

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**BALIK GÖLÜ (19 MAYIS, SAMSUN) SİYANOBAKTERİ
KOMÜNİTESİNİN MEVSİMSEL BİYOÇEŞİTLİLİĞİNİN
METAGENOMİK ANALİZİ**

Yüksek Lisans Tezi

Merve SAĞLAM

Danışman

Doç. Dr. Haydar KARAKAYA

Bu tez çalışması, PYO.FEN.1904.20.001 nolu Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Merve SAĞLAM tarafından, Doç. Dr. Haydar KARAKAYA danışmanlığında hazırlanan “Balık Gölü (19 Mayıs, Samsun) Siyanobakteri Komünitesinin Mevsimsel Biyoçeşitliliğinin Metagenomik Analizi” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 12.07.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

| | Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı | İmza | Sonuç |
|-------------------|--|------|-------------------------------------|
| Başkan | Prof. Dr. Kamil IŞIK Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı | | <input checked="" type="checkbox"/> |
| | | | Kabul |
| | | | <input type="checkbox"/> |
| | | | Ret |
| Üye (Danışman) | Doç. Dr. Haydar KARAKAYA Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı | | <input checked="" type="checkbox"/> |
| | | | Kabul |
| | | | <input type="checkbox"/> |
| | | | Ret |
| Üye | Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ Samsun Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı | | <input checked="" type="checkbox"/> |
| | | | Kabul |
| | | | <input type="checkbox"/> |
| | | | Ret |

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

16/06/2021
Merve SAĞLAM

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : Balık Gölü (19 Mayıs, Samsun) Siyanobakteri Komünitesinin Mevsimsel Biyoçeşitliliğinin Metagenomik Analizi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 16.06.2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 4

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

16/06/2021
Danışman
Haydar KARAKAYA

ÖZET

BALIK GÖLÜ (19 MAYIS, SAMSUN) SİYANOBAKTERİ KOMÜNİTESİNİN MEVSİMSSEL BİYOÇEŞİTLİLİĞİNİN METAGENOMİK ANALİZİ

Merve SAĞLAM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Temmuz/2021

Danışman: Doç. Dr. Haydar KARAKAYA

Bu çalışmada Balık Gölü (19 Mayıs, Samsun) siyanobakteri komünitesinin biyoçeşitliliğinin metagenomik bir yaklaşımla mevsimsel analizi amaçlanmıştır. Gölün orta kısmındaki bir istasyondan dört mevsim boyunca yüzey altı ve 2 m derinden su örnekleri alınmış, bu su örneklerinden toplam DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak siyanobakteri 16S rRNA geninin V2-V4 bölgelerini içine alan kısmı siyanobakteri spesifik bir primer çifti ile çoğaltılmıştır. Her dört mevsimde ve her iki derinlikten elde edilen çevresel DNA'lardan amplikonlar elde edilmiştir. Böylece siyanobakteri komünitesinin bütün mevsimlerde ve her iki derinlikte de temsil edildiği değerlendirilmiştir.

Temsil edilen bireylerin kimliklerinin belirlenmesi ve filogenetik ilişkilerinin analizi için her bir mevsime ait yüzey altı amplikonları rastgele klonlanarak fragmentler izole bir şekilde elde edilmiştir. Her bir mevsim için çok sayıda klon arasında 20'şer adet klon seçilerek taşıdıkları fragmentlerin baz dizisi belirlenmiştir. Bu dizilerin veritabanlarındaki siyanobakteriyel suşlara ait dizilerle homoloğu araştırılmıştır. Bu analizler sonucunda kış mevsimine ait 12, ilkbahara ait 16, yaza ait 18 ve sonbahara ait 18 fragmente ait dizinin siyanobakteriyel orijinli olduğu belirlenmiştir. Standart siyanobakteri 16S rRNA geni ile karşılaştırıldığında fragmentlerin yüksek düzeyde homoloji gösterdikleri belirlenmiştir. Dizisi belirlenen 64 fragmentten 60'ının altbölüm I ve altbölüm IV'e dahil oldukları belirlenmiştir. Alt bölüm III sadece tek bir diziyile sadece sonbahar mevsiminde temsil edilmiştir. Sonbahar mevsimine ait 3 dizi ise diatom kloroplast 16S rRNA geni ile homoloji göstermiştir. Bu durumda biyolojik çeşitliliğin en zengin olduğu mevsimin sonbahar olduğu değerlendirilmiştir. Kış mevsiminde altbölüm IV üyeleri daha baskın iken ilbahar ve sonbaharda altbölüm I üyeleri daha baskın hale gelmektedir. Yaz mevsiminde ise bu iki altbölüme ait üyeler eşit sayıda temsil edilmektedir.

Her mevsime ait kısmi 16S rRNA geni dizilerinin analizleriyle elde edilen filogenetik ağaçta genel olarak aynı altbölüme ait dizilerin birlikte kümelendikleri görülmektedir. Diatom kloroplast 16S rRNA gen dizileri de ayrı bir filogenetik grup olarak kümelenmiştir. Ancak bazı altbölüm I üyelerinin, siyanobakteriyel filogenetik ağaçlarda sıklıkla görüldüğü gibi, altbölüm IV üyelerine daha yakın kümelendiği durumlar da gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Siyanobakteri, metagenom, 16S rRNA geni, biyoçeşitlilik, Balık Gölü

ABSTRACT

METAGENOMIC ANALYSIS OF SEASONAL BIODIVERSITY OF CYANOBACTERIAL COMMUNITY IN BALIK LAKE (19 MAYIS, SAMSUN)

Merve SAĞLAM

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Biology

Master, July/2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Haydar KARAKAYA

In this study, it was aimed at the seasonal analysis of the biodiversity of cyanobacterial community in Balık Gölü (19 Mayıs, Samsun) with a metagenomic approach. Water samples were taken from a station located at the middle of the lake from the subsurface and from 2 m dept, and total environmental DNA isolations were carried out from these samples. A part of cyanobacterial 16S rRNA gene comprising V2-V4 region was amplified by using these environmental DNAs as template and a cyanobacteria specific primer pair. Amplicons were obtained from the environmental DNAs from both the depts and from all the seasons. Thus it was evaluated that cyanobacterial community were represented in both the depts and in all the seasons.

The amplicons obtained from subsurface DNAs of four seasons were cloned randomly and individual fragments were isolated for determination of the identity of represented individuals and for analysis of their phylogenetic relationships. For each season 20 of numerous clones were selected randomly and their nucleotide sequences were determined. Homology of these sequences were found by comparing with the sequences of cyanobacterial 16s rRNA genes previously deposited in databases. Based on these analyses 12 fragments from the winter, 16 from the spring, 18 from the summer and 18 from the autumn were found to possess cyanobacterial origin. The fragments were found to exhibit higher levels of homology (identity) with the 16S rRNA genes of standard cyanobacterial strains. Of the 60 in a total of 64 sequenced fragments were obtained to be included in the subsection I and subsection IV. The subsection III was represented with a single fragment only in autumn. In autumn 3 fragments were exhibit homology with diatome chloroplastic 16S rRNA gene. According to the results the autumn was concluded as the season with the richest biodiversity. Subsection IV was predominant in the winter while subsection I became dominant in the spring and in the autumn. The members of both the subsection I and IV were represented in the summer equally.

It was also seen that the sequences of the same subsection were largely clustered together in the phylogenetic tree constructed from the partial sequences of 16S rRNA gene obtained from cloned fragments of each of the seasons. Diatom chloroplast 16S rRNA sequences were also clustered as a separate phylogenetic group. However some sequences of subsection I were observed to cluster more closely to the members of subsection IV as often seen in cyanobacterial phylogenetic trees.

Keywords: Cyanobacteria, metagenome, 16S rRNA gene, biodiversity, Balık Gölü

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan, düşünce ve tecrübeleriyle çalışmalarımın her aşamasında desteğini esirgemeyen, her türlü fedakârlığı yapan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Haydar KARAKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında su örneği almada ve göl suyunun fiziksel ve kimyasal parametrelerinin ölçümünde gerekli laboratuvar cihazlarını kullanmama izin veren Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Arif GÖNÜLOL'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen arkadaşım Biyolog Medine ÖZMEN'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince maddi-manevi her türlü fedakârlığı yapan, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, PYO.FEN.1904.20.001 nolu Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Merve SAĞLAM

