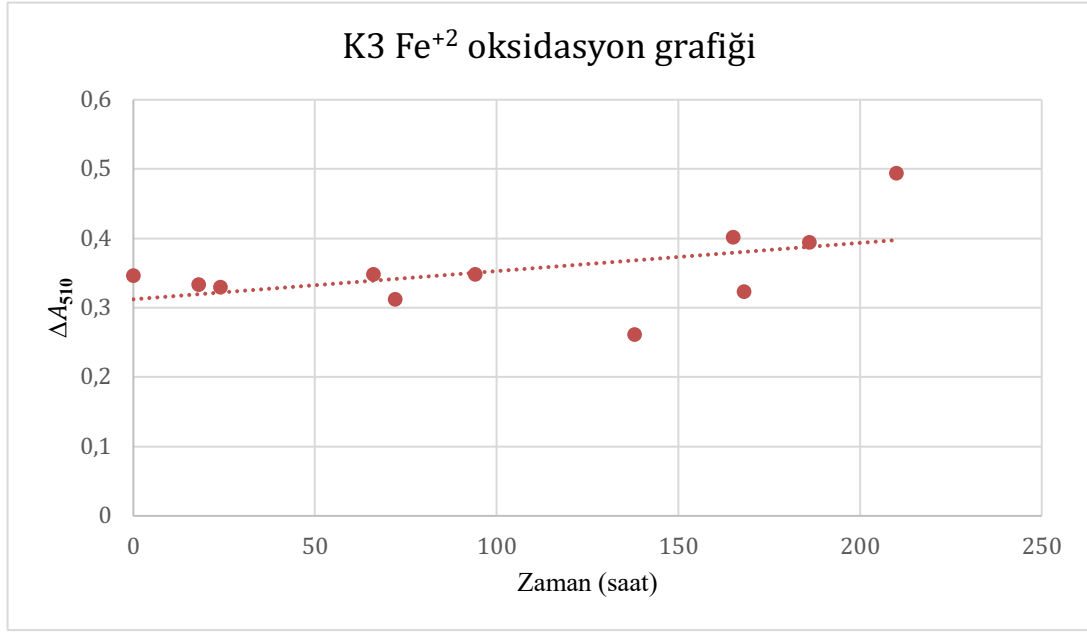
Çizelge 4.31'de verilen değerler 3 numune için de grafiğe dönüştürülmüştür. K7, K4 ve K3 *Leptospirillum*'ların Fe²⁺ oksidasyon grafiği sırasıyla Şekil 4.115, Şekil 4.116 ve Şekil 4.117'de verilmiştir.



Şekil 4.115. K7-*Leptospirillum* Fe²⁺ oksidasyonu



Şekil 4.116. K4- *Leptospirillum* Fe²⁺ oksidasyonu



Şekil 4.117. K3-*Leptospirillum* Fe²⁺ oksidasyonu

3 kültür arasında Fe²⁺ konsantrasyonunda düşüş gösteren izolat K7 örneklem alanından elde edilen *Leptospirillum* olmuştur. Düşüş belirlendikten sonrasında günlük 50 ml besleme yapılarak ölçüm alınmaya devam edilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.34'te verilmiştir.

Çizelge 4. 34. Fe²⁺ oksidasyonunda en iyi seçilen mikroorganizmanın besleme sonrası 4 gün süresince alınan ölçümleri

Numune	Absorbans	Fe +2 konsantrasyonu(mg/L)
K7-1.gün besleme öncesi	0,047	477,05
K7-1.gün besleme sonrası	0,065	659,75
K7-2.gün besleme öncesi	0,057	578,55
K7-2.gün besleme sonrası	0,107	1086,05
K7-3.gün besleme öncesi	0,060	609
K7-3.gün besleme sonrası	0,116	1177,4
K7-4.gün besleme öncesi	0,060	609
K7-4.gün besleme sonrası	0,120	1218

50 ml besleme ile artış ve yükselişlerle dengede kaldığı gözlemlendikten sonra saatlik ölçüm alınmaya başlanmıştır. Saatlik veriler Çizelge 4.35'te verilmiştir. Düzenli düşüş gözlenmiş ancak son saatte bir yükseliş görülmektedir.

Çizelge 4. 35. Besleme sonrası Fe⁺² oksidasyon sonuçları

Numune	Absorbans	Fe +2 konsantrasyonu(mg/L)
K7-5. Gün t=0	0,028	284,2
K7-1.saat	0,016	162,4
K7-3.saat	0,011	111,65
K7-5.saat	0,009	91,35
K7-7.saat	0,012	121,8

Saatlik ölçümlerin ardından Fe⁺² konsantrasyonunun sıfır olduğu zamandan itibaren iki kat besleme yapılmaya başlanmıştır. %95 oranında oksidasyon görüldükten sonra deney durdurulmuştur (Çizelge 4.36).

Çizelge 4. 36. İki kat besleme sonrasında Fe⁺² oksidasyon sonuçları

Örnek Adı	Absorbans	Fe Kons. mg/L
K7_5.gün	0	0
besiyeri	1,363	13834,45
K7_besleme sonrası	0,161	1634,15
K7_30dk	0,241	2446,15
K7_1h	0,112	1136,8
K7_2,5h	0,126	1278,9
K7_3,5h	0,118	1197,7
K7_7h	0,099	1004,85
K7_24h	0,102	1035,3
K7_28h	0,072	730,8
K7_29h	0,075	761,25
K7_30h	0,073	740,95
K7_31h	0,066	669,9

Bu tez çalışmasında pH'ı 2,1 ile 2,7 arasında değişen örnekler 3 sezon süresince toplanmıştır. Kültüre bağlı yöntemler ve DGGE, FISH, Klon Kütüphanesi, Metagenomik yöntemleri içeren kültürden bağımsız yöntemler kullanılarak örneklem alanının mikrobiyal

komunitesi belirlenmiştir. Kùltùre edilen mikroorganizmalar arasından *Leptospirillum* cinsleri seçilerek Fe⁺² oksidasyon seviyeleri belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında örneklem yapılan yerin çevresel etmenleri ve yapılan diğèr çalışmaların çevresel etmenleri, karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.37 ve Çizelge 4.38'de verilmektedir.

Çizelge 4.39 ve Çizelge 4.40'da bu tez çalışmasında yapılan kùltùre bağılı ile kùltürden bağımsız yöntemler ve Çizelge 4.41'de metagenomik analizlerin yer aldığı çalışmalarda tespit edilen mikrobiyal komünite sonuçları özetlenmiştir.

Çizelge 4. 37. Literatürdeki asidik çevrelerde kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yapılan çalışmalarda belirlenen çevresel etmenler

Çevresel Etmenler						
	pH	Sıcaklık	Asit Maden Drenajı	Lokasyon	Ağır metaller	Kaynak
1	2-3	10-11°C	Kömür madeni	(Parys Mountain) in Anglesey	Artan: Sodyum, Potasyum, Alüminyum, Kalsiyum Magnezyum Demir Azalan: Bakır Manganez Çinko Arsenik Kadmiyum Kurşun Sülfat	Walton-Johnson, 1992
2	2,0 -4,4		Pirit maden	Conwy Valley, North Wales.	Demir, Sülfat, Organik Karbon, Sodyum, Potasyum, Magnezyum, Kalsiyum, Manganez, Bakır, Çinko, Kurşun, Alüminyum	Johnson vd., 1993
3	4-8	7 – 45 °C	Uranyum madeni	Ronneburg, Thuringia, Almanya		Schippers vd., 1995
4	4-6		Uranyum madeni	Wismut GmbH (Ronneburg, Thuringia, Almanya	0.05% Uranyum, 0.5- 7% Pyrite Veya Marcasite, Karbonat, Kalsiyum, Magnezyum, Manganez, Nikel, Bakır, Çinko, Kobalt	Schippers vd., 1996
5						Okibe vd., 2003
6	6,3 3,4			Ynysarwed Cornwall, İngiltere Wheal Jane Cornwall, İngiltere		Hallberg -Johnson, 2003
7		2,1-4,7		Tinto River (Huelva, southwestern İspanya)		Gonzalez-Toril vd., 2003
8	~3	6,7-7,1	Asidik havuz suyu	Kristineberg field site, Kuzey İsveç (Boliden)	Demir (II), Sülfat (SO ₄ ²⁻) Kükürt	Morales vd., 2005
9			Asid maden drenaj	Carbondale in Athens County, southeastern Ohio, ABD.		Nicomrat vd., 2006
10	1.9 to 2.3	22°C	Asid maden drenajı Dabaoshan Madeni (24° 31' 37''N, 113° 42' 49'' E)	Guangdong Province, Çin	Civa, Arsenik, Fosforik Asit, Magnezyum, Bakır, Volfram, Çinko, Kurşun, Manganez, Gümüş, Sülfür, Molibden, Krom, Demir, Alüminyum, Kalay, Kalsiyum, Potasyum.	Yang vd., 2007
11	2.5	25.0°C	Yunfu sulfid madeni	Guangdong province, Çin	Arsenik, Fosfor, Nikel, Çinko, Demir, Bakır	He vd., 2007
12	3.73 5.78.	6,7-20,6	Carnoule kurşun ve çinko madeni	Tailing stock; Reigous Creek	Arsenik(III) , Arsenik(V), Demir(II), Sülfat (SO ₄ ²⁻)	Bruneel vd., 2008
13	2.0- 3.5	22°C	Shen-bu bakır madeni asid maden drenajı	Gansu Province, Çin.	Civa, Arsenik, Fosfor, Kobalt, Magnezyum, Çinko, Bakır, Manganez, Sülfür, Molibdenyum, Krom, Demir, Alüminyum, Kalsiyum, Potasyum, Nikel	Yang vd., 2008
14	2.0	20.1°C	Dongxiang bakır madeni ve Yinshan kurşun-çinko madeni	Jiangxi Province, Çin	Arsenik, Fosfor, Çinko, Magnezyum, Kurşun, Kobalt, Kalsiyum, Kükürt, Molibden, Demir, Bakır, Alüminyum	He vd., 2008
15	3,0	30°C	Xiang Mountain sulfid madeni	Anhui Province, Çin	Demir (II), Alüminyum, Kalsiyum, Manganez, Sodyum, Bakır	Hao vd., 2010
16		35°C	Bakır madeni (Mission Mine)	Sahuarita, Arizona, (24 km) Tuscon güneyinde (31°58'45-46"N, 111°02'58-69"W	Toplam Bakır Ve Toplam Molibden	Pepper vd., 2012
17			Asid maden drenajı	Vale Copper Cliff Central Tailings		Auld vd., 2013

Çizelge 4.37 (devam) Literatürdeki asidik çevrelerde kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yapılan çalışmalarda belirlenen çevresel etmenler

Çevresel Etmenler						
	pH	Sıcaklık	Asit Maden Drenajı	Lokasyon	Ağır metaller	Kaynak
18	3.2-6.5		Sülfid maden cevher atığı	Selebi-Phikwe (Botsvana), Freiberg (Almanya), ve Kristineberg (İsveç),	Pirotin Pirit, Arsenopirit, Sflerit, Galena	Korehi vd., 2014
19			Kapalı Maden	Radzimowice	Lityum, Bor, Sodyum, Magnezyum, Alüminyum, Silisyum, Potasyum, Kalsiyum	Tomasz Cłapa vd., 2019
20	2.5		Akhtala maden cevher atığı	Armenia's Northern Lori	Mineralizasyon; Sülfat İyonları, Klor İyonları, Ağır Metal Konsantrasayonları: Krom, Demir, Manganez, Kobalt, Nikel, Bakır, Çinko, Kadmiyum	Margaryan vd., 2019

Çizelge 4. 38. Türkiye'de asidik çevrelerde kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yapılan çalışmalarda belirlenen çevresel etmenler

Çevresel Etmenler						
	pH	Sıcaklık	Asit Maden Drenajı	Lokasyon	Ağır metaller	Kaynak
1				Balya (Balıkesir)		Gül, 2014
2	3.05-2.80	12.8-14.2°C	Çan Asit maden drenaj Balya Çan Asit maden drenaj	Çanakkale Balıkesir	Sulfate-S, Toplam demir, Alüminyum, Manganez, Çinko , Copper Nickel Chromium Cobalt Magnesium	Aytar vd., 2015
3	2,8-3,6			Espiye (Giresun)		Sağlam, 2015
4	2,8-3,6		Asit maden drenaj	Halıköy (İzmir)		Toptaş, 2018
5	2,0- 2,7	18-27	Asit maden drenaj	Ekinözü (Kahramanmaraş)	Demir Alüminyum, Altın, Magnezyum, Kükürt, Çinko	Bu Tez Çalışması

Çizelge 4. 39. Literatürdeki asidik çevrelerde kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yapılan çalışmalarda belirlenen mikrobiyal komünite