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----------|
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT..... | iv |
| ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR..... | v |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ | vi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| TABLOLAR DİZİNİ | x |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ..... | 4 |
| 2.1. Siyanobakterilerin Genel Özellikleri..... | 4 |
| 2.2. Siyanobakteriyel Sistematiği..... | 5 |
| 2.3. Siyanobakteriyel Ekoloji..... | 8 |
| 2.4. Biyoçeşitlilik Araştırmaları..... | 11 |
| 2.4.1. Metagenomik | 16 |
| 2.4.2. Amplikonları Klonlama Yöntemleri | 19 |
| 2.5. Kaynak Özetleri | 22 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM..... | 32 |
| 3.1. Araştırma Alanı..... | 32 |
| 3.2. Su Örneklerinin Alınması, Hücrelerin Hasatı ve Saklanması | 33 |
| 3.3. Kullanılan Çözeltiler | 33 |
| 3.4. Kültür Ortamları..... | 35 |
| 3.5. Farklı Fiziksel ve Kimyasal Parametrelerin Ölçülmesi..... | 36 |
| 3.6. Etanol Çöktürmesi | 37 |
| 3.7. Çevresel Örneklerden DNA İzolasyonu | 37 |
| 3.8. PCR Reaksiyonları ve Parametreleri..... | 38 |
| 3.9. Klonlama İşlemleri..... | 39 |
| 3.9.1. Alıcı Hücrelerin Hazırlanması | 40 |
| 3.9.2. Ligasyon..... | 40 |
| 3.9.3. Transformasyon | 41 |
| 3.9.4. Transformant <i>E. coli</i> DH5- α Hücrelerinden Plazmit DNA İzolasyonu | 42 |
| 3.9.5. Agaroz Jel Hazırlanması, DNA Örneklerinin Yüklenmesi, Yürütülmesi ve Görüntülenmesi..... | 43 |
| 3.9.6. DNA Dizi Analizi | 44 |
| 4. BULGULAR..... | 45 |
| 4.1. Su Örneklerinin Alınması ve Bakteriyel Komünite Üyelerinin Hasatı..... | 45 |
| 4.2. Alınan Su Örneklerinde Fiziksel ve Kimyasal Parametrelerin Değerlerinin Belirlenmesi | 46 |

| | |
|---|------------|
| 4.3. Çevresel Örneklerden DNA İzolasyonu | 48 |
| 4.3.1. Farklı Mevsimlere Ait Su Örneklerinde Siyanobakteriyel 16S rDNA Dizilerinin Taranması..... | 49 |
| 4.3.2. Siyanobakteriyel 16S rDNA Amplikonlarının Rastgele Klonlanması..... | 53 |
| 4.3.3. Klonların Doğruluklarının Belirlenmesi | 56 |
| 4.3.4. Klonlara Ait Dizilerin Teşhisi..... | 58 |
| 5. TARTIŞMA..... | 72 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 77 |
| KAYNAKLAR | 80 |
| EKLER | 87 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 101 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-------------------------|---|
| ARDRA | Amplifiye ribozomal RNA restriksüyon analizi |
| bç | Baz çifti |
| CaCl₂ | Kalsiyum klorür |
| CyanoHAB | Zararlı siyanobakteriyel alg çoğalması |
| DGGE | Denaturing gradient gel electrophoresis |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DNA | Deoksiribo nükleik asit |
| dNTP | Deoksinükleotit trifosfat |
| EDTA | Etilendiamin tetraasetik asit |
| ELISA | Enzyme-linked immuno sorbent assay |
| FS I | Fotosistem I |
| FS II | Fotosistem II |
| HCl | Hidrojen klorür |
| ICBN | International code of botanical nomenclature |
| ICNP | The International code of nomenclature of prokaryotes |
| ITS | Internal transcribed spacer |
| kb | Kilo baz |
| KCl | Potasyum klorür |
| KOH | Potasyum hidroksit |
| LB | Luria-Bertani |
| <i>mcvE</i> | Mikrosistin E geni |
| Mg⁺² | Magnezyum |
| MgCl₂ | Magnezyum klorür |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| ML | Maximum likelihood |
| ml | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| NaCl | Sodyum klorür |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| ng | Nanogram |
| NGS | Yeni nesil dizileme |
| nm | Nanometre |
| NJ | Neighbor-joining |
| OH | Hidroksil |
| PCR | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| PIPES | Piperazine-1.2-bis (2-ethanesulfonic acid) |
| RAPD | Restriction fragment length polymorphism |
| RBA | Reseptör bağlama analizi |
| rDNA | Ribozomal deoksiribo nükleik asit |
| RFLP | Restriction fragment length polymorphism |
| rRNA | Ribozomal ribonükleik asit |
| SSCP | Single-strand conformation polymorphism |
| SSU | Small subunit |
| TBE | Tris-borik asit-etilendiamin tetraasetik asit |
| TE | Tris-etilendiamin tetraasetik asit |
| TGGE | Temperature gradient gel electrophoresis |
| tRNA | Transfer ribonükleik asit |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 3.1. Balık gölü ve çevresini gösteren harita..... | 32 |
| Şekil 4.1. Balık Gölü'ne ait görüntüler..... | 46 |
| Şekil 4.2. Farklı mevsimlere ait yüzey su örneklerden elde edilen çevresel DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü..... | 49 |
| Şekil 4.3. İlkbahar mevsimi yüzey ve 2 m deriden elde edilen çevresel DNA örneklerinden elde edilmiş siyanobakteriyel 16S rDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü..... | 50 |
| Şekil 4.4. Yaz mevsimi yüzey ve 2 m deriden elde edilen çevresel DNA örneklerinden elde edilmiş siyanobakteriyel 16S rDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü..... | 51 |
| Şekil 4.5. Sonbahar mevsimi yüzey ve 2 m deriden elde edilen çevresel DNA örneklerinden elde edilmiş siyanobakteriyel 16S rDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü..... | 52 |
| Şekil 4.6. Kış mevsimi yüzey ve 2 m deriden elde edilen çevresel DNA örneklerinden elde edilmiş siyanobakteriyel 16S rDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü..... | 52 |
| Şekil 4.7. Siyanobakteriyel 16S rDNA amplikon fragmentlerini taşıyan klonların besiyeri yüzeyindeki görünüşleri..... | 54 |
| Şekil 4.8. Yaz ve sonbahar mevsimine ait (Ağustos 2019-Kasım 2019), çevresel DNA'dan elde edilen siyanobakteriyel 16S rRNA geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerden elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü..... | 57 |
| Şekil 4.9. Kış ve ilkbahar mevsimine ait (Şubat 2020-Mayıs 2019), çevresel DNA'dan elde edilen siyanobakteriyel 16S rRNA geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerden elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü..... | 57 |
| Şekil 4.10. Kış mevsimine ait metagenom fragment dizilerinin Maximum Likelihood yöntemiyle evrimsel analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç..... | 61 |
| Şekil 4.11. İlkbahar mevsimine ait metagenom fragment dizilerinin Maximum Likelihood yöntemiyle evrimsel analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç..... | 64 |
| Şekil 4.12. Yaz mevsimine ait metagenom fragment dizilerinin Maximum Likelihood yöntemiyle evrimsel analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç..... | 67 |
| Şekil 4.13. Sonbahar mevsimine ait metagenom fragment dizilerinin Maximum Likelihood yöntemiyle evrimsel analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç..... | 70 |

TABLolar DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Tablo 3.1. Inoue transformasyon tamponunun içeriği | 35 |
| Tablo 3.2. Lizis tamponunun içeriği | 38 |
| Tablo 3.3. 10 reaksiyonluk PCR karışımı | 39 |
| Tablo 3.4. PCR ile çoğaltımda kullanılan sıcaklık değerleri ve parametreleri | 39 |
| Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan primer ve dizileri..... | 39 |
| Tablo 3.6. Ligasyon reaksiyonunun içeriği..... | 41 |
| Tablo 3.7. Plazmit izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve içerikleri | 43 |
| Tablo 4.1. Örnek alma zamanlarındaki aylara göre yüzeyaltı göl suyu su sıcaklıkları..... | 46 |
| Tablo 4.2. Mevsimlere göre örnek sularının pH değerleri | 47 |
| Tablo 4.3. Yüzey suyu örneklerinde mevsimlere göre nitrat azotu konsantrasyonu ve nitrat miktarı değerleri..... | 47 |
| Tablo 4.4. Yüzey suyu örneklerinde mevsimlere göre fosfat, fosfor, P ₂ O ₅ miktarları..... | 48 |
| Tablo 4.5. Kış, ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimine ait klonlardan elde edilen plazmit DNA konsantrasyonları..... | 55 |
| Tablo 4.6. Kış mevsimine ait çevresel DNA'dan çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerin rastgele klonlanmasıyla izole edilen DNA fragmentlerinin olası kimlikleri..... | 60 |
| Tablo 4.7. İlkbahar mevsimine ait çevresel DNA'dan çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerin rastgele klonlanmasıyla izole edilen DNA fragmentlerinin olası kimlikleri. | 63 |
| Tablo 4.8. Yaz mevsimine ait çevresel DNA'dan çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerin rastgele klonlanmasıyla izole edilen DNA fragmentlerinin olası kimlikleri..... | 66 |
| Tablo 4.9. Sonbahar mevsimine ait çevresel DNA'dan çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerin rastgele klonlanmasıyla izole edilen DNA fragmentlerinin olası kimlikleri | 69 |
| Tablo 4.10. Balık Gölü'de tespit edilen siyanobakteri cinsleri, temsil sayıları ve temsil edildikleri mevsimler. | 71 |

1. GİRİŞ

Dört milyar yıllık bir evrimsel sürecin sonunda bugünkü prokaryotik dünya oluşmuştur. Bu uzun evrimsel geçmişlerinden dolayı prokaryotik mikroorganizmalar, dünyadaki en büyük genetik çeşitlilik rezervuarını temsil ederler. Prokaryotlar diğer dört alemini oluşturan protistler, metazoanlar, bitkiler ve hayvanlardan çok daha yaşlıdır ve biyosferin çok daha büyük bölümlerini işgal ederler (Rodríguez-Valera, 2004). Her geçen gün yeni türler tanımlanmakta, bu durum taksonomistlerin prokaryotik çeşitliliğin büyüklüğünün sınırlarını tahmin etmelerini zorlaştırmaktadır. Biyoçeşitlilik organizmaların tür (takson) kompozisyonundaki, bu organizmaların taşıdıkları genetik bilgidaki ve oluşturdukları ekosistemlerdeki çeşitliliği ifade eder. Prokaryotik çeşitlilik, biyolojik bilimlerdeki en büyük bilgi boşluklarından biridir ve büyük ölçüde keşfedilmemiş durumdadır (Rodríguez-Valera, 2004). Prokaryotik dünyanın en önemli gruplarından biri, dünyaya oksijenli yaşamın sürdürülebildiği bir atmosfer kazandıran, yeryüzünde geniş bir alana yayılan ve biyoçeşitliliği son derece yüksek olan siyanobakterilerdir (Rodríguez-Valera, 2004).

Siyanobakteriler oldukça eski, biyoçeşitliliği yüksek ve ekolojik olarak önemli bir filumdur. Erken Prekambriyen'den bu yana biyosferdeki varlıkları ve günümüze kadar olan geniş çeşitliliği, farklı ekosistemlerdeki çeşitli çevresel koşullara tekrar tekrar hızlı adaptasyonlarıyla, biyolojik ve ekolojik olarak olağanüstü başarılı yaşam stratejileri göstermektedirler (Komárek, 2016). Evrimsel olarak, siyanobakteriler erken dünya atmosferinin oksijenlenmesinde ve yeryüzünün oksijenli solunum yapan organizmalar için yaşanılır bir yer haline gelmesinde önemli bir rol oynamıştır (Davison et al., 2015). Siyanobakteriler üzerine yapılan araştırmaların çoğu evrimsel, ekolojik, ekotoksikolojik, biyokimyasal ve taksonomik çalışmalardır (Alvarenga et al., 2017). Siyanobakterilerin, olası ekofizyolojik fonksiyonlarının ve evrimsel avantajlarının araştırılması, genomlarının incelenmesi, morfolojilerinin ve genetik yapılarının birbirleriyle ilişkilendirilmesi, dünyadaki mevcut filumların ve erken yaşamın evrimsel tarihinin incelenmesi, mikrobiyotadaki değişikliklerle eş zamanlı olarak meydana gelen, jeolojik ve biyojeokimyasal değişikliklerin incelenmesi ve sistematığının detaylı olarak araştırılması, çeşitli genomik yaklaşımların da kullanılması önemli miktarda bilgi birikimi sağlamıştır. Siyanobakterilerin ekolojisi, fizyolojisi ve moleküler biyolojisi onlarca yıldır kapsamlı bir şekilde incelenmiş olmasına rağmen son yıllarda, yeni genom dizileme teknolojileri ve tek hücre

yakalama teknolojileri, siyanobakteriyel çeşitlilik anlayışımızda büyük ve farklı bir etki oluşturmuştur. Bu teknolojilerin çoğu, başlangıçta *Escherichia coli* veya maya gibi model organizmaların incelenmesi için optimize edilmiştir (Davison et al., 2015). Buna rağmen hızla diğer gruplar için de kullanılabilir hale getirilmektedir. Siyanobakteriyel çeşitlilik araştırmalarında hem fenotipik hem de genetik analizleri içeren bir polifazik yaklaşım, diğer prokaryotik gruplarda olduğu gibi siyanobakterileri grupları için de en kabul edilebilir yöntemdir. Moleküler teknikler, filum içindeki sistematik ilişkilere ışık tutmaya ve yeni taksonları tespit etmeye büyük bir katkıda bulunmuştur. Son zamanlarda, genom temelli filogenilerin kullanımı bu mikroorganizmalar grubunda yeni görüşlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır.

Siyanobakteriyel biyoçeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur. Geleneksel olarak, siyanobakteriyel biyoçeşitliliğin belirlenmesinde morfolojik özellikler kullanıla gelmiştir. Morfolojik yöntemlerle siyanobakteriler trikom genişliği, hücre büyüklüğü, bölünme düzlemi, hücre şekilleri, pigmentasyonu, heterosist içerip-içermediği ve değişik hücre içi yapıların varlığı gibi morfolojik özellikler dikkate alınarak sınıflandırılmaktadırlar. Özellikle son yirmi-otuz yıllık bir süre içerisinde genomik temelli yöntemler üzerinden kapsamlı çalışmalar da gerçekleştirilmektedir. Geleneksel morfolojik sınıflandırma ile DNA dizi benzerlik ve farklılıklarına bağlı sınıflandırmalar sıklıkla birbirleriyle uyumsuzluklar göstermektedir. Bu nedenle daha fazla genomik düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Saf siyanobakteriyel kültürlerden elde edilmiş genomlar geleneksel yöntemlerle veya yeni nesil dizileme yöntemleriyle dizilenebilmektedir (Davison et al., 2015). Laboratuvar kültür ortamında çoğaltılan siyanobakterilerin morfolojisi, her zaman bakterinin doğal habitatındaki bulunuş biçimini temsil etmez (Ward et al., 1997). Son yirmi-otuz yıldır geliştirilen yeni yöntemler, doğadan alınan komünite örneklerinin herhangi bir kültüre alma işlemi yapılmadan direkt olarak biyoçeşitlilik (genetik çeşitlilik) analizine tabi tutulmasını mümkün kılmıştır.

Moleküler biyoçeşitlilik analizlerinde belli gen bölgelerini hedef alan ve tüm genomu hedef alan yaklaşımlar mevcuttur. Biyoçeşitliliğin belirlenmesinde tüm genom analizi yaklaşımları daha kesin sonuçlar verse de uzun süre gerektiren maliyeti yüksek çalışmalardır. Bunun yerine belli belirteç dizileri kullanılarak

yapılan DNA dizi farklılıklarının analizine dayalı teknikler daha hızlı sonuçlar vermektedir.

Bu çalışmada da Balık Gölü (19 Mayıs, Samsun) siyanobakteri komünitesinin biyoçeşitliliğinin metagenomik bir yaklaşımla incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için dört mevsim boyunca Balık Gölü'nün nispeten orta kısmından belirlenen bir istasyondan su örnekleri alınarak elde edilen çevresel DNA'dan (metagenomdan) siyanobakteriler için spesifik olan primer çifti kullanılarak 16S rRNA geninin belli bir bölgesi çoğaltılmak suretiyle komünite üyelerinin varlığı belirlenmiştir. Takiben her mevsim için elde edilen amplikonlar rastgele klonlanmış ve klonlardan bazıları rastgele seçilerek dizilenmiştir. Elde edilen diziler filogenetik analizlere tabi tutularak siyanobakteri komünitesinin biyoçeşitliliği belirlenmeye çalışılmıştır. Bu tezde bu çalışmaların sonuçları sunulmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Siyanobakterilerin Genel Özellikleri

Siyanobakteriler, gram negatif prokaryotların en büyük alt gruplarından birini oluştururlar (Rippka et al., 1979). Bitkilerin fotosentez mekanizmasına benzer bir fotosentez yaparak, CO₂'i fikse ederken yan ürün olan O₂'yi açığa çıkaran *Bacteria* domainine ait *Cyanobacteria* filumuna dahil edilen bir bakteri grubudur (Hohmann-Marriott and Blankenship, 2011). Siyanobakteriler, dünya üzerinde ilk oksijenik fotosentezi gerçekleştiren organizmalardır ve dünya atmosferinin yükseltgen özelliğinin oluşmasına neden olarak bugünkü mevcut yaşam formları için uygun hâle gelmesini sağlamışlardır (Castenholz, 2015).

Siyanobakteriyel fotosentez bitkisel fotosentezle benzerlik göstermektedir. Elektron verici olarak H₂O'yu kullanırlar ve fotosentez yan ürünü olarak O₂'yi serbest bırakırlar. Fotosentetik sistem, Fotosistem I (FS I), Fotosistem II (FS II) ve fikobilizom olmak üzere üç makromoleküler kompleksten meydana gelmiştir: Fikobilizomlar, FS II'deki ışığı yakalayan esas anten olarak görev alırlar ve pigment içeren, suda çözünür bir grup proteinden meydana gelirler. Bu pigmentler allokosiyenin, fikosiyenin ve bazı suşlarda ek olarak fikoeritrindir. FS II, tilakoid zar üzerinde yerleşik olan bir protein kompleksidir ve ışık ile gerçekleştirilen suyun oksitlenmesini ve yüksek enerji seviyesine sahip elektronun açığa çıkmasını sağlar. Işık anteni olarak fikobilizomlar esas rolü oynar ancak klorofil a pigmenti de, FS II reaksiyon merkezinde konumlanmış durumdadır. FS I, zar bağlantılı bir protein kompleksidir ve ana pigment olarak klorofil a taşırlar. Siyanobakteriyel reaksiyon merkezlerinde *Prochlorococcus* grubu hariç klorofil b pigmenti mevcut değildir (Vermaas, 2001).

Jeokimyasal kanıtlar, siyanobakterilerin ortaya çıkmasından itibaren moleküler oksijenin meydana geldiğini ve bunun sonucu olarak dünya atmosferinde büyük bir değişikliğin oluştuğunu göstermektedir. Siyanobakteriler esasen zorunlu fotoototroftur ve birçoğu diazotropiktir, yani büyüüp gelişmek için moleküler azotu (N₂) kullanabilirler (Deng and Hayes, 2008).

Siyanobakteriler, fotosentetik, gram negatif, prokaryotik organizmalardır. Çoğunlukla sucul ekosistemlerde (deniz ve tatlı su) bulunmalarına rağmen, çöl, buzul gölleri ve sıcak su kaynakları gibi ekstrem habitatlarda da dağılım göstermektedirler

(Stal, 2012). Morfolojik, metabolik ve fizyolojik özellikler bakımından yüksek oranda bir çeşitlilik gösterirler (Mankiewicz et al., 2003). Siyanobakteriler çok farklı morfolojik karakterler (tek hücreli, bir arada yaşayan koloniler, iplikli vb.) göstermektedirler (Casamatta et al., 2005).