Tanımlanan Mikroorganizmalar				
	Kültüre Bağlı Çalışmalar	Kültürden Bağımsız Çalışmalar	Kaynak	
1	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	-	Walton-Johnson, 1992	
2	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	-	Johnson vd., 1992	
3	<i>Sulfolobus/Acidianus</i> <i>T. ferrooxidans L. ferrooxidans</i>	-	Schippers vd., 1995	
4		-	Schippers vd., 1996	
5		-	Okibe vd., 2003	
6	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> ve <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	-	Hallberg ve Johnson, 2003	
7	-	DGGE <i>Leptospirillum spp.</i> , <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Acidiphilium spp.</i> , “ <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> ,” <i>Ferroplasma acidiphilum</i> , ve <i>Thermoplasma acidophilum</i>	Gonzalez-Toril vd., 2003	
8		DGGE <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Dechlorosoma</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Methylocapsa</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sulfobacillus</i>	FISH <i>Deulfomicrobium spp.</i> , <i>Desulfovibrio sp.</i> , <i>Desulfovibrio sp.</i> , <i>Desulfovibrio spp.</i> , <i>Desulfobacterium spp.</i> , <i>Desulfotalea spp.</i> & <i>Desulfofusis sp.</i>	Morales vd., 2005
9		DGGE <i>A. ferrooxidans</i> TRA3-20 (a eubacterium), <i>Arsenite-oxidizing bacterium</i> BEN-4, <i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Bordetella sp.</i> , <i>A. thiooxidans</i> , <i>A. ferrooxidans</i> , <i>Arsenite-oxidizing bacterium</i> BEN-4, <i>A. ferrooxidans</i>	Nicomrat vd., 2006	
10	-	Klonlama <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Acidiphilium sp.</i> , <i>Leptospirillum</i> , <i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Yang vd., 2007	
11	-	Klonlama <i>Nitrospira</i> , α - <i>Proteobacteria</i> , β - <i>Proteobacteria</i> , γ - <i>Proteobacteria</i> four families. <i>Acidithiobacillus</i> , <i>Gallionella</i> , (γ - <i>Proteobacteria</i> family β - <i>Proteobacteria</i> family)	He vd., 2007	
12		Klonlama Arke <i>Euryarchaeota</i> (<i>F. acidiphilum</i> ; <i>Uncultured archaeon</i>)	Bruneel vd., 2008	
13		Klonlama <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (γ - <i>Proteobacteria</i>) ve <i>Caulobacter crescentus</i> (α - <i>Proteobacteria</i>).	Yang vd., 2008	
14		Klonlama α - <i>Proteobacteria</i> (1.1%), β - <i>Proteobacteria</i> (2.3%), γ - <i>Proteobacteria</i> (30.8%), <i>Firmicutes</i> (15.4%), <i>Actinobacteria</i> (0.3%) ve <i>Nitrospira</i> (50.1%). <i>Leptospirillum</i> , <i>Acidithiobacillus</i> , ve <i>Sulfobacillus</i> (<i>Nitrospira</i> , γ - <i>Proteobacteria</i> , ve <i>Firmicutes</i>)	He vd., 2008	
15		Klonlama Bakteri: <i>Acidiphilium</i> Arke: <i>Crenarchaeota</i>	Hao vd., 2010	
16		Klonlama <i>Proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Acidobacteria</i> ve <i>Bacteroidetes</i>	Pepper vd., 2012	
17	<i>Acidiphilium multivorum</i> , <i>Acidiphilium angustum</i> , <i>Acidiphilium rubrum</i> , <i>Acidiphilium acidophilum</i> , <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Acidobacteriaceae</i> , <i>Acidocella facilis</i> , <i>Granulicella paludicola</i>	<i>Acidithiobacillus</i> ve <i>Acidiphilium</i>	Auld vd., 2013	

Çizelge 4.39 (devam) Literatürdeki asidik çevrelerde kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yapılan çalışmalarda belirlenen mikrobiyal komünite

Tanımlanan Mikroorganizmalar			
	Kültüre Bağlı Çalışmalar	Kültürden Bağımsız Çalışmalar	Kaynak
18		Klonlama <i>Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes Firmicutes Nitrospirae Proteobacteria</i>	Korehi vd., 2014
19	-	Klonlama: <i>Metallibacterium sp., Ferrovum myxofaciens, Metallibacterium scheffleri, Xanthomonas sp., Acidithiobacillus ferrivorans, Ferrithrix thermotolerans, ve Acidithrix ferrooxidans</i>	Tomasz Clapa vd., 2019
20	-	DGGE Şube: <i>Firmicutes</i> , cins: <i>Bacillus</i> . Şube: <i>Acidobacteria</i> ; sınıf: <i>Gammaproteobacteria</i> , cins: <i>Pseudomonas</i>	Margaryan vd., 2019

Çizelge 4. 40. Türkiye’de asidik çevrelerde kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yapılan çalışmalarda belirlenen mikrobiyal komünite

Tanımlanan Mikroorganizmalar			
	Kültüre Bağlı Çalışmalar	Kültürden Bağımsız Çalışmalar	Kaynak
1		16S Klonlama, DGGE <i>Thiovirga sulfuroxydans, Thiobacillus thiophilus, Thiobacillus denitrificans ATCC 25259, Uncultured Thiobacillus sp. clone ENR10, Acidithiobacillus ferrooxidans strain S1, Acidithiobacillus ferrooxidans strain SY3, Acidithiobacillus ferrooxidans strain N16, Acidithiobacillus sp Peru 6, Acidithiobacillus sp OP 14, Sulfobacillus sp. 4G, Uncultured bacterium clone Z132, Uncultured bacterium clone YI-25, Uncultured bacterium clone MI-24, Uncultured Sulfobacillus sp. clone K6-C156, Ferrovum myxofaciens strain P3G, Acidithiobacillus ferrooxidans strain S1, Acidithiobacillus ferrooxidans strain SY3, Acidithiobacillus ferrooxidans strain N16, Acidovorax sp. G8B1, Rhodoferrax ferrireducens T118, Ferribacterium limneticum, Leptothrix sp. S1.1, Acidithiobacillus sp. C516, Actinobacterium GASP-45KA-29-E0, Nitrospira sp.</i>	Gül, 2014
2	<i>Acidithiobacillus ferrivorans, Acidiphilium organovorum strain TFC, Ferrimicrobium acidophilum, Ferrithrix thermotolerans, Acidicapsa ligni strain, Acidiphilium acidophilum strain, Çan AMD, Leptospirillum ferriphilum strain, Acidicapsa ligni strain WH120, Acidiphilium rubrum</i>	qPCR <i>Leptospirillum > Ferroplasma > Acidithiobacillus (Balya AMD) ve Ferroplasma > Leptospirillum > Acidithiobacillus (Çan AMD).</i>	Aytar vd., 2015
3	-	Klonlama <i>Acidithiobacillus ferrivorans, Ferrovum myxofaciens, Leptospirillum ferrooxidans, Acidithiobacillus ferrooxidans, Acidocella facilis, Acidocella aluminidurans, Acidiphilium cryptum, Acidiphilium multivorum, Acidithiobacillus thiooxidans, Acidiphilium cryptum</i>	Sağlam, 2015

Çizelge 4.40 (devam) Türkiye’de asidik çevrelerde kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yapılan çalışmalarda belirlenen mikrobiyal komünite

Tanımlanan Mikroorganizmalar						
	Kültüre Bağlı Çalışmalar	Kültürden Bağımsız Çalışmalar		Kaynak		
4	-	<p>Klonlama Uncultured archeon clon Acidithiobacillus ferrivorans Ferrovum myxofaciens Acidithiobacillus ferrooxidans Acidocella facilis Acidocella sp. Acidiphilium sp. Acidiphilium rubrum Uncultured Thiomonas sp. Uncultured Thermoplasmales archaeon clone</p>		<p>DGGE Acidiphilium sp. Acidiphilium rubrum Uncultured Thiomonas sp. Acidiphilium angustum Acidithiobacillus ferriphilus Ferroplasma Uncultured bacterium clone Acidithiobacillus ferrivorans Acidithiobacillus ferrooxidans</p>	Toptaş, 2016 (Tez)	
5	<p>Acidiphilium Acidithiobacillus Leptospirillum</p>	<p>DGGE K1 Metallibacterium scheffleri Acidithrix ferrooxidans Uncultured actinobacterium K2 Acidithiobacillus ferrivorans Acidiphilium cryptum Acidiphilium sp. Metallibacterium scheffleri Acidiphilium cryptum Rhodovastum atsumiense Acidiphilium rubrum K3 Acidithiobacillus ferrivorans Acidiphilium sp. Acidiphilium sp. Acidiphilium sp. Metallibacterium scheffleri K4 Acidithiobacillus ferrivorans Acidiphilium rubrum s Acidiphilium sp. Acidiphilium sp. Acidiphilium rubrum Acidiphilium sp.</p>	<p>K5 Acidithiobacillus ferrivorans Acidiphilium cryptum Acidiphilium sp. K6 Acidithiobacillus ferrivorans Acidiphilium rubrum Acidiphilium rubrum. Metallibacterium scheffleri K7 Metallibacterium scheffleri Acidiphilium rubrum Acidithiobacillus ferrivorans</p>	<p>Klonlama K6 Acidithiobacillus ferrivorans Leptospirillum sp Acidiphilium rubrum Metallibacterium scheffleri K5 Leptospirillum ferriphilum Leptospirillum sp Acidiphilium Acidithiobacillus ferriphilus K1 Sinobacteraceae bacterium Actinobacterium BGR 77 Metallibacterium scheffleri Alicyclobacillus sp Sulfobacillus Acidimicrobium ferrooxidans Leptospirillum sp Legionella adelaidensis Acidimicrobiaceae bacterium Metallibacterium scheffleri Aciditerrimonas ferrireducens Ferrimicrobium sp Ferrithrix thermotolerans Acidimicrobium ferrooxidans Aquihabitans daechungensis Ferrimicrobium acidiphilum K7 Leptospirillum sp Acidiphilium sp Bacteriovoracaceae bacterium</p>	<p>K2 Sulfobacillus benefaciens Sulfobacillus thermotolerans Sulfobacillus thermosulfidooxidans Sulfobacillus acidophilus Aciditerrimonas ferrireducens Ferrimicrobium acidiphilum Ferrithrix thermotolerans K4 Aciditerrimonas ferrireducens Acidimicrobium ferrooxidans Acidiphilium acidophilum Leptospirillum ferriphilum Ferrithrix thermotolerans Acidiphilium angustum Ferrimicrobium acidiphilum Alicyclobacillus contaminans Aquihabitans daechungensis Sulfobacillus thermosulfidooxidans K3 Acidithiobacillus ferrivorans Metallibacterium scheffleri Ferrovum myxofaciens Leptospirillum ferrooxidans Acidiphilium angustum Alicyclobacillus hesperidum Dokdonella koreensis</p>	Bu Tez Çalışması

Çizelge 4.41. Literatürdeki metagenomik çalışmaları ile bu tez çalışmasında sonuçları karşılaştırılması