2.2. Siyanobakteriyel Sistematik

Siyanobakteriler, hücresel özellikleri bakımından prokaryotiktir ve hücrelerin prokaryotik yapıda oldukları bilinmelerine rağmen önceleri algler grubu içerisinde mavi-yeşil algler olarak adlandırılmışlardır. Mavi-yeşil algler olarak adlandırılan bu organizmalar, botanik bilimciler tarafından siyanofitler olarak, bakteriyologlar tarafından ise mavi-yeşil bakteriler veya siyanobakteriler olarak belirtilmiştir ve uzun yıllar boyunca algler arasında büyük ve önemli bir takson olarak Botanik Kod'a göre sınıflandırılmıştır (Stanier et al., 1978).

Botanik Kod'un birinci ilkesine göre botanik isimlendirme, zoolojik ve bakteriyolojik isimlendirmeden bağımsız olmalıdır. Bu ilkeye eskiden benzer olan ve şuan için de geçerli olan ikinci ilkede ise prokaryotlar botanikten bağımsız değildir fakat bakteriyolojik ve zoolojik isimlendirme yapılabilir, denilmiştir. Böylelikle siyanobakterilerin sistematik olarak yeri ve isimlendirilmesi karmaşık bir durum oluşturmuştur (Oren, 2011). Siyanobakteriler böyle bir durumda fotosentez yapmalarından dolayı bitkilere benzetilmiş ve bu nedenle ilk başta Botanik Kod'un birinci ilkesine göre değerlendirilmiş fakat daha sonra prokaryotik hücre yapısına sahip olmalarından dolayı da sınıflandırılmaları Botanik Kod'un ikinci ilkesi göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Hala daha bazı araştırmacılar, oksijenik prokaryotlar için "International Code of Botanical Nomenclature" (ICBN) ilkelerini kullanmaktadır (Palinska and Surosz, 2014).

1978'de siyanobakterilerin Uluslararası Bakteriyolojik Kod'a göre isimlendirilmeleri teklif edilmiştir (Stanier et al., 1978) ve bu teklif Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesinin Fotootrofik Bakteri Taksonomisi alt komitesince 1 Ocak 1979 tarihi itibarıyla kabul edilmiştir (Oren, 2004). Rippka ve arkadaşları siyanobakterilerin ilk bakteriyolojik sınıflandırmasını gerçekleştirmişlerdir (Rippka et al., 1979). Bu ekolü takibeden araştırmacılar sadece klonal (aksenik, saf) kültürleri ve bu kültürlerin morfolojik, sitolojik, genetik, kimyasal ve fizyolojik özelliklerini esas almışlardır. Bu durumda kültürler tür olarak kullanıldığında ismin bir tanımla değil kültürle ilişkilendirildiği ve kültürlerin

zamanla değişebileceği belirtilmiştir. Botanik kod ve bakteriyolojik kod arasındaki en temel fark bitki taksonomisinde örnekler, herbaryum örnekleri gibi cansız tip örneklere dayalı iken bakteriyel taksonomide bu örnek grupları suşlardır (Rippka et al., 1979). Dolayısıyla botanik koda göre morfolojik özellikler esas alınarak çok sayıda tür ve cins tanımlanmıştır. Saf (aksenik, klonal) kültür temelli yapılan çalışmalar, siyanobakterilerin morfolojik özelliklere göre tanımlanan tür sayısından çok daha az türün mevcut olması gerektiğini göstermektedir. Bu durum da aynı taksonu ifade eden birden fazla grubun (sinonim) oluşmasına neden olmuştur.

Siyanobakterilerin sınıflandırılması büyük ölçüde gerek botanik gerekse de bakteriyolojik sistemlerde morfolojik özelliklere dayanmaktadır. Morfolojik yapılar soy hatlarının yeniden yapılandırılması için kullanılırken hangi morfolojik özelliklerin homolog olduğunun açığa kavuşturulması gerekmektedir çünkü belirgin şekilde benzer yapıların kökeni farklı olabileceği gibi farklı yapıların kökenleri aynı olabilir. Yani benzer veya farklı morfolojik özellikler kökenlerin aynı ya da farklı olduğu anlamına gelmez. Genetik olarak tanımlanmış cinslerin içindeki türlerin sınırlandırılması içinde tek tip genetik kriter bulmak da oldukça zordur (Hoffmann et al., 2005).

16S rRNA geninin iyi bir moleküler kronometre olduğu belirtilmektedir (Woese, 1987; Wilmotte, 1994). Ribozomal RNA hücreler için evrensel bir moleküldür. Protein sentezindeki işlevleri hücre yaşamı için temel olduğundan ribozom yapısına katılan rRNA'nın bazı bölgeleri korunmuştur. Daha fazla ve daha az korunmuş bölgelerinin kullanılması yakın ve uzak akraba organizmaların belirlenmesi çalışmalarına imkan sağlamaktadır. Bakterilerin 16S rRNA geni 1500 nükleotitten oluşan uzun bir moleküldür. Bu nedenle çok sayıda karakter (baz pozisyonları) içerir ve verinin istatistiksel olarak değerlendirilmesini mümkün kılar (Wilmotte, 1994).

16S rRNA geninin filogenetik analizi, siyanobakteriler arasında yakın ilişkiler olduğunu ortaya çıkarmıştır, bu durum siyanobakterilerin çeşitlenmesinin kısa bir süre içinde gerçekleştiğini göstermektedir (Giovannoni et al., 1988; Wilmotte and Herdman, 2001). 16S rRNA geninin yanı sıra *psbA* geni de siyanobakteriyel filogeni çalışmalarında kullanılmıştır. *psbA* geni FS II'deki ışık reaksiyon merkezinde yer alan bir proteini kodlamaktadır. Bu gen siyanobakteriler, algler ve yüksek bitki kloroplastlarının genomlarında bulunur ve filogenetik marker olarak yaygın bir

şekilde kullanılmaktadır. *psbA* geninin dizilenmesi ile elde edilen taksonomik veriler çoğu durumda SSU (small subunit) rRNA dizilerinden elde edilen verileri doğrulamaktadır (Zeidner et al., 2003).

Siyanobakteri gruplarının belli bir hiyerarşik düzen içerisinde sınıflandırılması hala daha gerçekleşmemiştir. Bu nedenle morfolojiyi esas alan geleneksel yöntemlerin yanı sıra moleküler yöntemlerin kullanılmasının filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde daha etkili olacağı açıktır. 1988 yılında Giovannoni ve arkadaşları siyanobakteriler arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesine yönelik ilk çalışmaları gerçekleştirmiştir (Giovannoni et al., 1988). Bu çalışmalar kültüre alınmış ve saf kültür şeklinde saklanmış siyanobakterilerin 16S rRNA gen bölgesinin dizi analizine dayanmaktadır. 16S rRNA genleri arasındaki ITS bölgesinin ve diğer evrimsel açıdan ilişki bulunan gen bölgelerinin dizileri birbirleriyle karşılaştırılarak daha doğru ve birbirlerine daha yakın filogenetik ilişkilerin olduğu belirlenebilir (Palinska and Surosz, 2014).

Moleküler veriler siyanobakteriyel taksonomi için temel kriterler sağlar ancak 150 yıllık siyanobakteriyel biyoçeşitlilik araştırmalarından elde edilen sonuçlarla birleştirilirse daha doğru bir filogenetik sistem oluşturulabilir. Bu nedenle yapılan morfolojik varyasyon çalışmaları, modern morfoloji çalışmaları, genetik, ekolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler polifazik bir yaklaşımla birleştirilmelidir (Komarek, 2006).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kitabında siyanobakterilerin adlandırılması ve sınıflandırılmasında farklı yöntemler önerilmiştir. Bu yöntemlerden ilki küçük grup cinsleri korumak yani cins olarak kalmasını sağlamak, diğeri ise birçok türü daha az cins altında toplamak şeklindedir (Castenholz, 2015). Tek başına bu yöntem de yeterli görünmemektedir. Bu nedenle siyanobakteriyel sistematığın daha güvenilir bir şekilde yapılandırılabilmesi için tam genom dizilerinin belirlenmesi daha etkili bir yöntem olacaktır. Siyanobakteriyel türlerin tanımlanması bugün için Bakteriyolojik Kod'a göre bile mümkün olmamıştır. Birçok siyanobakteriyel grup benzer yapısal özelliklere sahip olsa bile filogenetik köken açısından yakın olmayan alt kategoriler içeren cinsler bulunmakta ve bu cinsler formcins olarak tanımlanmaktadır.

Modern kriterlere göre az çok düzenlenmiş siyanobakteriyel cins kavramı; bir cins başka bir cinsteki en yakın türlerden 16S rRNA gen dizilerine dayalı olarak,

kendine özgü bir filogenetik pozisyona sahip olmalı (benzerlik yaklaşık %95 veya altında), diğer benzer gruplardan farklı morfolojik ayrıma sahip olma ya da benzeri olmayan biyolojik yapılar bulundurmalı (bölünme türü, akinet oluşumu, heterosist oluşumu gibi) ve ekolojik nişe sahip olmalıdır. Bu nedenle siyanobakterilerdeki normal cins, moleküler, morfolojik ve ekolojik kriterlerin kombinasyonu ile tanımlanırsa benzersiz bir türü temsil eder (Komárek et al., 2014).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'ye göre siyanobakteriler bir filum (*Cyanobacteria*), bir sınıf (*Cyanobacteria*) ve beş Alt bölüm (Subsection) olarak sınıflandırılmıştır. Alt bölüm I, tek hücreli veya koloni oluşturan, ikili bölünme veya tomurcuklanma ile üreyenler. Alt bölüm II, tek hücreli veya koloni oluşturan, çoklu bölünme ile üreyenler. Alt bölüm III, filamentli, heterosistsiz, sadece bir düzlemde bölünebilen siyanobakteriler. Alt bölüm IV, filamentli heterosistli, dallanmayan ve sadece bir düzlemde bölünebilen siyanobakteriler. Alt bölüm V, filamentli, heterosistli, dallanan ve çok fazla düzlemde bölünebilen siyanobakteriler, şeklindedir (Castenholz et al., 2001). Bununla beraber bazı araştırmacılar tarafından hala Botanik koda göre yapılmış sınıflandırmalar da kullanılabilir. Buna göre Rippka ve diğerleri. (1979) tarafından önerilen alt bölüm kategorisi ordo kategorisi olarak kabul edilerek isimlendirilmiştir. Bu durumda siyanobakteriler her biri alt bölümlerden birine denk gelecek şekilde 5 ordo şeklinde düzenlenmiştir. Bunlar Ordo I *Chroococcales* (alt bölüm I), Ordo II *Pleurocapsales* (alt bölüm II), Ordo III *Oscillatoriales* (alt bölüm III), Ordo IV *Nostocales* (alt bölüm IV) ve Ordo V *Stigonematales* (alt bölüm V) (Wilmotte, 1994).