Metagenomik Analiz Sonuçları		Metagenomik Yöntem	Kaynak	
1	<i>Acidobacteria</i> (6.36–8.89 %, averaging at 7.22 %), <i>Nitrospirae</i> (2.83–6.26 %, averaging at 4.71 %), <i>Bacteroidetes</i> (4.14–4.93 %, averaging at 4.52 %), <i>Verrucomicrobia</i> (2.78–5.29 %, averaging at 4.04 %), ve <i>Planctomycetes</i>	Illumina MiSeq platform	Sun vd., 2015	
2	<i>PLS</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (90.09%), <i>Acidithiobacillus caldus</i> (9.56%), <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> (0.34%) ve <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> (0.01%), <i>Acidiphilium cryptum</i> (99.78%), <i>Acidiphilium multivorum</i> (0.22%) ve <i>Acidiphilium symbioticum</i> (0.01%)	<i>LH</i> <i>A. cryptum</i> (99.71%), <i>A. Multivorum</i> (0.28%) ve <i>A. Symbioticum</i> (0,01 %)	Roche 454 GS FLX Titanium System	Hu vd, 2015
3	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> , <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Acidobacteria-like</i> , <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> , <i>Acidithiobacillus caldus-like</i> , <i>Gallionellaceae</i> like	Shotgun sequencing GS FLX Titanium Roche, 454 Life Sciences	Liljeqvist vd., 2015	
4	<i>Sideroxydans Sulfobacillus Thiomonas Nitrospira Picrophilus Thermoplasma ARMAN-4 ve -5 ARMAN-2 Acidiphilium Ferroplasma Leptospirillum Acidithiobacillus</i>	Pyrosequencing	Chen vd., 2015	
5	<i>Bacteria</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Thiomonas intermedia</i> , <i>Desulfosporosinus-like</i>	<i>Archaea</i> <i>Halobacterium salinarum</i> , <i>Halorubrum lacusprofundi</i> <i>Halomicrobium mukohataei</i> , <i>Haloferax volcanii</i>	Illumina MiSeq platform	Johnson vd, 2015
6	<i>Gallionellaceae Comamonadaceae Rhizobium/Agrobacterium Bradyrhizobium Rhodanobacter Thiobacillus Gallionellaceae Polaromonas Nocardioidea</i>	Illumina HiSeq 2000 platform	He vd., 2016	
7		Illumina MiSeq Sequencer,	Van Rossum vd., 2016	
8	<i>Bacteria</i> <i>Acidithiobacillus</i> , <i>Leptospirillum</i> , <i>Ferrimicrobium</i> , <i>Acidibacter</i> , <i>Acidisphaera</i>	<i>Archaea</i> <i>Ferroplasma</i> , <i>Thermoplasmatales</i>	Roche Genome Sequencer FLX (GS FLX),	Mardanov vd., 2017
9	<i>Bacteria</i> <i>Proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> ve <i>Chloroflexi</i> , <i>Fimicutes</i> , <i>Nitrospirae</i>	<i>Archaea</i> <i>Euryarchaeota</i> <i>Thaumarchaeota</i>	Ion Torrent S5 sequencer	Gupta vd., 2017
10	<i>Acidithiobacillus</i> , <i>Acidiphilium</i> , <i>Acidibacter</i> , <i>Leptospirillum</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Acidobacterium</i> , <i>Acidothermus</i> , <i>Ferrimicrobium</i> , <i>Acidiferrobacter</i> , ve <i>Sideroxydans</i>	Illumina MiSeq platform	Sajjad vd., 2018	
11	<i>Proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>Chlorobi</i> , <i>Bacteroidetes</i> , ve <i>Actinobacteria</i> . (<i>Thiobacillus Sideroxydans Rhodocyclaceae Pseudomonas Rhizobiales</i>)	Pyrosequencing	D'Auria vd., 2018	

Çizelge 4.41 (devam) Literatürdeki metagenomik çalışmaları ile bu tez çalışmasında sonuçları karşılaştırılması

Metagenomik Analiz Sonuçları					Metagenomik Yöntem			Kaynak	
12	<i>Bacteria</i> <i>Aquificae Firmicutes</i> <i>Proteobacteria Actinobacteria</i> <i>Acidobacteria Thermotogae</i>				<i>Archaea</i> <i>Crenarchaeota Nanoarchaeota</i> <i>Euryarchaeota Thaumarchaeota</i>			Pirosekanslama	Mardanov vd.,2018
13	Kömür Madeni Wite <i>Sulfobacillus, Leptospirillum, Ochrobactrum, Corynebacterium, Brevibacterium, Alcaligenes Acidithiobacillus</i> <i>Acidiphilium</i> <i>Acidiphilium, Acidithiobacillus, Aquicella, Brevibacterium, Ochrobactrum, Leptospirillum,</i>				Asid Maden Drenajı <i>Acidiphilium, Acidithiobacillus, Acinetobacter, Clostridium, Comamonas, Conexibacter, Leptospirillum, Sulfobacillus</i>			Illumina MiSeq Sekanslama	Sun vd, 2019
14	<i>Acidithiobacillus, , Leptospirillum, Acidimicrobiia, Thiobacillus, Ferrovum, Gallionella, Ferrithix</i>							Illumina MiSeq Sekanslama	Ulloa vd., 2019
15	Mod 1 included <i>Acidocella, Acidiphilium, Lactobacillus, ve Gallionella;</i> Mod 2 included <i>Propionimonas, Rhodococcus, Caloramator, Paenibacillus, Mycobacterium, Streptomyces ve Desulfosporosinus;</i> Mod 3 included <i>Corynebacterium, Staphylococcus, Lactococcus, Idiomarina, Halomonas, Comamonas, ve Flavobacterium;</i> ve Mod 4 included <i>Arthronema, Hydrogenophaga, Sediminibacterium, Rhodoplanes, Opiritus, Methylobacterium, Leptolyngbya, ve Pseudanabaena.</i>							Ion Torrent Personal Genome Instrument	Zhang vd, 2019
16	<i>Sulfuriferula, Bacillus, Sulfurifustis, Gaiella, ve Thiobacillus</i> <i>Acidibacter, Acidithiobacillus, Acidiphilium, Brevinema, Ferrimicrobium, Metallibacterium, Prevotellaceae, Acidiferrobacter</i>							MiSeq Sekanslama	Liu vd., 2019
17	<i>Leptospirillum, Acidithiobacillus Ferrovum, Acidiphilium</i>							Ion Torrent PGM	Bomberg vd, 2019
18	<i>Proteobacteria, Bacteroidetes, Saccharibacteria, Verrucomicrobia, Gammatimonadetes,</i>							Pirosekanslama	Margaryan vd., 2019
19	<i>K1</i> <i>Tumebacillus, Acidipila, Sulfiriflexus, Acidibacter ferrireducens, Neoclamyda, Ferrimicrobium, Acidisphaera, Aquisphaera, Legionella Simkania, Ferrithri, Aciditerrimonas, Acidiphilium, Metallibacterium</i>	<i>K2</i> <i>Leptospirillum Ferrimicrobium. Acidithiobacillus Acidiphilium.</i>	<i>K3</i> <i>Acidithiobacillus Metallibacterium Leptospirillum, Acidiphilium</i>	<i>K4</i> <i>Acidithiobacillus Ferrithrix Metallibacterium. Acidiphilium Leptospirillum</i>	<i>K5</i> Arke: <i>Ferroplasma</i> Bakteri: <i>Acidithiobacillus Tumebacillus Leptospirillum Acidiphilium</i>	<i>K6</i> <i>Metallibacterium Ferrovum Acidithiobacillus Acidiphilium Leptospirillum</i>	<i>K7</i> <i>Ferrimicrobium Acidisphaera Acidicapsa Metallibacterium. Acidiphilium Leptospirillum.</i>	Miseq 16S Amplikon Sekanslama	Bu Tez Çalışması

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Kahramanmaraş Ekinözü'nde çalışması durdurulmuş maden ocağına ait asit maden drenajının kültürden bağımsız ve kültüre bağlı yöntemler ile mikrobiyal komunitesi belirlenmiştir. Demir okside eden bakteriler arasında en yüksek kapasiteye sahip olan bakteri seçilmiştir.

Kültürden bağımsız tekniklerle mikrobiyal komunitenin belirlenmesinde DGGE, 16S rRNA gen bölgesi klon kütüphanesi oluşturma, 16S Amplikon Dizileme ile metagenom analiz ve FISH teknikleri kullanılmıştır. Moleküler yaklaşımlarla birbirini doğrulayan ve tamamlayan sonuçlar elde edilmiştir.

Kültüre bağlı teknikler ile asit maden drenajın içeriğine benzer besi ortamları hazırlanarak izolasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Kültürasyon sonucunda heterotrof beslenme şekline sahip yeni tür olma adayına sahip bir izolat elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar bir yıl içerisinde üç mevsimi kapsamaktadır ve mikrobiyal komünite değişimi hakkında önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında, Türkiye'de yapılan asidik çevrelerden örnek alınarak gerçekleştirilen çalışmalardan farkı, metagenomik yaklaşımı kullanılarak mikrobiyal komunitenin ilk kez belirlenmiş olmasıdır.

Bu tez çalışmasında uygulanan yaklaşımların yanı sıra ilgili alanda yapılması planlanan ve gerekli görülen hususlar aşağıda özetlenmiştir.

- Adaptasyon mekanizmalarında etkili olduğu düşünülen enzimlerin araştırılması,
- +2 yüklü katyonları kullanabilme kabiliyetinin ekzopolifosfatazın aktivitesi ile araştırılması,
- Rekombinant ekzopolifosfataz üretilerek laboratuvar ölçeğinde metal gideriminin gösterilmesi,

- İslah alışamaları için saha denemelerine asidofil mikroorganizmaların da katılması,
- Demir okside eden bakterilerin arsenik oksidasyon seviyelerinin araştırılması,
- Metagenomik analiz ile elde edilen 16S rRNA gen bölgeleri kullanılarak fonksiyonel genlerin belirlenmesi,
- İzolatların metabolik faaliyetlerinin anlaşılması için metabolizma mühendisliği ile çalışmaların yapılması,

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abe, F., 2003, The Role of Tryptophan Permease Tat2 in Cell Growth of Yeast under High-Pressure Condition. In: Winter R (ed) *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, Springer, Berlin, pp 271–274.
- Abe, F., 2007, Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71(10):2347–2357.
- Aislabie, J., Saul, D.J., Foght, J.M., 2006, Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles*, vol. 10, no. 3, pp. 171–9.
- Alonso-Gutierrez, J., Teramoto, M., Yamazoe, A., Harayama, S., Figueras, A., vd., 2011, Alkane-degrading properties of *Dietzia* sp. H0B, a key player in the Prestige oil spill biodegradation (NW Spain). *Applied and Environmental Microbiology*. 111, 800_810.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A., 1990, Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1919-1925.
- Amann, R.J., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995, Phylogenetic identification of individual microbial cells without cultivation, *Microbiology Reviews*, 59, 143-169.
- Amer, MW., Khalili, FI., Awwad, AM., 2010, Adsorption of lead, zinc and cadmium ions on polyphosphate-modified kaolinite clay. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 2(1):1–8
- Amouric, A., Brochier-Armanet, C., Johnson, D. B., Bonnefoy, V., and Hallberg, K. B. 2011, Phylogenetic and genetic variation among Fe (II)-oxidizing acidithiobacilli supports the view that these comprise multiple species with different ferrous iron oxidation pathways. *Microbiology* 157(Pt 1), 111–122. doi: 10.1099/mic.0.044537-0.
- Andrews, S., 2010, FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Erişim adresi: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F., Amann, R., 1999, Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environmental Microbiology*, 1:517-523.
- Arsene-Ploetze, F., Koechler, S., Marchal, M., Coppee, J. Y., Chandler, M., vd., 2010, Structure, function, and evolution of the *Thiomonas* spp. genome. *PLoS Genetics*, 6:e1000859. doi: 10.1371/journal.pgen.1000859.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Auld, R.R., Myre, M., Mykytczuk, N.C., Leduc, L.G., Merritt, T.J., 2013, Characterization of the microbial acid mine drainage microbial community using culturing and direct sequencing techniques. *Journal of Microbiological Methods*, 93(2), 108-115.
- Auernik, K.S., Maezato, Y., Blum, P. H., Kelly, R. M., 2008, The genome sequence of the metal-mobilizing, extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* provides insights into bioleaching-associated metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 682–692. doi: 10.1128/AEM.02019-07.
- Auernik, K.S., Kelly, R.M., 2010, Impact of molecular hydrogen on chalcopyrite bioleaching by the extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2668–2672. doi: 10.1128/AEM.02016-09.
- Aytar, P., 2012. Aşırı asidik ortamlarda prokaryotik çeşitliliğin geleneksel ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi ve biyodesülfürizasyonda kullanılabilirliği. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Aytar, P., Kay, C.M., Mutlu, M.B., Çabuk, A., Johnson, D.B., 2015, Diversity of acidophilic prokaryotes at two acid mine drainage sites in Turkey. *Environmental Science and Pollution Research*, 22.8, 5995-6003.
- Baeseman, J.L., Smith, R.L., Silverstein, J., 2006, Denitrification potential in stream sediments impacted by acid mine drainage: effects of pH, various electron donors, and iron. *Microbial Ecology*, 51, 232–241. doi: 10.1007/s00248-005-5155-z
- Baker-Austin, C., Dopson, M., 2007, Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology*, 15(4):165–171
- Baker-Austin, C., Potrykus, J., Wexler, M., Bond, P.L., Dopson, M., 2010, Biofilm development in the extremely acidophilic archaeon 'Ferroplasma acidarmanus' Fer1. *Extremophiles*, 14: 485–491.
- Baker, B.J., Banfield, J.F., 2003, Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, 44, 139–152. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00028-X
- Balcı, N.Ç., Gül S., Kılıç, M.M., Karagüler, N.G., Sarı E., Sönmez, M.Ş., 2014, Balya (Balıkesir) Pb-Zn madeni atık sahasının biyojeokimyası ve asidik maden drenajı oluşumuna etkileri. *Geological Bulletin of Turkey*, 57(3).
- Baross, J.A, Lenovich, L., 1992, Halophilic and osmophilic microorganisms. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, DC, pp 199–212.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barton, L.L., Fauque, G.D., 2009, Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Adv. Applied Microbiology*, 68, 41–98. doi: 10.1016/S0065-2164(09)01202-7
- Batrakov, S.G., Pivovarova, T.A., Esipov, S.E., Sheichenko, V.I., Karavaiko G.I., 2002 Beta-d glycopyranosyl caldarchaetidylglycerol is the main lipid of the acidophilic, mesophilic, ferrous iron-oxidizing archaeon *Ferroplasma acidiphilum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1581:29–35
- Bayat, B., Sari, B., 2010, Comparative evaluation of microbial and chemical leaching processes for heavy metal removal from dewatered metal plating sludge. *J Hazardous Materials*, 174(1–3):763–769. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.09.117>
- Bertin, P.N., Heinrich-Salmeron, A., Pelletier, E., Goulhen-Chollet, F., Arsène-Ploetze, F., vd., 2011, Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. *The ISME journal*, 5(11), 1735–1747.
- Bhattacharyya, J., Santhoshkumar, P., Sharma, K.K., 2003, A peptide sequence in yeast alcohol dehydrogenase prevents the aggregation of denatured substrate proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 307 (1), 1–7.
- Birtel, J., Walser, J. C., Pichon, S., Bürgmann, H., Matthews, B., 2015, Estimating bacterial diversity for ecological studies: methods, metrics, and assumptions. *PloS one*, 10(4), e0125356.
- Bloomfield, C., Coulter, J., 1974, Genesis and management of acid sulfate soils. *Advanced in Agronomy*, 25:265–326.
- Blowes, D., Ptacek, C., Jambor, J., Weisener, C., 2003, The geochemistry of acid mine drainage. In: *Treatise on Geochemistry*. Elsevier, pp. 149–204.
- Blumer-Schuetz, S. E., Kataeva, I., Westpheling, J., Adams, M. W., Kelly, R.M., 2008, Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects. *Current Opinion in Biotechnology* 19(3):210–217.
- Bolyen E, Rideout J. R., Dillon M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., vd, 2019, Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bomberg, M., Mäkinen, J., Salo, M., Kinnunen, P., 2019, High Diversity in Iron Cycling Microbial Communities in Acidic, Iron-Rich Water of the Pyhäsalmi Mine, Finland. *Geofluids*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bond, P.L., Druschel, G.K., Banfield, J.F., 2000, Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Applied Environmental Microbiology* 66, 4962–4971. doi:10.1128/AEM.66.11.4962-4971.2000
- Bond, P.L. Smriga S.P., Banfield, J.F., 2000, Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3842–3849
- Brockmann, S., Arnold, T., Schweder, B., Bernhard, G., 2010, Visualizing acidophilic microorganisms in biofilm communities using acid stable fluorescence dyes. *Journal of Fluorescence*, 20, 943–951. doi: 10.1007/s10895-010-0640-2
- Bruneel, O., Duran, R., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., Personne, J.C., 2006, Diversity of microorganisms in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoules, France. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 551–556. doi: 10.1128/AEM.72.1.551-556.2006
- Bruneel, O., Pascault, N., Egal, M., Bancon-Montigny, C., Goñi-Urriza, M. S., vd., 2008, Archaeal diversity in a Fe–As rich acid mine drainage at Carnoulès (France). *Extremophiles*, 12(4), 563-571.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W., 2005, Quantitative real-time RT-PCR _ a perspective. *Journal of Molecular. Endocrinology*, 34, 597_601.
- Cabrera, G., Perez, R., Gomez, J. M., Abalos, A., Cantero, D. 2006, Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *Journal of Hazardous Materials* 135, 40–46. doi: 10.1016/j.jhazmat.2005.11.058.
- Caldwell, P.E., MacLean, M.R., Norris, P.R. 2007, Ribulose bisphosphate carboxylase activity and a Calvin cycle gene cluster in *Sulfobacillus* species. *Microbiology*, 153(Pt 7), 2231–2240. doi: 10.1099/mic.0.2007/006262-0.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P., 2016, DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13:581-583.
- Carapito, C., Muller, D., Turlin, E., Koechler, S., Danchin, A., vd., 2006, Identification of genes and proteins involved in the pleiotropic response to arsenic stress in *Caenibacter arsenoxydans*, a metalloresistant beta-proteobacterium with an unsequenced genome. *Biochimie* 88(6):595–606.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Castelle, C., Guiral, M., Malarte, G., Ledgham, F., Leroy, G., vd., 2008, A new iron-oxidizing/O₂-reducing supercomplex spanning both inner and outer membranes, isolated from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Journal of Biogical. Chemistry. 283, 25803–25811. doi: 10.1074/jbc.M802496200
- Chakraborty, J., Das, S., 2014, Characterization and cadmium resistant gene expression of biofilm-forming marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JP-11. Environmental Science Pollution. Research. 21 (24), 14188_14201.
- Chen, L. X., Hu, M., Huang, L. N., Hua, Z. S., Kuang, J. L., vd., 2015, Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage. The ISME journal, 9(7), 1579-1592.
- Christel, S., Herold, M., Bellenberg, S., El Hajjami, M., Buetti-Dinh, A., vd., 2017, Multi-omics reveal the lifestyle of the acidophilic, mineral-oxidizing model species *Leptospirillum ferriphilum* T. Applied and Environmental Microbiology. doi:10.1128/AEM.02091-17.
- Christel, Stephan., 2018, Function and Adaptation of Acidophiles in Natural and Applied Communities. Diss. Linnaeus University Press.
- Ciuffreda, E., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Corbo, M., 2015, Alicyclobacillus spp.: new insights on ecology and preserving food quality through new approaches. Microorganisms, 3: 625–640.
- Ćłapa, T., Narożna, D., Siuda, R., Borkowski, A., Selwet, M., Mądrzak, C. 2019, Diversity of Bacterial Communities in the Acid Mine Drainage Ecosystem of an Abandoned Polymetallic Mine in Poland. Polish Journal of Environmental Studies, 28(4).
- Coram, N.J., Rawlings, D.E., 2002, Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 °C. Applied and Environmental Microbiology 68: 838–845.
- Coupland, K., Johnson, D.B., 2008, Evidence that the potential for dissimilatory ferric iron reduction is widespread among acidophilic heterotrophic bacteria. FEMS Microbiology Letters 279, 30–5.
- DasSarma, S., DasSarma, P., 2012, Halophiles. Wiley Online Library In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000394.pub3
- D'Auria, S., Rossi, M., Herman, P., Lakowicz, J.R., 2000, Pyruvate kinase from the thermophilic eubacterium *Bacillus acidocaldarius* as probe to monitor the sodium concentrations in the blood. Biophysical Chemistry, 84,167–176.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- D'Auria, S., DiCesare, N., Staiano, M., Gryczynski, Z., Rossi, M., Lakowicz, J.R., 2002, A novel fluorescence competitive assay for glucose determinations by using a thermostable glucokinase from the thermophilic microorganism *Bacillus stearothermophilus*. *Analytical Biochemistry*, 303,138–144.
- D'Auria, G., Artacho, A., Rojas, R., Bautista, J., Méndez, R., vd., 2018, Metagenomics of bacterial diversity in Villa Luz caves with sulfur water springs. *Genes*, 9(1), 55.
- Delabary, GS, Souza Lima, AO de., Silva, MAC da., 2017, Characterization of acidophilic bacteria related to *Acidiphilium cryptum* from a coal-mining-impacted river of South Brazil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* 20(2), 24-32.
- Delille, D., Gleizon, F., 2003, Distribution of enteric bacteria in Bacterial Diversity in Antarctica 345 Antarctic seawater surrounding the Port-aux-Français permanent station (Kerguelen Island). *Marine Pollution Bulletin*, 46(9), 1179–83.
- Diaby, N., Dold, B., Pfeifer, H.R., Holliger, C., Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2007, Microbial communities in a porphyry copper tailings impoundment and their impact on the geochemical dynamics of the mine waste. *Environmental Microbiology*, 9, 298–307. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01138.x
- Dold, B., 2017, Acid rock drainage prediction: a critical review. *Journal of Geochemical Exploration*, 172,120–132.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Hind, A., Bowman, J.P., Bond, P.L., 2004, Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2079–2088.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Bond, P.L. 2005, Analysis of differential protein expression during growth states of *Ferroplasma* strains and insights into electron transport for iron oxidation. *Microbiology*, 151, 4127–4137. doi: 10.1099/mic.0.28362-0
- Dopson, M., Johnson, D.B., 2012, Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur- metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology*, 14, 2620–2631.
- Dopson, M., 2016, Physiological and phylogenetic diversity of acidophilic bacteria. In: *Acidophiles – life in extremely acidic environments*. Ed. by R Quatrini & DB Johnson. Caister Academic Press.
- Drobner, E., Huber, H., Stetter, K.O., 1990, *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2922–2923.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dunfield, P.F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A.V., Stott, M.B., vd., 2007, Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. *Nature*, 450,879–82.
- Edwards, K. J., Gihring, T. M., Banfield, J.F., 1999, Seasonal variations in microbial populations and environmental conditions in an extreme acid mine drainage environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3627–3632.
- Eyers, L., George, I., Schuler, L., Stenuit, B., Agathos, S.N., El Fantroussi, S., 2004, Environmental genomics: exploring the unmined richness of microbes to degrade xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 123-130.
- Fabisch, M., Beulig, F., Akob, D.M., Kusel, K., 2013, Surprising abundance of Gallionella-related iron oxidizers in creek sediments at pH 4.4 or at high heavy metal concentrations. *Frontiers Microbiology*, 4, 390. doi: 10.3389/fmicb.2013.00390.
- Faith, D. P., 1992, Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61:1-10.
- Ferrer, M., Golyshina, O. V., Beloqui, A., Golyshin, P. N., Timmis, K.N., 2007, The cellular machinery of *Ferroplasma acidiphilum* is iron-protein-dominated. *Nature*, 445, 91–94. doi: 10.1038/nature05362
- Ferrer, M., Golyshina, O.V., Beloqui, A., Bottger, L.H., Andreu, J.M., vd., 2008, A purple acidophilic di-ferric DNA ligase from *Ferroplasma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 8878–8883. doi: 10.1073/pnas.0800071105
- Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R., Jackson, R.B., 2005, Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4117-4120.
- Fitzpatrick, R., Shand, P., Mosley, L., 2017, Acid sulfate soil evolution models and pedogenic pathways during drought and reflooding cycles in irrigated areas and adjacent natural wetlands. *Geoderma*, 308, 270–290.
- Fortin, D., Roy, M., Rioux, J., Thibault, P., 2000, Occurrence of sulfate-reducing bacteria under a wide range of physico-chemical conditions in Au and Cu-Zn mine tailings. *FEMS Microbiology Ecology*, 33, 197–208. doi: 10.1016/s0168-6496(00)00062-3
- Foti, M., Sorokin, D.Y., Lomans, B., Mussman, M., Zacharova, E.E., vd., 2007, Diversity, activity, and abundance of sulfatereducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2093-3000.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Futterer, O., Angelov, A., Liesegang, H., Gottschalk, G., Schleper, C., 2004, Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America, 101, 9091–6
- García-García JD, Sánchez-Thomas R, Moreno-Sánchez R (2016) Biorecovery of non-essential heavy metals by intra- and extracellular mechanisms in free-living microorganisms. *Biotechnology Advances*, 34(5), 859–873. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.003>.
- GeneJET™ Gel Extraction Kit, Kullanıcı Teknik Kitapçığı Erişim adresi: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012661_GeneJET_Gel_Extraction_UG.pdf. Erişim Tarihi: Şubat 2018
- Gentry, T.J., Pepper, I.L., Pierson, L.S., 2015 Microbial diversity and interactions in natural ecosystems. *Environmental Microbiology* (Third Edition). 441-460.
- Ghebremedhin, B., Layer, F., Konig, W., Konig, B., 2008, Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16 rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. 46, 1019-1025.
- Giloteaux, L., Duran, R., Casiot, C., Bruneel, O., Elbaz-Poulichet, F., Goni-Urriza, M., 2013, Three-year survey of sulfate-reducing bacteria community structure in Carnoules acid mine drainage (France), highly contaminated by arsenic. *FEMS Microbiology Ecology*, 83, 724–737. doi: 10.1111/1574-6941.12028.
- Goebel, B.M., Stackebrandt, E., 1994, Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1614–1621
- Golovacheva, R.S., Karavaiko, G.I., 1978, A new genus of thermophilic spore-forming bacteria, *Sulfobacillus*. *Microbiology*, 47, 658–664.
- Goltsman, D.S., Dasari, M., Thomas, B.C., Shah, M.B., VerBerkmoes, N.C., vd., 2013, New group in the *Leptospirillum clade*: cultivation-independent community genomics, proteomics, and transcriptomics of the new species “*Leptospirillum* group IV UBA BS. *Applied Environmental Microbiology*. 79, 5384–5393. doi: 10.1128/AEM.00202-13
- Goltsman, D.S., Deneff, V.J., Singer, S.W., VerBerkmoes, N.C., Lefsrud, M., vd., 2009, Community genomic and proteomic analyses of chemoautotrophic iron-oxidizing “*Leptospirillum rubrum*” (Group II) and “*Leptospirillum ferrodiazotrophum*” (Group III) bacteria in acid mine drainage biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 75, 4599–4615. doi: 10.1128/AEM.02943-08