2.3. Siyanobakteriyel Ekoloji

Dünyanın bilinen en eski prokaryotik, oksijenik fototrofik organizmaları olan siyanobakteriler, büyük biyojeokimyasal olaylara ve iklimsel değişikliklere tanıklık etmişlerdir. Işınımdaki aşırı dalgalanmalar nedeniyle yeryüzüne etki eden yoğun ultraviyole ışığa maruz kalmışlar, sıcaklığın az olduğu buzul çağlarından sıcaklığın çok olduğu kurak çağlarına kadar zıt uçlardaki koşullar altında bile yaşamlarını sürdürmüşlerdir. Volkanizma ve kıtasal ayrılma gibi jeolojik süreçlerde habitatlarını değiştirmişler ve çok çeşitli ekofizyolojik strese maruz kalmalarına rağmen hayatta kalıp günümüze kadar ulaşmışlardır. Muhtemelen siyanobakterilerin kutup bölgelerinden tropikal bölgelere, yer altı sularından yüksek dağlara kadar çok geniş

alanday yayılım göstermelerinin nedeni zorlu ekofizyolojik stres koşullarına karşı koyabilmeleridir (Whitton and Potts, 2012).

Siyanobakteriler, 3,5 milyar yıl önce var olan evrimsel olarak en eski organizmalardandır. Siyanobakterilerin evrimsel dayanıklılığının temel nedeni kullandıkları etkili metabolik yolların başarılı kombinasyonudur. Aynı anda oksijenik fotosentez ve solunum yapabilen iç zar sistemine sahip nadir gruplardan biridir ve birçok siyanobakteriyel tür serbest azotu fikse edebilir. Bu nedenle de çok çeşitli çevresel koşullar altında hayatta kalabilirler ve gelişimlerini sürdürebilirler (Vermaas, 2001). Siyanobakteriler, klorofil α sentezleyebilen fotosentetik prokaryotlardır. Yaygın oluşumlarına, yüksek bolluklarına ve morfolojik çeşitliliğine göre değerlendirildiğinde, fotosentetik prokaryotların en büyük grubudur. Düşük pH değerlerine sahip olan habitatlar hariç, günümüzde çoğu ışıklı ortamda temsil edilmelerinin yanında en uzun jeolojik kayıtlardan birine sahiptirler (Whitton, 1992).

Siyanobakteriler, bakteri domaininin en çeşitli ve en eski soylarından birini temsil eden ve doğada farklı habitatlara yayılmış organizma grubudur (Pope and Patel, 2008). Işığın bulunduğu habitatların hepsinde olmasa da çoğunda yaygın olarak bulunan fotosentetik prokaryotlardır. Dünyada siyanobakteriyel biyokütle 3×10^{14} gram karbon veya 10^{15} gram yaş biyokütle olarak hesaplanmıştır ve bu verilerden de anlaşılacağı üzere siyanobakterilerin dünyadaki biyokütle katkıının büyük olduğu açıktır (Garcia-Pichel et al., 2003).

Siyanobakteriler ekstrem çevre koşullarında örneğin, aşırı sıcak, aşırı soğuk, aşırı tuzlu ortamlarda hayatta kalabilirler. Siyanobakteriyel dünyada, aşırı tuzlu ortamlarda yaşama adapte olmuş birçok tür vardır. Hatta bazıları NaCl doygunluğuna yaklaşan tuz konsantrasyonlarında dahi çoğalabilirler. Aşırı tuzlu ortamlarda bentik matlarda çoğalan bazı siyanobakteriler, anoksik koşullar altında yaşama adapte olurlar ve FS I kompleksini kullanarak anoksijenik bir fotosentez türünde sülfite elektron vericisi olarak kullanabilirler (Oren, 2015). Endosimbiont olarak bulunabildikleri gibi bağımsız olarak da bulunurlar (Thajuddin and Subramanian, 2005).

Siyanobakteriler, çok sayıda ökaryotik konakla simbiyotik birliktelikler kurmuşlardır. Çoğunlukla siyanobakteriyel simbiyont (siyanobiont) azot fiksasyonu yapabilir ve oluşan ürün, yani kullanılabilir azot, konak tarafından alınır. Bitki siyanobakteri birlikteliğinde simbiyont, bağlı (kullanılabilir) azot formu sağlarken

konak fikse edilmiş karbon sağlar. Bitki simbiyontları genellikle *Nostoc* cinsine aittir. Hem serbest yaşayan hem de simbiyotik siyanobakterilerin, pirinç tarlalarında büyüme ve hasat miktarını arttırdıkları da bilinmektedir (Adams, 2000).

Siyanobakteriler, kaplıcalardan ötrofik su kütlelerine kadar çok çeşitli ortamlarda var olma ve hayatta kalma yeteneğine sahip prokaryotik ototrofik organizmalardır. Bu olumsuz habitatlardaki baskınlıkları ve hayatta kalmaları, morfoloji ve metabolizmadaki plastisitelere, alelokimyasalların/biyoaktif metabolitlerin salgılanmasına veya müsilaçlı kılıfın varlığına atfedilmektedir. Siyanobakterilerin yüksek azot ve fosfor gereksinimleri olduğundan, bu besin maddelerinin çok yoğun olduğu atık sular (kanalizasyon/kentsel atık sular), siyanobakterilerin çoğalmalarını artırmak ve dolaylı olarak ortamdaki besin yükünü azaltmak için kültür ortamı olarak hizmet edebilir ve bu da siyanobakterileri birçok uygulama alanı için yararlı kılmaktadır. Ayrıca, ağır metaller, inorganik ve organik kirleticiler gibi diğer kirletici maddelerin çeşitli atık sulardan uzaklaştırılmasında etkili oldukları ifade edilmiştir (Sood et al., 2015).

Siyanobakteriler, yapısal olarak çeşitli ve biyolojik ikincil metabolitler üretme konusundaki olağanüstü yetenekleri nedeniyle odak noktası olmuşlardır. Ürettikleri bu biyoaktif moleküller, siyanobakterilerle aynı habitatta bulunan diğer organizmaları caydıran genellikle güçlü toksinlerdir (Engene et al., 2013).

Zararlı (toksik etki, besin ağını değiştirme, oksijen yetmezliğine neden olma) siyanobakteriyel alg çoğalmaları (CyanoHAB), siyanobakterilerin bulunduğu sucul alanlara antropojenik kaynaklı besin girdisi nedeniyle dünya çapında çoğalmakta, tatlı su kaynaklarının kullanımı ve sürdürülebilirliği için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu tehdidi nispeten azaltan sucul ortama fosfor girdisinin sınırlandırılması cyanoHAB'ları kontrol etmek için öngörülmüştür. Bazı CyanoHAB'lar nitrojen (N) gereksinimlerini karşılamak için atmosferik nitrojeni (N₂) fikse edebilirler. Bununla birlikte, azot ve fosfor varlığı ile sınırlı olan ve serbest azotu fikse edemeyen siyanobakteriyel suşlardan kaynaklanan CyanoHAB'lar giderek daha fazla rahatsız edici olmaktadır. Bunların çoğunda sistemlere azot ve fosfor girdisi hızla artmakta ve sucul sistemlerde CyanoHAB kontrolü için uzun vadede azot ve fosfor kısıtlamalarına ihtiyaç duyulmaktadır (Paerl et al., 2011).

Siyanobakterilerin aşırı çoğalması (bloom) olaylarının ve bunun sonucu olarak oluşan ötrofikasyonun iklim değişikliği nedeniyle giderek artması olası bir

durumdur. Gerçekten de bu çoğalmaların (patlamaların) sayısı ve yoğunluğu son on yılda küresel olarak artmıştır. Siyanobakteriler, insan sağlığı ve çevre için bir dizi sorunlara neden olabilmektedir. Dahası, bazı koşullarda siyanobakteriler, suda yaşayan organizmaların hayatta kalmasını olumsuz yönde etkileyen siyanotoksinler (hepatotoksinler, nörotoksinler, sitotoksinler ve dermatoksinler içerir) üretebilir. Ek olarak siyanobakteri hücrelerinin doğrudan yutulmasıyla ve/veya siyanotoksin içeren içme suyunun tüketilmesiyle evcil hayvanlar ve insanlar için zehirlenme meydana gelebilir ve bu da halk sağlığı açısından endişelere yol açmaktadır (Chirico et al., 2020).