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Golyshina, O.V., Timmis, K.N., 2005, *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environmental Microbiology*, 7,1277–1288
- Golyshina, O.V., Golyshina, N.P., Timmis, N.K., Ferrer, M., 2006, The pH optimum anomaly of intracellular enzymes of *Ferroplasma acidiphilum*. *Environmental Microbiology*, 8,416–425
- Golyshina, O.V., Yakimov, M.M., Lunsdorf, H., Ferrer, M., Nimtz, M., vd., 2009, *Acidiplasma aeolicum* gen. nov., sp. nov., a euryarchaeon of the family Ferroplasmaceae isolated from a hydrothermal pool, and transfer of *Ferroplasma cupricumulans* to *Acidiplasma cupricumulans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2815–2823.
- Golyshina, O., Ferrer, M., Golyshin, P.N., 2016, Diversity and physiologies of acidophilic archaea. In: *Acidophiles - life in extremely acidic environments*. Ed. by R Quatrini & DB Johnson. Caister Academic Press.
- Gomez, J. M., Cantero, D., & Webb, C., 2000, Immobilisation of *Thiobacillus ferrooxidans* cells on nickel alloy fibre for ferrous sulfate oxidation. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(3), 335-340.
- Gonzales, H., Jensen, T.E., 1998, Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios* 93,179–185.
- González-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E. O., Amann, R., Amils, R., 2003, Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4853-4865.
- González-Toril, E., Aguilera, Á. 2019, Microbial Ecology in Extreme Acidic Environments: Use of Molecular Tools. In *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 227-238). Academic Press.
- Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Fujita, R., 2007, Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1276–1285.
- Guay, R., Silver, M., 1975, *Thiobacillus acidophilus* sp. nov. - isolation and some physiological characteristics. *Canadian Journal of Microbiology* 21: 281–288.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gutiérrez, J.C., Amaro, F., Martín-González, A., 2015, Heavy metal wholecell biosensors using eukaryotic microorganisms: an updated critical review. *Front Microbiol* 6:48. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00048> (eCollection 2015)
- Gumulya, Y., Boxall, N., Khaleque, H., Santala, V., Carlson, R., Kaksonen, A., 2018, In a quest for engineering acidophiles for biomining applications: challenges and opportunities. *Genes*, 9(2), 116.
- Guo, X., You, X.Y., Liu, L.J., Zhang, J.Y., Liu, S.J., Jiang, C.Y., 2009, *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous- and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2415–20.
- Gupta, A., Dutta, A., Sarkar, J., Paul, D., Panigrahi, M.K., Sar, P., 2017, Metagenomic exploration of microbial community in mine tailings of Malanjkhand copper project, India. *Genomics data*, 12, 11-13.
- Gül, S., 2014, Balıkesir/Balya Pb-Zn maden atık sahasının biyojeokimyası ve asidik maden drenajı oluşumuna etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Hallberg, K.B., Johnson, D.B. 2003, Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy*, 71(1-2), 139-148.
- Hallberg, K.B., Coupland, K., Kimura, S., Johnson, D.B., 2006, Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in north wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2022–2030. doi: 10.1128/AEM.72.3.2022-2030.2006.
- Hallberg B. K., 2010, New perspectives in acid mine drainage microbiology, *Hydrometallurgy*, 104, 448-453.
- Hamamura, N., Olson, S.H., Ward, D.M., Inskeep, W.P., 2005, Diversity and functional analysis of bacterial communities associated with natural hydrocarbon seeps in acidic soils at Rainbow Springs, Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5943–5950.
- Hammer, Q., Harper, D. A. T., Ryan, P. D., 2008, PAST-Palaeontological Statistics, ver. 1.89. Paleontological Museum, University of Oslo, Noruega, <http://folk.uio.no/ohammer/past/index.html>.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M., 1998, Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, 5(10), R245-R249.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Handelsman, Jo, 2004, Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68.4, 669-685.
- Hankinson, T.R., Schmidt, E.L. 1988, An acidophilic and a neutrophilic nitrobacter strain isolated from the numerically predominant nitrite-oxidizing population of an Acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1536–1540.
- Hansda, A., Anshumali, V.K., 2016, A comparative review towards potential of microbial cells for heavy metal removal with emphasis on biosorption and bioaccumulation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(10):170. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2117-1>
- Hansel, C.M., Fendorf, S., Jardine, P.M., Francis, C.A., 2008, Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1620-1633.
- Hao, C., Wang, L., Gao, Y., Zhang, L., Dong, H. 2010, Microbial diversity in acid mine drainage of Xiang Mountain sulfide mine, Anhui Province, China. *Extremophiles*, 14(5), 465-474.
- Harms, J.M., Bartels, H., Schlunzen, F., Yonath, A., 2003, Antibiotics acting on the translational machinery. *Journal of Cell. Science*, 116, 1391-1393. Harrison, A.P., 1984, The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annual Review of Microbiology*, 38, 265–292.
- He, S., Tominski, C., Kappler, A., Behrens, S., Roden, E.E., 2016, Metagenomic analyses of the autotrophic Fe (II)-oxidizing, nitrate-reducing enrichment culture KS. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(9), 2656-2668.
- He, Z., Xiao, S., Xie, X., Zhong, H., Hu, Y., vd., 2007, Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine. *Extremophiles*, 11, 305–314. doi: 10.1007/s00792-006-0044-z
- He, Z., Xiao, S., Xie, X., Hu, Y., 2008, Microbial diversity in acid mineral bioleaching systems of dongxiang copper mine and Yinshan lead–zinc mine. *Extremophiles*, 12(2), 225-234.
- Head, I., Jones, D., Roling, W., 2006, Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Review Microbiology*, 4, 173-182.
- Hedrich, S., Schippers, A, 2016, Distribution of acidophilic microorganisms in natural and man-made acidic environments. In: *Acidophiles-life in extremely acidic environments*. Ed. by R Quatrini & DB Johnson. Norfolk, UK: Caister Academic Press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hoffert, J.R., 1947, Acid mine drainage. *Industrial and Engineering Chemistry*, 39(5):642–646.
- Holmes, D.E., Giloteaux, L., Williams, K.H., Wrighton, K.C., Wilkins, M.J., vd., 2013, Enrichment of specific protozoan populations during in situ bioremediation of uranium-contaminated groundwater. *ISME Journal*, 7, 1286-1298.
- Hu, Q., Guo, X., Liang, Y., Hao, X., Ma, L., Yin, H., Liu, X., 2015, Comparative metagenomics reveals microbial community differentiation in a biological heap leaching system. *Research in microbiology*, 166(6), 525-534.
- Hua, Z.S., Han, Y.J., Chen, L.X., Liu, J., Hu, M., vd. 2014, Ecological roles of dominant and rare prokaryotes in acid mine drainage revealed by metagenomics and metatranscriptomics. *ISME Journal*, 9, 1280–1294. doi: 10.1038/ismej.2014.212.
- Huang, L.N., Kuang, J.L., Shu, W.S., 2016, Microbial ecology and evolution in the acid mine drainage model system. *Trends in microbiology*, 24(7), 581-593.
- Hugenholtz, P., 2002, Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol.* 3, reviews0003.1-reviews0003.8.
- Huber, G., Stetter, K.O., 1991, *Sulfolobus metallicus*, new species, a novel strictly chemolithoautotrophic thermophilic archaeal species of metal-mobilizers. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 372– 378.
- Huber, G., Drobner, E., Huber, H., Stetter, K.O., 1992, Growth by aerobic oxidation of molecular hydrogen in archaea - a metabolic property so far unknown for this domain. *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 502–504.
- 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation, Teknik Kitapçık. https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf. Erişim Tarihi: Haziran 2019
- Ingledeu, W.J., 1982, *Thiobacillus ferrooxidans* the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochimica et Biophysica Acta*, 68, 89–117.
- Inglis, G.D., Kalischuk, L.D., 2004, Direct quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in feces of cattle by real-time quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2296-2306.
- Izard, J., Rivera, M., (Eds.). 2014, *Metagenomics for Microbiology*. Academic Press.
- Jameson, E., Rowe, O. F., Hallberg, K. B., Johnson, D. B., 2010, Sulfidogenesis and selective precipitation of metals at low pH mediated by *Acidithiobacillus* spp. and acidophilic sulfate-reducing bacteria. *Hydrometallurgy*, 104(3-4), 488-493.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jeffries, A.C., Kozera, C.J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H.P., vd., 2001, The complete genome of the Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:7835–7840
- Jerez, C.A., 2008, The use of genomics, proteomics and other OMICS technologies for the global understanding of biomining microorganisms. *Hydrometallurgy*, 94(1-4), 162-169.
- Jiang, Q.Q., Bakken, L.R., 1999, Comparison of *Nitrosospira* strains isolated from terrestrial environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 171–186. doi: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00646.x
- Johnson, D.B., Ghauri, M.A., Said, M.F. 1992, Isolation and characterization of an acidophilic, heterotrophic bacterium capable of oxidizing ferrous iron. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1423-1428.
- Johnson, D.B., 1995, Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria, *Journal Microbiological Methods*, 23, 205– 218.
- Johnson, D.B., 1998, Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 27(4), 307-317.
- Johnson, D. B., McGinness, S., Ghauri, M. A., 1998, Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments. *FEMS Microbiology Reviews*. 11, 63-70.
- Johnson, D. B., Dziurla, M. A., Kolmert, A., 2000, In "Proceedings from the Fifth International Conference on Acid Rock Drainage, Denver, Co." pp. 1209-1220. Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, Inc., Littleton, CO.
- Johnson, D.B., Stallwood, B., Kimura, S., Hallberg, K.B., 2006, Isolation and characterization of *Acidicaldus organivorus*, gen. nov., sp. nov.: a novel sulfur-oxidizing, ferric iron-reducing thermo-acidophilic heterotrophic Proteobacterium. *Archives of Microbiology*, 185(3):212–221
- Johnson, D.B., Sen, A.M., Kimura, S., Rowe, O., Hallberg, K.B., 2006. A novel biosulfidogenic system for the selective recovery of metals from acidic leach liquors and waste streams. *Mineral processing & extractive metallurgy*, 115, 19–24.
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2008, Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic micro-organisms. *Advances in microbial physiology*, 54, 201-255.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Johnson, D.B., 2012, Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 81, 2–12. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01293.x
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., Hedrich, S. 2014, Uncovering a microbial enigma: isolation and characterization of the streamer-generating, iron-oxidizing, acidophilic bacterium “*Ferrovum myxofaciens*.” *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 672–680. doi: 10.1128/AEM.03230-13.
- Johnson, S.S., Chevrette, M.G., Ehlmann, B.L., Benison, K.C. 2015, Insights from the metagenome of an acid salt lake: the role of biology in an extreme depositional environment. *PLoS One*, 10(4), e0122869.
- Joner, E., Anders, J., Andreas, L., Cruz, M., Oliver, S., Portal, J., Corinne, L., 2001, Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environmental Science Technology*, 35, 2773-2777.
- Jones, R.M, Hedrich, S., Johnson, D.B., 2013, *Acidocella aromatica* sp. nov.: an acidophilic heterotrophic Alphaproteobacterium with unusual phenotypic traits. *Extremophiles*, 17,841–50.
- Karavaiko, G.I., Bogdanova, T.I., Tourova, T.P., Kondrat’eva, T.F., Tsaplina, I.A., vd., 2005, Reclassification of ‘*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans*’ strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55,941–7.
- Kay, C.M., Rowe, O.F., Rocchetti, L., Coupland, K., Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2013, Evolution of microbial “streamer” growths in an acidic, metal-contaminated stream draining an abandoned underground copper mine. *Life (Basel)* 3: 189–210.
- Keasling, J.D., 1997, Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Annals of the New York Academy Science*, 829:243–249
- Keller, H., Friedli, T., 1992, Visibility limit of naked-eye sunspots. *Quarterly Journal of the Royal Astronomical Society*, 33, 83–89.
- Kelly, DP., Wood, A.P., 2000, Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 511–516.
- Keyhani, S., Lopez, J.L., Clark D.S., Keasling, J.D., 1996, Intracellular polyphosphate content and cadmium tolerance in *Anacystis nidulans* R2. *Microbios*, 88,105–114