Artan küresel sıcaklıklar, değişen yağış modelleri ve su kütlelerinin özelliklerindeki değişimler, siyanobakterilerin çoğalma oranlarını, komünite içeriklerini ve “bloom” dinamiklerini güçlü bir şekilde etkiler. Özellikle yüksek sıcaklıklar yüzeyde fazla artış gösteren siyanobakteriler tarafından tercih edilmektedir. Maksimum çoğalma oranları nispeten yüksek sıcaklıklarda meydana gelmektedir (Foy et al., 1976; Robarts and Zohary, 1987; Butterwick et al., 2005). Antropejenik etkili iklim değişikliği, havanın daha sıcak olmasına neden olmaktadır ve bu durum doğrudan ya da dolaylı olarak siyanobakteriyel aşırı çoğalmalarının oluşumunu teşvik etmektedir. Kısacası daha yüksek sıcaklıklar, siyanobakterilerin büyümelerini ve çoğalmalarını doğrudan etkilemektedir (Zhang et al., 2012).

2.4. Biyoçeşitlilik Araştırmaları

Biyoçeşitlilik ya da biyoçeşitlilik, en yaygın ifadeyle türlerin sayısını tanımlamak için kullanılmıştır. Bu tanımın daha sonra eksik olduğu, içerisinde birçok parametrenin de bulunmasının gerektiği tartışmalarının sonucunda biyoçeşitlilik tanımı genişletilmiştir. Biyoçeşitlilik, tür çeşitliliği, genetik çeşitlilik ve içerisinde abiyotik koşulların da göz önünde bulundurulduğu ekosistem çeşitliliğini de içine alan geniş bir tanım olarak karşımıza çıkmaktadır (Swingland, 2001).

Biyoçeşitlilik, bir alana ve türe ait bir niteliktir. Genel olarak tür içindeki ve türler arasındaki çeşitliliği ifade eder. Canlı organizmalar, canlı organizma toplulukları, biyotik topluluklar ve biyotik süreçler, (doğal olarak meydana gelen veya insanlar tarafından değiştirilen) genetik olarak ölçülebilir çeşitlilik, türlerin sayısı ve tür toplulukları, bunların miktarları (örneğin bolluk, biyokütle, örtüş, oran), biyoçeşitlilik kavramı içerisinde yer almaktadır.

Tür çeşitliliği, belli bir bölgede yaşayan tüm türlerin nispi bolluğunu ve sayısını ifade eder. Geçmişten günümüze türler, canlılar dünyasının temel tanımlayıcı birimleri olmuşlardır ve bu nedenle biyolojik çeşitlilik çok yaygın ve yanlış bir şekilde tür çeşitliliği, özellikle de bir alandaki ya da habitattaki tür sayısı olan “tür zenginliği” ile eş anlamlı olarak kullanılmıştır (Swingland, 2001).

Tek başına tür sayısı düşünüldüğünde, dünyadaki yaşamın çoğunlukla böceklerden ve mikroorganizmalardan oluştuğu görülmektedir. Tür basamağı, genel olarak, tüm organizma çeşitliliğini göz önünde bulunduran en doğal basamak olarak kabul edilmektedir. Türler aynı zamanda evrimsel mekanizmaların birincil odak noktasıdır. Türlerin ortaya çıkışı ve yok oluşu biyolojik çeşitliliğin yönetilmesindeki başlıca etkenler olsa da, türler sistematikçiler tarafından net bir şekilde tanınmamakta ve sayılamamaktadır. Bir türün ne olduğu kavramı, organizma grupları arasında önemli ölçüde farklılık gösterir. Bu nedenle tür çeşitliliği tek başına biyoçeşitliliği tanımlamak için yetersiz kalmıştır.

Genetik çeşitlilik, organizmaları yapılandıran genetik materyallerin bileşenlerini, bir populasyon içindeki bireyler arasındaki ve populasyonlar arasındaki genetik varyasyonları kapsar yani genetik çeşitlilik populasyonlar içindeki ve populasyonlar arasındaki kalıtsal varyasyona bağlıdır. Ortaya çıkan genetik varyasyonlar bireylerde gen ve kromozom mutasyonları ile meydana gelmekte ve eşeyli üreyen organizmalarda rekombinasyon yoluyla populasyondaki diğer bireylere de yayılabilmektedir. Genetik varyasyon, hem doğal evrimsel değişimin hem de yapay seçici üremenin gerçekleşmesini sağlar (Swingland, 2001).

Ekolojik çeşitlilik, habitatların, ekosistemlerin ve bunların sürdürülebilirliğini sağlayan ekolojik süreçlerin çeşitliliğini ifade eder. Prensipde genetik ve tür çeşitliliği ile ne kastedildiğini tanımlamak mümkün olsa da, ekosistem, habitat veya topluluk düzeyinde çeşitliliğin nicel bir değerlendirmesini yapmak zordur. Ekosistemlerin küresel düzeyde özgün bir tanımı veya sınıflandırması bulunmamaktadır. Bu zorluğun üstesinden gelmek için, ekosistem çeşitliliği genellikle o ortamdaki türlerin çeşitliliğinin ölçülmesi yoluyla değerlendirilmektedir. Bu durum, farklı türlerin nispi bolluğunun değerlendirilmesinin yanı sıra tür çeşitliliğinin dikkate alınması konusunu içerebilmektedir. Türler bir alanda ne kadar bolsa, o alan veya habitat o kadar çeşitlilik içermektedir. Örneğin beta çeşitliliğini incelerken (yani alanlar arasındaki tür kompozisyonundaki değişiklik), topluluk benzerliğinin tek güvenilir

veri sağlayıcısı, habitatın hemen bitişik konumundaki diğer habitatla tür kompozisyonunun karşılaştırılmasıdır (Swingland, 2001).

Geleneksel olarak, bir mikrobiyal komüniteyi çalışabilmek için tek yol, mikroorganizmaları buldukları ortamdan izole etmek ve laboratuvar ortamında kültürlerini elde edip incelemektir. Bu kültürlerin elde edilme süreci öncelikle zenginleştirme adı verilen işlemle topluluk içindeki hedef organizmanın sayıca fazlaştırılmasını ve daha sonra saf kültür şeklinde izole edilmesini kapsamaktadır. Zenginleştirilmiş bir kültürde, istenilen organizmalar için seçici olan ve/veya istenmeyen organizmalar için engelleyici bir ortam ve bir inkübasyon koşulu oluşturulur. Etkin zenginleştirme kültürleri, organizmanın doğal nişine ve doğal ekosistem koşullarına mümkün ölçüde uyumlu olması gerekmektedir. Bir diğer geleneksel yöntem örneği saf kültür izolasyonudur. Bu yöntemde amaç zenginleştirme yapmadan veya farklı tiplerde zenginleştirmeler yapılarak tek tip mikroorganizma elde etmektir (Madigan and Martinko, 2005).

Siyanobakterilerin biyoçeşitlilik değerlendirmesi için kullanılan genel yaklaşımlar mevcuttur. Biyoçeşitlilik değerlendirmesi morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeylerde yapılmıştır. Siyanobakteriler genel olarak tek hücreli ve çok hücreli (ipliksi yapı) tipler olarak sınıflandırılmıştır. İpliksi yapılar dalsız olabilir dallanma gösterebilir ya da yalancı dallanmış yapılara sahip olabilirler. Ayrıca heterosistin varlığı veya yokluğu ve akinetlerin konumuna göre de değerlendirilmiştir (Kumari et al., 2009).

Morfolojik özelliklere dayalı olan mikroskobik yöntem araştırmaları geçmişten günümüze kullanılan ve halen daha kullanımı devam eden bir araştırma yöntemidir. Işık mikroskobu ve elektron mikroskobu kullanılarak taksonomik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Önceleri ışık mikroskobu kullanılmış ve ışık mikroskobu, çözümleme gücünün doğasında var olan sınırlamayı göz önünde bulundurarak, siyanobakteriyel hücrelerin organizasyonu hakkında çok az bilgi sağlayabilmiştir. 1950 ve 1960 yılları arasında elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar, daha önce bilinmeyen birçok yapıyı ortaya çıkarmış ve mevcut sistemin bir adım ötesine geçilmesini sağlamıştır. Siyanobakteriyel hücrelerin hepsi olmasa da yapısal karakteristiğinin birçok bileşeni elektron mikroskobu ile ortaya çıkmıştır (Stanier and Cohen-Bazire, 1977).

Siyanobakterilerin geniş çeşitlilikleri, farklı ekosistemlere hızlı adaptasyonları, biyolojik ve ekolojik açıdan geliştirdikleri başarılı yaşam stratejileri özellikle eşeysiz üreme ile birleştiğinde, çeşitliliğin belirlenmesi açısından sınıflandırma ve taksonomik değerlendirmeyi son derece zorlaştırmaktadır. Siyanobakterilerin taksonomik sınıflandırmasında morfolojik özelliklerin tek başına yetersiz olduğu kabul edilir (Komárek, 2016).

Siyanobakteriyel biyoçeşitlilik araştırmalarında öncelikle geleneksel yöntemin beraberinde getirdiği morfolojik özellikler kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca geleneksel izolasyon teknikleri yoğun emek ister ve yavaştır, bazen seri zenginleştirme kültürüne ihtiyaç duyulması ve optimal olmayan koşullar altında organizmaların yavaş gelişmesi nedeniyle çok fazla çaba ve yıllar süren zaman gerektiren yöntemler olmuş ve bu durum daha pratik sistemlerin oluşmasına zemin hazırlamıştır (Blainey, 2013).

Filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde DNA temelli metotlar kullanılmış ve büyük ilerleme göstermiştir. Bu metotlar genellikle PCR temellidir. PCR, herhangi bir kültürasyona ihtiyaç duyulmadan örneklerden doğrudan DNA amplifikasyonunun gerçekleştirilmesiyle mikrobiyal genlerin çalışılmasına olanak sağlamıştır. Hücrelerin büyütülüp çoğaltılmasına ihtiyaç duyulmadan yapılabildiği için bu metodoloji çok daha kullanışlıdır. PCR'a dayalı biyoçeşitlilik çalışmaları tartışmalı bir konu olsada kültüre dayalı çalışmalardan çok daha etkili ve hızlı bir şekilde bilgiler sağlamaktadır (García-Martínez et al., 1999).