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim, H.J., Jeong, H., Lee S.J., 2018, Synthetic biology for microbial heavy metal biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(4):1191–1203. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0751-6>
- Kishimoto, N., Kosako, Y., Wakao, N., Tano, T., Hiraishi, A., 1995, Transfer of *Acidiphilium facilis* and *Acidiphilium aminolytica* to the genus *Acidocella* gen. nov., and emendation of the genus *Acidiphilium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 85–91.
- Korehi, H., Blöthe, M., Schippers, A., 2014, Microbial diversity at the moderate acidic stage in three different sulfidic mine tailings dumps generating acid mine drainage. *Research in microbiology*, 165(9), 713-718.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., Schloss, P. D., 2013, Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5112-5120.
- Kristjansson, J. K., 1991, *Thermophilic bacteria*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kuang, J.L., Huang, L.N., Chen, L.X., Hua, Z.S., Li, S.J., vd., 2013, Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. *ISME Journal*. 7, 1038–1050
- Kucera, J., Bouchal, P., Cerna, H., Potesil, D., Janiczek, O., vd., 2012, Kinetics of anaerobic elemental sulfur oxidation by ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans* and protein identification by comparative 2-DE-MS/MS. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 561–573. doi: 10.1007/s10482-011-9670-2.
- Kulakovskaya, T., 2018, Inorganic polyphosphates and heavy metal resistance in microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 139.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33:7, 1870-1874.
- Langworthy, T.A., 1982, Lipids of *Thermoplasma*. *Methods in Enzymology*, 88, 396–406.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R., 1985, Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
- Lentzen, G., Schwarz, T., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, vol. 72, pp. 623–634.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leptospirillum* besiyeri erişim adresi: https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium882.pdf. Mart 2019.
- Liljeqvist, M., Ossandon, F.J., González, C., Rajan, S., Stell, A., Valdes, J., Dopson, M., 2015, Metagenomic analysis reveals adaptations to a cold-adapted lifestyle in a low-temperature acid mine drainage stream. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(4).
- Liu, H., Yin, H., Dai, Y., Dai, Z., Liu, Y., Li, Q., Jiang, H., Liu, X., 2011, The co-culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidiphilium acidophilum* enhances the growth, iron oxidation, and CO₂ fixation. *Archives of Microbiology*, 193: 857–866. Liu, J., Hua, Z.S., Chen, L.X., Kuang, J.L., Li, S.J., vd., 2014, Correlating microbial diversity patterns with geochemistry in an extreme and heterogeneous environment of mine tailings. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 3677–3686.
- Liu, J.L., Yao, J., Wang, F., Min, N., Gu, J.H., Li, Z.F., Alakangas, L., 2019, Bacterial diversity in typical abandoned multi-contaminated nonferrous metal (loid) tailings during natural attenuation. *Environmental pollution*, 247, 98-107.
- Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., Knight, R., 2007, Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:1576-1585.
- Lukhele, T., Selvarajan, R., Nyoni, H., Mamba, B.B., Msagati, T.A., 2019, Acid Mine Drainage as Habitats for Distinct Microbiomes: Current Knowledge in the Era of Molecular and Omic Technologies. *Current Microbiology*, 1-18.
- Macalady J.L., Vestling M.M., Baumler, D., Boekelheide, N., Kaspar, C.W., Banfield, J.F., 2004, Tetraether-linked membrane monolayers in *Ferroplasma* spp: a key to survival in acid. *Extremophiles*, 8, 411–419
- Maila, M.P., Randima, P., Drønen, K., Cloete, T.E., 2006, Soil microbial communities: influence of geographic location and hydrocarbon pollutants. *Journal of Soil Biology and Biochemistry*, 38, 303-310.
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R., 2008, The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34, 265-276.
- Mardis, E.R., 2013, Next-generation sequencing platforms. *Annual Review Analytical Chemistry*, 6, 287-303.
- Mardanov, A.V., Beletsky, A.V., Ivasenko, D.A., Karnachuk, O.V., Ravin, N.V., 2017, Metagenome sequence of a microbial community from the gold mine tailings in the Kuzbass area, Russia. *Genome Announcements*, 5(49), e01355-17.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mardanov, A.V., Gumerov, V.M., Beletsky, A.V., Ravin, N.V. 2018. Microbial diversity in acidic thermal pools in the Uzon Caldera, Kamchatka. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(1), 35-43.
- Margaryan, A., Panosyan, H., Mamimin, C., Trchounian, A., Birkeland, N.K., 2019, Insights into the Bacterial Diversity of the Acidic Akhtala Mine Tailing in Armenia Using Molecular Approaches. *Current microbiology*, 76(4), 462-469.
- Margesin, R., Labbe, D., Schinner, F., Greer, C., Whyte, L., 2003, Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 3085-3092.
- Martinez R.J., Beazley M.J., Sobecky, P.A., 2014, Phosphate-mediated remediation of metals and radionuclides. *Advances in Ecology*, <https://doi.org/10.1155/2014/786929>
- Mendez-Garcia, C., Mesa, V., Sprenger, R.R., Richter, M., Diez, M.S., vd., 2014, Microbial stratification in low pH oxic and suboxic macroscopic growths along an acid mine drainage. *ISME J.* 8, 1259–1274. doi: 10.1038/ismej.2013.242
- Méndez-García, C., Peláez, A.I., Mesa, V., Sánchez, J., Golyshina, O. V., Ferrer, M., 2015, Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Frontiers in microbiology*, 6, 475.
- Metzker, M.L., 2010, Sequencing technologies -the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11 (1), 31.
- Michael, P.S., 2013, Ecological impacts and management of acid sulphate soil: a review. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution* 10, 13–24.
- Minh, L., Tuong, T., Mensvoort, M B.J., 1997, Contamination of surface water as affected by land use in acid sulfate soils in the Mekong River Delta, Vietnam. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 61,19–27.
- Monachese M, Burton JP, Reid G (2012) Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Appl Environ Microbiol* 78(18):6397– 6404. <https://doi.org/10.1128/AEM.01665-12>
- Morales, T.A., Dopson, M., Athar, R., Herbert Jr, R.B., 2005, Analysis of bacterial diversity in acidic pond water and compost after treatment of artificial acid mine drainage for metal removal. *Biotechnology and bioengineering*, 90(5), 543-551.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moreau, J. W., Zierenberg, R.A., Banfield, J.F., 2010, Diversity of dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*) in a salt marsh impacted by long-term acid mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4819–4828. doi: 10.1128/AEM.03006-09
- Morita, R.Y., 1975, Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39(2), 144.
- Morozkina, E.V., Slutskeya, E.S., Fedorova, T.V., Tugay, T.I., Golubeva, L.I., Koroleva, O.V., 2010, Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(1), 1-14.
- Moya-Beltran, A., Cardenas, J.P., Covarrubias, P.C., Issotta, F., Ossandon, F. J., vd., 2014., Draft genome sequence of the nominated type strain of “*Ferroplasma myxofaciens*,” an acidophilic, iron-oxidizing betaproteobacterium. *Genome Announcement*. 2:e00834-14. doi: 10.1128/genomeA.00834-14
- Muyzer, G., Waal, E.C.D., Uitterlinden, A.G., 1993, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695_700.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998, Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- Muyzer, G., 1999, Genetic fingerprinting of microbial communities present status and future perspectives. *Methods of microbial community analysis*. In: *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada
- Nemati, M., Webb, C. 1999, Combined biological and chemical oxidation of ferrous sulfate using immobilised *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 74(6), 562-570.
- Nicolaidis, A.A. 1987, Microbial mineral processing: the opportunities for genetic manipulation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 38(3), 167-185.
- Nicomrat, D., Dick, W.A., Tuovinen, O. H. 2006, Assessment of the microbial community in a constructed wetland that receives acid coal mine drainage. *Microbial ecology*, 51(1), 83-89.
- Ninfa, A. J., Jiang, P., 2005, PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Current Opinion Microbiology*, 8, 168–173. doi: 10.1016/j.mib.2005.02.011

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Norris, P.R., Murrell, J.C., Hinson, D., 1995, The potential for diazotrophy in iron- and Nitschke, W., Bonnefoy, V., 2016, Energy acquisition in low-pH environments. In: *Acidophiles - life in extremely acidic environments*. Ed. by R Quatrini & DB Johnson. Caister Academic Press, pp. 19–48.
- Nocker, A., Burr, M., Camper, A., 2007, Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology*, 54, 276-289.
- sulfur-oxidizing acidophilic bacteria. *Arch. Microbiol.* 164, 294–300. doi: 10.1007/BF02529964
- Nuñez, H., Moya-Beltrán, A., Covarrubias, P.C., Issotta, F., Cárdenas, J.P., (2017) Molecular systematics of the genus *Acidithiobacillus*: insights into the phylogenetic structure and diversification of the taxon. *Frontiers in Microbiology* 8: 30.
- Ohmura, N., Matsumoto, N., Sasaki, K., Saiki, H., 2002, Electrochemical regeneration of Fe(III) to support growth on anaerobic iron respiration. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 405–407. doi: 10.1128/AEM.68.1.405-407.2002.
- Okibe, N., Gericke, M., Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2003, Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Applied Environmental Microbiology*, 69(4), 1936-1943.
- Okorokov, L.A., Lichko, L.P., Andreeva, N.A., 1983, Changes of ATP, polyphosphate and K⁺ contents in *Saccharomyces carlsbergensis* during uptake of Mn²⁺ and glucose. *Biochemistry International*, 6:481–488
- Oliveira, R. R. M., Nunes, G. L., de Lima, T. G. L. vd., 2018, PIPEBAR and OverlapPER: tools for a fast and accurate DNA barcoding analysis and paired-end assembly. *BMC Bioinformatics*, 19, 297. doi:10.1186/s12859-018-2307-y
- Oliver, J.D., 2005, The viable but non culturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*. 43, 93_100.
- Osorio, H., Mangold, S., Denis, Y., Nancuqueo, I., Esparza, M., Johnson, D.B., vd., 2013, Anaerobic sulfur metabolism coupled to dissimilatory iron reduction in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 2172–2181. doi: 10.1128/AEM.03057-12
- Oulas, A., Pavludi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G.A., Papanikolaou, N., vd., 2015, Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinformatics and biology insights* 9, BBI. S12462.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Panigrahi, S., Velraj, P., Rao, T.S., 2019, Functional Microbial Diversity in Contaminated Environment and Application in Bioremediation. In *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 359-385). Academic Press.
- Parro, V., Moreno-Paz, M., 2003, Gene function analysis in environmental isolates: the nif regulon of the strict iron oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100, 7883–7888. doi: 10.1073/pnas.1230487100.
- Parro, V., Moreno-Paz, M., 2004, Nitrogen fixation in acidophile iron-oxidizing bacteria: the nif regulon of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Research Microbiology*, 155, 703–709. doi: 10.1016/j.resmic.2004.05.010.
- Pepper, I.L., Zerzghi, H.G., Bengson, S.A., Iker, B.C., Banerjee, M.J., Brooks, J.P., 2012, Bacterial populations within copper mine tailings: long-term effects of amendment with Class A biosolids. *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), 569-577.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009, Xerophiles. In: *Fungi and food spoilage*. Springer, US, pp 339–355
- Pivovarova, T.A., Kondrateva, T.F., Batrakov, S.G., Esipov, S.E., Sheichenko, V.I., Bykova, S.A., 2002, Phenotypic features of *Ferroplasma acidiphilum* strains Yt and Y-2. *Microbiology (Moscow)*, 71, 809–818.
- Promega, pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual, <http://www.promega.co.uk/resources/protocols/technical-manuals/0/pgemt-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>, Aralık, 2017
- Pronk, J.T., Liem, K., Bos, P., Kuenen, J. G., 1991, Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2063–2068.
- Pronk, J.T., Meulenbergh, R., Hazeu, W., Bos, P., Kuenen, J.G., 1990, Oxidation of reduced inorganic sulfur-compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiology Letter*, 75, 293–306. doi: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04103.x
- Poindexter, J.S., 1981, Oligotrophy. In: Alexander M (ed) *Advances in microbial ecology*. Springer, US, pp 63–89
- PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit User Guide; Microbial Culture and Transport Media Samples. MAN0014332. Erişim adresi: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014332_PureLink_Microbiome_CultureMedia_UG.pdf

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D. S., Bonnefoy, V., 2009, Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics*, 10, 394, doi:10.1186/1471-2164-10-394
- Quatrini, R., Jedlicki, E., Holmes, D.S., 2005, Genomic insights into the iron uptake mechanisms of the biomining microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 32, 606–614. doi: 10.1007/s10295-005-0233-2
- Quatrini, R., Johnson, D.B., 2018, Microbiomes in extremely acidic environments: functionalities and interactions that allow survival and growth of prokaryotes at low pH. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 139–147.
- Quehenberger, J., Shen, L., Albers, S.V., Siebers, B., Spadiut, O., 2017, *Sulfolobus*-a potential key organism in future biotechnology. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2474.
- Ram, R.J., Verberkmoes, N.C., Thelen, M.P., Tyson, G.W., Baker, B.J., vd. 2005, Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science*, 308, 1915–1920. doi: 10.1126/science.1109070
- Rao, N.N., Gómez-García, M.R., Kornberg, A., 2009, Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annual Review Biochemistry*, 78(1), 605–647
- Rastogi, G., Stetler, L.D., Peyton, B.M., Sani, R.K., 2009, Molecular analysis of prokaryotic diversity in the deep subsurface of the former Homestake gold mine, South Dakota, USA. *Journal of Microbiology*, 47, 371-384.
- Rastogi, G., Sani, R.K., 2011, Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In: Ahmad, I., Ahmad, F., Pichtel, J. (Eds.), *Microbes and Microbial Technology*. Springer Nature, UK, pp. 29-57.
- Rawlings, D.E., Tributsch, H., Hansford, G.S., 1999, Reasons why 'Leptospirillum'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology*, 145, 5–13.
- Ren-Long, J., Wu, J., Chaw, S.M., Tsai, C.W., Tsen, S.D., 1999, A novel species of thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus yangmingensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1809–1816.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Richardson, R.E., Bhupathi Raju, V.K., Song, D.L., Goulet, T.A., Alvarez-Cohen, L., 2002, Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques. *Environmental Science Technology*, 36, 2652-2662.
- Roger, M., Castelle, C., Guiral, M., Infossi, P., Lojou, E., vd., 2012, Mineral respiration under extreme acidic conditions: from a supramolecular organization to a molecular adaptation in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochemical. Society. Transaction*, 40, 1324–1329. doi: 10.1042/BST20120141
- Rohwerder, T., Sand, W., 2003, The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology*, 149, 1699–1710. doi: 10.1099/mic.0.26212-0.
- Rohwerder, T., Sand, W., 2007, Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering in Life Science*, 7, 301–309. doi: 10.1002/elsc.200720204.
- Rowe, O.F., Sanchez-Espana, J., Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2007, Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems. *Environmental Microbiology*. 9, 1761–1771. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01294.x.
- Rowe, O.F., Johnson, D.B., 2008. Comparison of ferric iron generation by different species of acidophilic bacteria immobilized in packed-bed reactors. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 68–77.
- Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M.L., Koretke, K.K., Volker, C., vd., 2000, The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature*, 407, 508–13.
- Rybicki, E., 1990, The classification of organisms at the edge of life, or problems with virus systematics. *South African Journal of Science*, 86,182–186.
- Sambrook, J., Russell, D.W., (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual I-II-II*, New York: CSHL Press.
- Sağlam, E.S., 2015, Determination of acidic mine drainage potential and the environmental impacts of sulphidic mines in Espiye (Giresun): a mineralogical, geochemical and geomicrobiological Approach. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sağlam, E.S., Akçay, M., Çolak, D.N., Bektaş, K.İ., Beldüz, A.O., 2016, Generation of acid mine drainage around the Karaerik copper mine (Espiye, Giresun, NE Turkey): implications from the bacterial population in the Acısu effluent. *Extremophiles*, 20(5), 673-685.
- Sajjad, W., Zheng, G., Zhang, G., Ma, X., Xu, W., vd., 2018, Diversity of prokaryotic communities indigenous to acid mine drainage and related rocks from Baiyin open-pit copper mine stope, China. *Geomicrobiology journal*, 35(7), 580-600.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanchez-Andrea, I., Rojas-Ojeda, P., Amils, R., Sanz, J.L., 2012, Screening of anaerobic activities in sediments of an acidic environment: Tinto River. *Extremophiles*, 16, 829–839. doi: 10.1007/s00792-012-0478-4
- Santos, E.C.D., Mendonça, Silva., J.C. de, Duarte, H.A., 2016, Pyrite oxidation mechanism by oxygen in aqueous medium. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120, 2760–2768.
- Sanz, J.L., Rodriguez, N., Diaz, E.E., Amils, R., 2011, Methanogenesis in the sediments of Rio Tinto, an extreme acidic river. *Environmental Microbiology*, 13, 2336–2341. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02504.x
- Satyanarayana, T., Chandralata R., Shivaji, S., 2005, Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current science*, 78-90.
- Schippers, A., Hallmann, R., Wentzien, S., Sand, W., 1995, Microbial diversity in uranium mine waste heaps. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2930-2935.
- Schippers, A., Von Rège, H., Sand, W., 1996, Impact of microbial diversity and sulfur chemistry on safeguarding sulfidic mine waste. *Minerals Engineering*, 9(10), 1069-1079.
- Schippers, A., Sand, W., 1999, Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 319–321.
- Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic., D, vd., 1995, *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *Journal of Bacteriology*, 177, 7050–9

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Segerer, A., Langworthy, T.A., Stetter, K.O., 1988, *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov from solfatara fields. *Systematic and Applied Microbiology*, 10, 161–171.
- Segerer, A., Neuner, A., Kristjansson, J.K., Stetter, K.O., 1986, *Acidianus infernus* gen. nov., spec. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur- metabolizing archaeobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36, 559–564.
- Sen, A. M., Johnson, D. B., 1999, In *Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21st Century* (R. Amils and A. Ballester, eds.), Vol. 9A, pp. 709-718. Elsevier, Amsterdam.
- Sghaier, H., Ghedira, K., Benkahla, A., Barkallah, I., 2008, Basal DNA repair machinery is subject to positive selection in ionizing-radiation-resistant bacteria. *BMC Genomics*, 9(1), 297
- Sharma, A., Kawarabayasi, Y., Satyanarayana, T., 2012, Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles*, 16(1), 1-19.
- Sharma, A., Deepak P. Tulasi S., 2016, Acidophilic microbes: biology and applications. *Biotechnology of Extremophiles*. Springer, 215-241.
- Shimada, H., Nemoto, N., Shida, Y., Oshima, T., Yamagishi, A., 2002, Complete polar lipid composition of *Thermoplasma acidophilum* HO-62 determined by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Bacteriology*, 184, 556–563
- Shrestha, N., Chilkoor, G., Dhiman, S.S., Sani, R.K., Gadhamshetty, V., 2019, Extremophile biology for microbial electrochemistry applications. In *Microbial Electrochemical Technology* (pp. 353-374). Elsevier.
- Silva, F.V.M., Gibbs, P., 2004, Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 353–360.
- Simon, J., 2002, Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 285–309. doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00616.x
- Smith, C.J., Osborn, A.M., 2009, Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67, 6-20.
- Smit, E., Leeflang, P., Wernars, K., 1997, Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 23, 249_261.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Srilatha, B., 2011, Role of Genome based Tools in Environmental Microbiology. *Journal of Microbial Biochemical Technology*, 3, 106-111. doi:10.4172/1948-5948.1000060
- Stohr, R., Waberski, A., Volker, H., Tindall, B.J., Thomm, M., 2001, *Hydrogenothermus marinus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, recognition of *Calderobacterium hydrogenophilum* as a member of the genus *Hydrogenobacter* and proposal of the reclassification of *Hydrogenobacter acidophilus* as *Hydrogenobaculum acidophilum* gen. nov., comb. nov., in the phylum 'Hydrogenobacter/Aquifex'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1853–1862.
- Sun, M., Xiao, T., Ning, Z., Xiao, E., Sun, W., 2015, Microbial community analysis in rice paddy soils irrigated by acid mine drainage contaminated water. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(6), 2911-2922.
- Sun, W., Xiao, E., Krumins, V., Dong, Y., Li, B., vd., 2019, Comparative Analyses of the Microbial Communities Inhabiting Coal Mining Waste Dump and an Adjacent Acid Mine Drainage Creek. *Microbial Ecology*, 1-14.
- Tan, G.L., Shu, W.S., Hallberg, K.B., Li, F., Lan, C.Y., Huang, L.N., 2007, Cultivation-dependent and cultivation-independent characterization of the microbial community in acid mine drainage associated with acidic Pb/Zn mine tailings at Lechang, Guangdong, China. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 118–126. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00216.x
- Tarasevich, Y.I., Klimova, G.M., 2001, Complex-forming adsorbents based on kaolinite, aluminium oxide and polyphosphates for the extraction and concentration of heavy metal ions from water solutions. *Applied Clay Science*, 19, 95–101
- Toptaş, Y., 2016, Halköy Asidik Maden Drenajlarında Prokaryotik Çeşitliliğin Geleneksel ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi ve Arsenik Gideriminde Kullanılabilirliği. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Torsvik, V., Øvrea°, L., 2002, Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion Microbiology*, 5, 240-245.
- Tse, C., Ma, K., 2016, Growth and Metabolism of Extremophilic Microorganisms. *Biotechnology of Extremophiles*:. Springer, 1-46.
- Tuncel S., Arı N., Yoleri B., Şahiner M., 2017, Dünyada ve Türkiye’de Demir. MTA Genel Müdürlüğü Fizibilite Etütleri Daire Başkanlığı.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., vd., 2004, Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428, 37–43. doi: 10.1038/nature02340

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tyson, G.W., Lo, I., Baker, B.J., Allen, E.E., Hugenholtz, P., Banfield, J.F., 2005, Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6319–6324. doi: 10.1128/AEM.71.10.6319-6324.2005
- Ulloa, J.R., Moya-Beltrán, A., Rojas-Villalobos, C., Nuñez, H., Chiacchiarini, P., vd., 2019, Domestication of local microbial consortia for efficient recovery of gold through top-down selection in airlift bioreactors. *Frontiers in microbiology*, 10, 60.
- UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit, Instruction Manual. Version 05172010. Erişim Adresi: http://www.bjzeping.com/Upload_File/shiji_caozuoshouce/12224-50.pdf
- Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S., Çakiris, A., 2011, Yeni Nesil DNA Dizileme (New Generation DNA Sequencing). *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1(1), 11-18.
- Valdes, J., Veloso, F., Jedlicki, E., Holmes, D., 2003, Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *BMC Genomics*, 4, 51. doi: 10.1186/1471-2164-4-51.
- Valdes, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R. J., Tettelin, H., Blake, R. II., vd. 2008, *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*, 9, 597. doi: 10.1186/1471-2164-9-597
- Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guiliani, N., Shabanowitz, J., Jerez, C.A., 2006, Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnology advances*, 24(2), 197-211.
- Van Rossum, T., Pylatuk, M.M., Osachoff, H.L., Griffiths, E.J., Lo, R., vd., 2016, Microbiome analysis across a natural copper gradient at a proposed Northern Canadian mine site. *Frontiers in Environmental Science*, 3, 84.
- Vardar, N., 2011, Investigation of biochemical and microbiological characteristics of acid mine drainage in Balıkesir-Balya Region by molecular biology techniques. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Vera, M., Schippers, A., Sand, W., 2013, Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7529–41.
- Vogel, A. I., 1989, *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*. 5th edn. Longman, London, pp 287–310.