Geleneksel moleküler metotlardan olan DNA parmak izi (fingerprinting) metotları siyanobakterilerin genetik çeşitliliğinin araştırıldığı çalışmalarda başarı ile kullanılmaktadır. Parmak izi metodları, hedef bölgenin PCR ile çoğaltılıp, jel ya da kapiler elektroforez ile DNA fragmentlerinin büyüklüklerine (örneğin; RFLP), erime sıcaklıklarına (örneğin; DGGE/TGGE) ya da yapısal (örneğin; SSCP) farklılıklarına göre ayrılmalarına dayanır (Wacklin, 2006).

Mikrobiyal biyoçeşitlilik araştırmalarındaki yetersizlikleri aşmak ve eksiklikleri giderebilmek için 16S rRNA gen bölgesi ve değişik DNA bölgelerinin dizi varyasyonlarını temel alan, kültür bağımlı veya kültür bağımsız moleküler analiz yöntemleri geliştirilmiştir 16S rRNA gen bölgesini kullanan kültürden bağımsız moleküler araştırmalar mikrobiyal toplulukların yapısını karakterize etmek için temel bir dayanak haline gelmiştir (Tringe and Hugenholtz, 2008). 16S rRNA dizi

verilerinin kullanılmasıyla mikroorganizmalar arasındaki evrimsel akrabalık ilişkileri hakkında daha çok bilgi elde edilebilmiştir.

Boyer ve diğerleri, 16S rRNA gen bölgesinden elde edilen dizilerin tür tanımının oluşturulmasında yeterli bilgiyi vermediği ve cins altı seviyede yapılan çalışmalar için uygun olmadığı kanısına varmışlardır (Boyer et al., 2001). rRNA operonunda 16S ile 23S dizilerini birbirinden ayıran ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesinin cins altı seviyede kullanılabilirliğini önermişlerdir. Siyanobakterilerde ITS bölgesinin, 16S rRNA bölgesinden daha az korunmuş olduğu bilinmektedir (Laloui et al., 2002). ITS bölgesinin RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) tabanlı ya da doğrudan dizileme çalışmalarıyla elde edilen veriler siyanobakteriyel çeşitliliği belirlemede kullanılmaktadır (Taton et al., 2003). RFLP tekniği kısaca, restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA molekülünün farklı büyüklükteki fragmentlere ayrılması ve görüntülenmesi işlemi şeklinde ifade edilebilir.

PCR tabanlı diğer bir teknik olan RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) tekniği saf kültür olarak bulunan izolatların ve simbiyotik yaşam süren siyanobakterilerin karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Bu yöntem birçok organizmanın suş düzeyinde tanımlanmasını sağlamaktadır fakat klonal (saf) kültürlerin kullanım gerekliliği bu tekniğin kullanılabilirliğinin sınırlı olmasının nedenidir (Lu et al., 1997).

16S-23S ITS bölgesinin kullanılması, filogeni çalışmalarında moleküler evrim ya da populasyon genetiği araştırmaları için, potansiyel olarak güçlü bir araçtır (Boyer et al., 2001). 16S rRNA dizisi, yakın ilişkiler için aşırı değişken ve son derece bilgilendirici bölgelere sahip olmasına rağmen, örneğin aynı cinse ait türlerin yakınlık derecelerini belirleyebilecek ve iyi bir ayırım sağlayacak kadar farklılık göstermemektedir (García-Martínez et al., 1999). Türlerin tanımlanması için 16S rRNA gen dizileme ve DNA:DNA hibridizasyonu her ne kadar moleküler kriterler olarak düşünülse de tüm genomun dizilenmesiyle daha fazla taksonomik veri elde edileceği şüphesizdir (Coenye et al., 2005).

Biyoeçşitlilik araştırma yöntemlerinden biri tam genom analizleridir. Tam genom analizi, bütün bir genomun analizi işlemine dayanmaktadır. Bu analizde kullanılan bir yöntem olan Sanger dizileme (Sanger et al., 1977) yöntemi DNA dizileme teknolojisi için önemli bir yöntem olmuştur. Sanger dideoksi yöntemi;

enzimatik olarak DNA sentezine ve sentezlenen zincirin inhibitör nükleotit formlarıyla rastgele sonlandırılması esasına dayanır. Dizisi saptanacak DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıptır. Yöntemin temelinde DNA polimerazın dNTP ve ddNTP'yi substrat olarak kullanılması vardır (Heather and Chain, 2016). Sanger Dizileme yöntemi, yüksek verimin gerek olmadığı uygulamalar için kullanışlı ve yararlıdır. En yaygın kullanımı, plazmit yapılarını veya PCR ürünlerini doğrulamak için spesifik bir kalıp üzerinde spesifik bir DNA primeri kullanılan bireysel dizileme reaksiyonları içindir.

Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) yöntemi bir başka tam genom analiz yöntemidir. Yeni nesil DNA dizileme, bilgisayar bilimlerindeki ilerlemelerle etkili bir şekilde hareket ederek ve genetik araştırmalarda bir devrimi başlatarak 2000'lerin ortasında yaygın bir şekilde kullanılabilir hale gelmiştir (Koboldt et al., 2013). Bu yöntemde daha önce mümkün olandan çok daha büyük biyolojik veri kümelerinin analizini mümkün kılmıştır Bu yöntemde, aynı anda paralel birçok dizileme reaksiyonu yürütülebilmekte, aynı zaman diliminde çok sayıda dizi hızlı bir şekilde belirlenebilmektedir.

Mikrobiyal biyoçeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan birçok çalışma, günümüzde moleküler araçları ve kaynakları daha fazla kullanmaya odaklanmaktadır (Xu and Zhao, 2018). Mikrobiyal komünitelerin popülasyonlarına ait bireylerin karakterize edilmesi için uzun yıllar boyunca kültür bağımlı analiz yöntemleri kullanılmıştır. Üretilen saf kültürlerle geleneksel yöntemler uygulanarak izolatların kimlikleri belirlenmeye çalışılsa da bu saf kültürlerle moleküler yöntemler de sıklıkla uygulanmaktadır Özellikle son yirmi-otuz yıldır geliştirilen yeni yöntemler, doğadan alınan komünite örneklerinin herhangi bir kültüre alma işlemi yapılmadan direkt olarak biyoçeşitlilik (genetik çeşitlilik) analizine tabi tutulmasını mümkün kılmıştır.

2.4.1. Metagenomik

Metagenomik, alınan çevresel örneklerin içerdiği genomların doğrudan genetik analizi şeklinde tanımlanmaktadır (Thomas et al., 2012). Metagenomik, mikrobiyal toplulukların işlevsel genlerine erişim sağlar ve bu nedenle, genellikle yalnızca tek bir genin (örneğin 16S rRNA geni) çeşitliliğine dayanan filogenetik araştırmalardan çok daha kapsamlı bir sonuç sunmaktadır. Karmaşık ekosistemlerde bulunan mikrobiyal toplulukların kültürden bağımsız bir şekilde direkt olarak çalışılıp

değerlendirilmesini sağlayarak mikrobiyolojide önemli bir gelişme sağlamıştır (Simon and Daniel, 2011).

1991 yılında deniz suyu örneğinden elde edilen çevresel DNA fragmentlerinin bir faj vektöründe ilk defa klonlaması rapor edilmiştir (Schmidt et al., 1991). Sonraki çalışmalarda DNA'yı çevresel örneklerden doğrudan klonlama fikri yaygınlaşmıştır (Pace, 1995). Metagenomik terimi ilk olarak 1998 yılında çevresel DNA'nın rastgele klonlanması işlemini de içeren toprak mikroorganizmaları üzerinde yürütülen bir çalışmada yayınlanmıştır (Handelsman et al., 1998). Daha sonra tanımlar bütün bir topluluğun analiz edildiği herhangi bir çalışmayı içerecek şekilde çeşitlilik göstermiştir; örneğin, bir ortamdan alınan örneklerde önceden kültüre alma işlemi yapılmadan toplam DNA'nın izolasyonu ve analizi sonucunda 16S rDNA çeşitliliği çalışmaları bu duruma bir örnektir.

Kültür bağımsız çalışmaların yanı sıra kültür bağımlı zenginleştirme çalışmalarında da metagenomik analizler yapılabileceği ve bu nedenle de metagenomik tanımının geniş tutulması gerektiği belirtilmektedir (Gilbert and Dupont, 2011). Kültüre edilemeyen organizmaların fizyolojisi ve genetiğine erişim sağlamak için tasarlanan, bir mikroorganizma popülasyonunun veya komünitenin tamamının veya belli bir kısmının genomik analizi olan metagenomik, güçlü bir araştırma yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır (Handelsman, 2004).