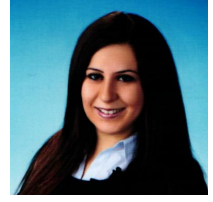
KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Volant, A., Desoeuvre, A., Casiot, C., Lauga, B., Delpoux, S., vd., 2012, Archaeal diversity: temporal variation in the arsenic-rich creek sediments of Carnoules Mine, France. *Extremophiles*, 16, 645–657. doi: 10.1007/s00792-012-0466-8.
- Volant, A., Bruneel, O., Desoeuvre, A., Héry, M., Casiot, C., vd., 2014, Diversity and spatiotemporal dynamics of bacterial communities: physicochemical and other drivers along an acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, 90, 247–263
- Vossenberg, J.L., Driessen, A.J., Zillig, W., Konings, W.N., 1998, Bioenergetics and cytoplasmic membrane stability of the extremely acidophilic, thermophilic archaeon *Picrophilus oshimae*. *Extremophiles*, 2, 67–74
- Wagner, M., Nielsen, P.H., Loy, A., Nielsen, J.L., Daims, H., 2006, Linking microbial community structure with function: fluorescence in situ hybridization-micro autoradiography and isotope arrays. *Current Opinion Biotechnology*, 17, 83-91.
- Waksman, S.A., Joffe, J.S., 1922, Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism. *Journal of Bacteriology*, 7, 239–256.
- Walton, K.C., Johnson, D.B., 1992, Microbiological and chemical characteristics of an acidic stream draining a disused copper mine. *Environmental Pollution*, 76(2), 169-175.
- Wang, Q., Xie, S., Hu, R., 2013, Bioaugmentation with *Arthrobacter* sp. strain DAT1 for remediation of heavily atrazine-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77, 63_67.
- Ward, N.L., Challacombe, J.F., Janssen, P.H., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Wu, M., vd., 2009, Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2046–2056. doi: 10.1128/AEM.02294-08
- Warren, L.A., 2011, Acid rock drainage. In: *Encyclopedia of geobiology*. Springer Netherlands, pp. 5–8
- Wellington, E.M., Berry, A., Krsek, M., 2003, Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Current Opinion Microbiology*, 6, 295-301.
- Wichlacz, P.L., Unz, R.F., Langworthy, T.A., 1986, *Acidiphilium angustum* sp. nov, *Acidiphilium facilis* sp. nov, and *Acidiphilium rubrum* sp. nov-acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic coal-mine drainage. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36, 197–201.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wielinga, B., Lucy, J.K., Moore, J.N., Seastone, O.F., Gannon, J.E., 1999, Microbiological and geochemical characterization of fluviially deposited sulfidic mine tailings. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1548–1555.
- Williams, K.P., Kelly, D.P., 2013, Proposal for a new class within the phylum Proteobacteria, Acidithiobacillia classis nov., with the type order Acidithiobacillales, and emended description of the class Gammaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2901–2906.
- Wilmes, P., Bond, P.L., 2006, Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends Microbiology*, 14, 92-97.
- Yang, Y., Wan, M.X., Shi, W.Y., Peng, H., Qiu, G.Z., vd., (2007). Bacterial diversity and community structure in acid mine drainage from Dabaoshan Mine, China. *Aquatic Microbial Ecology*, 47(2), 141-151.
- Yang, Y., Shi, W., Wan, M., Zhang, Y., Zou, L., Huang, J., Qui, G., Liu, X. (2008). Diversity of bacterial communities in acid mine drainage from the Shen-bu copper mine, Gansu province, China. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(1), 1-12.
- Yu, C.P., Chu, K.H., 2005, A quantitative assay for linking microbial community function and structure of a naphthalene-degrading microbial consortium. *Environmental Science and Technology*, 39, 9611-9619.
- Yuhong, Z., Shi, P., Liu, W., Meng, K., Bai, Y., Wang, G., vd., 2009. Lipase diversity in glacier soil based on analysis of metagenomic DNA fragments and cell culture. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 888-897.
- Zhang, Y.F., Peng, A.A., Yu, Y.A.N.G., Liu, J.S., Qiu, G.Z., 2013, Isolation, characterization of *Acidiphilium* sp. DX1-1 and ore bioleaching by this acidophilic mixotrophic organism. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 23.6,1774-1782.
- Zhang, X., Tang, S., Wang, M., Sun, W., Xie, Y., Peng, H., Giesy, J.P., 2019, Acid mine drainage affects the diversity and metal resistance gene profile of sediment bacterial community along a river. *Chemosphere*, 217, 790-799.
- Zhilina, T.N, Appel, R., Probian, C., Brossa, E.L., Harder, J., Widdel, F., Zavarzin, G.A., 2004, *Alkaliflexus imshenetskii* gen. nov. sp. nov., a new alkaliphilic gliding carbohydrate-fermenting bacterium with propionate formation from a soda lake. *Archives of Microbiology*, 182(2–3), 244–23
- Zwolinski, M.D., 2007, DNA sequencing: strategies for soil microbiology. *Soil Science Society of America Journal*, 71, 592_600.

ÖZGEÇMİŞ



1- KİŞİSEL BİLGİLER

ADI SOYADI BELMA NURAL YAMAN
YAZIŞMA ADRESİ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi,
Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Eskişehir
E-POSTA bnural@ogu.edu.tr, nuralbelma@gmail.com
TELEFON 0222 239 37 50 / 2757(laboratuvar) /3182 (ofis)/ 0537 265 80 65 (mobil)

2- EĞİTİM

- Doktora Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı
2014 Y.Lisans Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik
Anabilim Dalı.
2012 Lisans Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi,
Biyomühendislik Bölümü, Biyomühendislik Programı

3- AKADEMİK ÜNVANLAR

Araştırma Görevlisi 24.01.2014

4- YABANCI DİL BİLGİSİ

İngilizce İyi

5- TAMAMLADIĞI TEZLER

2012-2014 Yüksek Lisans Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı *Theileria annulata*'nın Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Analizi.

7- PROJELER

1. Bor ile Kirlenmiş Çevrelerin Genotoksosite/Mutajenite Potansiyelleri ve Bu Çevrelerden İzole Edilecek Mikrobiyal Kommünitenin Bor Toleranslarının Belirlenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, BAPK-D (2016/19D51), Araştırmacı, 2014-2016.
2. Asit Maden Drenajı Bakteriyel Komünitesinin Metagenomik Analizi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi BAPK-D (2017/19D12), Araştırmacı, 2017- 2018.
3. Asidik Ortamlardan Prokaryotik Çeşitliliğinin Kültüre Bağlı ve Kültürden Bağımsız Yeni Nesil Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi BAPK-B2 (2017/19047), Araştırmacı, 2017- devam ediyor.
4. Yüksek bor içerikli çevrelerdeki bakteriyel çeşitliliğin kültüre bağımlı ve kültürden bağımsız yeni nesil moleküler yöntemlerle incelenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi BAPK-B2 (2018/38064), Araştırmacı, 2018-devam ediyor.
5. Yeni Biyokatalitik Sistemler Olarak Mikromalzeme Üzerine İmmobilize Edilmiş Lakkazın Çevresel Uygulaması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi BAPK-B1 (2018/ 19071), Araştırmacı, 2018-devam ediyor.
6. Geleceğin Biyoteknolojileri Arıyor, TÜBİTAK 4004 (2018/ 118B969), Eğitimci, 2018.
7. Eş Zamanlı Fe⁺² Ve As⁺³ Oksidasyonu ve Schwertmannite Çökmesi ile Asit Maden Sızıntı Sularından Arsenik Giderimi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi BAPK-D (2019/38D13), Araştırmacı, 2019-devam ediyor.

8. MAKALELER

A-1 SCI-Expanded, SCI, AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan tam makale

1. Yakarsönmez S., Çayır E., Mutlu Ö., **Nural B.**, Sarıyer E., Topuzoğulları M., Milward R. M., Cooper R. P., Erdemir A. & Turgut-Balık D. Cloning, Expression and Characterization of The Gene Encoding The Enolase From *Fusobacterium nucleatum*. Applied Biochemistry and Microbiology. 52(1):23-30. DOI. 10.7868/S0555109916010141.(2016).
2. **Nural B.**, Erdemir A., Mutlu O., Yakarsonmez S., Danis O., Topuzoğulları M. & Turgut-Balık D. Biochemical and in silico Characterization of L-Lactate Dehydrogenase of *Theileria annulata*. Molecular Biotechnology. 58(4):256-267. DOI 10.1007/s12033-016-9924-3 (2016).
3. **Nural Yaman, B.**, Deniz Sonmez, G., Aytar Celik, P., Korkmaz, F., Mutlu, M. B., & Cabuk, A. Culture-dependent diversity of boron-tolerant bacteria from boron mine tailings pond and solid

wastes. Water and Environment Journal. 33:574-581. <https://doi.org/10.1111/wej.12429> (2019).

A-2 SCI-Expanded, SSCI ve AHCI dışındaki uluslararası indeksler tarafından taranan dergilerde yayımlanan tam makale.

1. Yiğit Şat E., **Nural Yaman B.**, Gedikli S., Aytar Çelik P., Çabuk A. Heat and pH Stable Protease Produced By A Bacterium Isolated From Fields With High Boron. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. Accepted.
2. **Nural Yaman B.**, Mutlu MB., Aytar Çelik P., Çabuk A. Metagenomics (16S Amplicon Sequencing) and DGGE Analysis of Bacterial Diversity of Acid Mine Drainage. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. Accepted.

9-BİLDİRİLER

B-2 Uluslararası kongre, sempozyum, panel, çalıştay gibi bilimsel, sanatsal toplantılarda sözlü olarak sunulan ve özet metin olarak yayımlanan bildiri.

1. **Nural Yaman B.**, Mutlu MB., Aytar Çelik P., Çabuk A. Metagenomics Analysis of Acidic Mine Drainage in Çan, Çanakkale. BioMicroWorld2018, Torremolinos İspanya, 24-25 Mayıs 2018

B-3 Uluslararası kongre, sempozyum, panel, çalıştay gibi bilimsel, sanatsal toplantılarda poster olarak sergilenen bildiri.

1. **Nural B.**, Erdemir A., Aktaş M., Dumanlı N., Turgut-Balık D. "Evaluation Of The Lactate Dehydrogenase Gene Sequence Of *Theileria annulata* To Find A Possible Solution For Protein Being Synthesised From Inactive To Active Form." 2nd International Congress of Molecular Biology Association of Turkey. Istanbul, Türkiye, 22-23 Kasım 2013.
2. **Nural B.**, Erdemir A., Turgut-Balık D. " Production of Lactate Dehydrogenase from *Theileria annulata* in High Purity." 2nd International BAU Drug Design Congress. Istanbul Türkiye, 17-19 Nisan 2014.
3. **Nural B.**, Erdemir A., Danis O., Turgut-Balık D. Kinetic Analysis of Lactate Dehydrogenase from *Theileria annulata*. MOLCHEM2014. Istanbul, Türkiye, 19 Aralık 2014.
4. Yakarsonmez S., **Nural B.**, Sarıyer E., Turgut-Balık D. Optimum pH Determination and Thermostability Analysis of Recombinant *Fusobacterium nucleatum* Enolase Enzyme MOLCHEM2014. Istanbul, Türkiye, 19 Aralık 2014.
5. **Nural B.**, Erdemir A., Mutlu Ö., Turgut-Balık D. "Homology Modelling of Lactate Dehydrogenase

from *Theileria annulata*." 3rd International BAU Drug Design Congress. Istanbul Türkiye, 01-03 Ekim 2015.

6. **Nural Yaman B.**, Deniz Sonmez G., Aytar Çelik P., Korkmaz F., Mutlu MB., Çabuk A. Bacterial Diversity of Boron Mine Distrinct in Kırka, Turkey. 4th Conference on Microbial Diversity., Bari, İtalya, 24-26 Ekim 2017.
7. **Nural Yaman B.**, Aytar Çelik P., Mutlu MB., Çabuk A. Microbial Diversity of Acidic Mine Drainage in Kahramanmaraş, Turkey. BioMicroWorld2018, Torremolinos İspanya, 24-25 Mayıs 2018.
8. Çabuk A., **Nural Yaman B.**, Gedikli S., Aytar Çelik P., Korkmaz F., Mutlu MB. The Metagenomics Analysis of Two Waste Mine Ponds from Turkey. 5 ECCA, Floransa İtalya, 15-19 Eylül 2019.

B-5 Ulusal kongre, sempozyum, panel, çalıştay gibi bilimsel, sanatsal toplantılarda sözlü olarak sunulan ve özet metin olarak yayımlanan bildiri.

1. Yiğit E., **Nural Yaman B.**, Gedikli S., Aytar Çelik A., Çabuk A. Bor Tolerant Mikroorganizmalardan Proteaz Üretimi. Uluslararası Katılımlı 19. Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir, Türkiye, 01-03 Aralık 2017.
2. Abutaha MK Abdulsamee, **Nural Yaman B.**, Çakmak H., Hoşgün S., Aytar Çelik P., Çabuk A. Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Boyarmadde Gideriminde Manyetik Biyosorbentın Değerlendirilmesi. Uluslararası Katılımlı 20. Biyoteknoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 10-12 Ekim 2019.

B-6 Ulusal kongre, sempozyum, panel, çalıştay gibi bilimsel, sanatsal toplantılarda poster olarak sergilenen bildiri.

1. **Nural B.**, Erdemir A., Turgut-Balık D. *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enziminin Gen Dizisinde Tespit Edilen Mutasyonların Yönlendirilmiş Mutagenez ile Uzaklaştırılarak Aktif Protein Üretimi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi. Eskişehir, Türkiye. 23-27 Haziran 2014.
2. **Nural B.**, Yakarsönmez S., Erdemir A., Turgut-Balık D. *Theileria annulata*'nın Laktat Dehidrogenaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi ve Termal Stabilite Analizi. 4. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Afyon, Türkiye 21-24 Ağustos 2015
3. Erdönmez O., Gedikli S., **Nural Yaman B.**, Aytar Çelik P., Çabuk A. Eynal Termal Kaplıcasının Prokaryotik Çeşitliliği. Uluslararası Katılımlı 20. Biyoteknoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 10-12 Ekim 2019.

10-BURSLAR/ÖDÜLLER

- 1) TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı Yurteri Yüksek Lisans Bursu
- 2) TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı Yurteri Doktora Bursu
- 3) TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı Yurteri Doktora Bursu