Tek tip organizma genom çalışmalarının sınırlılıkları mevcuttur. İlk olarak, teknoloji sınırlamaları, bir organizmanın tüm genomunu elde edebilmek için önce klonal olarak kültürlenmesi gerektiği anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, doğadaki mikroorganizmaların yalnızca küçük bir yüzdesi kültürlenebilmekte, bu da mevcut genomik verilerin yüksek oranda eksik olduğu ve mikrobiyal türlerin genomlarının gerçek durumunu temsil etmediği anlamına gelmektedir (Amann et al., 1995). İkincisi, mikroorganizmalar çok nadiren tek tür içeren topluluklar halinde yaşamaktadırlar ve türler hem birbirleriyle hem de habitatlarıyla etkileşime girmektedirler, bu konak organizmaları da içerebilmektedir. Bu nedenle, bir klonal kültür, organizma etkileşimi ve ortaya çıkan popülasyon genomik varyansı ve biyolojik işlevler açısından doğadaki gerçek durumunu temsil etmekte başarısız olmaktadır (Wooley et al., 2010). Metagenomik, kültür temelli analiz durumunu ortadan kaldırarak doğal komünite yapısının ve potansiyel işlevlerinin daha iyi

anlaşılmasını sağlamaktadır. Böylelikle mikrobiyal fonksiyonel genlerin çok daha kapsamlı olarak araştırılmasına imkan sağlamaktadır (Heather and Chain, 2016).

Son teknolojilerin mikrobiyolojiye getirdiği büyük ilerlemelere rağmen, bazı filumlar hala genomik çalışmalar bakımından yeterince kapsanmamıştır. Bakterilerin daha geniş bir karakterizasyonu için bazı engellerin üstesinden gelinmesi gerekmektedir. Siyanobakteriyel genomik çalışmaları, diğer bakteri filumlarının bazıları için şu anda gözlemlenenden nispeten daha yavaş bir hızda ilerleyen bir araştırma konusunun ilginç bir örneğini oluşturmaktadır. Siyanobakteriyel genomik dizilerin sayısı hala daha nispeten düşüktür. Siyanobakteriyel genomların sayısı, şu anda mevcut olan tüm prokaryotik genomların yaklaşık % 0,6'sını oluşturmaktadır. Bu nedenle, siyanobakteriler, diğer bakteriler ve hatta arkeler ile karşılaştırıldığında genomik veri tabanlarında ciddi şekilde yetersiz bir grup olarak temsil edilmektedir. Ek olarak, halihazırda mevcut olan siyanobakteriyel genom veri tabanları taksonomik, çevresel ve coğrafi çeşitlilikten yoksundur, bu nedenle veri tabanları bu filumun gerçek konumunu temsil edememektedir (Alvarenga et al., 2017).

Saf kültürlerden elde edilmiş genomlar geleneksel veya yeni nesil dizileme yöntemleriyle dizilenebilir (Davison et al., 2015). Geleneksel izolasyon kültüre bağımlı olduğundan, çalışmalar için oluşturulan çeşitli bakteri kültürlerinin çoğalabilme süreçleri farklılık göstereceğinden, kontaminasyon riskinin yüksek olduğundan ve bazı gruplar için bir kültür sisteminin mevcut olmamasından dolayı bazı zorluklar taşımaktadır. Dolayısıyla metagenomik alanına doğru yönelme dikkat çeken bir seviyede artış göstermektedir. Mikrobiyal komünitelerle ilgili moleküler çalışmalarda çevresel genomik ya da metagenomik daha kapsamlı bir genetik yaklaşımdır (Davison et al., 2015).

Standart genomik teknikler, kültür saflaştırması için aylar hatta yıllar süren bir yaklaşım olan saf kültürlerin dizilenmesini gerektirir. Bazı siyanobakteriler için bu durum imkansız gibi görünmektedir çünkü kültüre edilemeyen siyanobakteriler mevcuttur. Öte yandan, metagenomik yaklaşım, saf kültür elde etmek gibi zahmetli teknikleri geride bırakabilir ve bireysel genomlar, mikrobiyal birlikteliklerden başarılı bir şekilde elde edilebilir. Siyanobakterilerin nispeten az mevcut genomu sayısı nedeniyle, bazı konulara genomik yaklaşımların uygulanması büyük ölçekte henüz başarılı olamamıştır. Siyanobakteriyel araştırmalarda genomik çalışmaların daha yaygın bir şekilde kullanılmasını engelleyen teknik sorunlar olsa bile, genom

dizilimi düşük maliyetli ve kısa sürede sonuç elde edilen bir konuma gelmektedir ve metagenomik sonunda muhtemelen standart bir prosedür haline gelecektir. (Alvarenga et al., 2017).

Metagenomiğin gelişimi, henüz kültürlenmemiş olan mikroorganizmaların, dünyadaki çoğu ortamda bulunan organizmaların büyük çoğunluğunu oluşturduğunu göstermektedir. Metagenomik ile kültüre edilemeyen birçok mikroorganizma grubunun tanımlanması mümkün hale gelmektedir (Handelsman, 2004). Metagenomik çalışmalarda, belli bir mikrobiyal komüniteden kültür yapılmadan toplam DNA ve/veya RNA izole edilerek dizilenmektedir. Daha sonra elde edilen bu metagenom dizileri, bilinen türlerin belirlenmesi ve henüz bilinmeyen türlerin keşfedilmesi için önceden bilinen dizilerle karşılaştırılmaktadır (Gilbert and Dupont, 2011).

Metagenomik çalışmalarda bazı durumlarda, tür ve genellikle tür altı varyasyonların belirlenmesinde zorluklar mevcuttur. Bir komünitede bir popülasyonun bireyleri arasındaki (ya da çok hücreli bir organizmanın belli bir dokusuna ait hücreler arasındaki) varyasyonların belirlenmesinde daha etkili bir yaklaşım tek-hücre genomiği/metagenomiğidir. Bu yöntemde bir saf kültürden veya çevresel örnekten hücreler tek tek izole edilir, her bir tek hücrenin genomu amplifiye edilir ve dizilir (Blainey, 2013).

Saf kültürlerden elde edilen DNA ile çevresel örneklerden elde edilen DNA amplikonları arasındaki en temel fark çevresel örneklerden elde edilen DNA'ların farklı suşlara ait çok sayıda DNA fragmenti bulundurmasıdır. Bu nedenle saf kültürden izole edilen DNA örneklerinden elde edilmiş amplikonlar geleneksel yöntemlerle dizilenebilir olmasına rağmen metagenomdan elde edilen amplikonlar geleneksel yöntemlerle doğrudan dizilenemez. Bir metagenomdan elde edilen amplikonlar ya yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) yöntemleri ile dizilenebilir ya da öncelikle klonlanarak bireysel fragmentlerin izolasyonu sağlandıktan sonra geleneksel yöntemlerle dizilenebilir.

2.4.2. Amplikonları Klonlama Yöntemleri

Gen klonlama, rDNA'nın doğrudan amplifikasyonu ve analizinin kullanıldığı mikrobiyal toplulukların, kültür bağımlı analizlerden daha kapsamlı bir şekilde örneklenmesine izin vermektedir (Dunbar et al., 1999).

Gen klonlama, rekombinant DNA molekülü elde edebilmek için, klonlanacak geni içeren bir DNA parçası olan vektöre ihtiyaç duymaktadır. Vektör, ilgili genin genellikle bakteri olan bir konak (alıcı) hücreye taşınmasında görev alır. Konak hücre içerisinde vektör çoğalır ve çok sayıda özdeş kopya üretir. Konak hücre bölündüğünde elde edilen rekombinant DNA molekülünün replikasyonu gerçekleşir. Çok sayıda hücre bölünmesinden sonra aynı konak hücrelerin bir kolonisi yani klonu üretilmiş olur ve klondaki her hücre, rekombinant DNA molekülünün çok sayıda kopyasını içerir (Brown, 2020).

DNA fragmentinin bir plazmit vektörüne klonlanması, rekombinant DNA teknolojisinde rutin olarak yapılan bir işlemdir. Klonlama yöntemleri, liganın kullanıldığı ya da kullanılmadığına bağlı olarak iki sınıfa ayrılabilir. Klonlama çalışmalarında kullanılan en yaygın yöntem, DNA fragmentlerinin uyumlu uçlarını ve doğrusallaştırılmış plazmiti kovalent olarak bağlamak için DNA ligaz kullanımınıdır. Çevresel örneklerden elde edilen DNA'nın kalıp DNA olarak kullanıldığı durumda, içerisinde farklı fragmentleri taşıdığı düşünülen kör uçlu PCR ürününün bu geleneksel yöntemle klonlandığı düşünülürse, karışımında bulunan mevcut fragmentlerin temsil edildiği bir gen kütüphanesi elde etme durumu oldukça düşük bir olasılıktır. Buna rağmen içerisinde farklı dizilerin bulunduğu PCR fragmentlerinin etkili bir şekilde klonlanmasında T/A klonlama sistemi daha etkilidir. Bu sistem ısıya dayanıklı DNA polimerazların (*Taq* DNA polimeraz) sentezini gerçekleştirdiği zincirin 3' ucuna fazladan adenin nükleotidi (A) eklenmesi özelliğinden yararlanarak çok daha etkili bir ligasyon işlemi gerçekleştirme temeline dayanır. Bu nedenle kör uç oluşturan bir restriksiyon endonükleaz ile kesilen vektörün açıkta olan 3' uçlarına timin nükleotidi (T) bağlanır ve böylelikle PCR fragmenti ile vektör arasında tek bir bazlık dahi olsa komplementerlik sağlanmış olur (Zhou and Gomez-Sanchez, 2000).

Elde edilen PCR ürünlerinin (amplikonların) klonlanması farklı sistemler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu sistemlerden biri olan T/A klonlama, PCR ürünlerinin klonlanması için kullanılan en basit ve en etkili yöntemlerden biridir. *Taq* DNA polimeraz enzimi dahil olmak üzere belirli termofilik DNA polimerazların terminal transferaz aktivitesini kullanır. *Taq* DNA polimeraz, çift sarmallı bir DNA molekülünün 3' uçlarına tercihen tek bir adenin nükleotidi (A) ekleyen aktiviteye sahiptir ve bu nedenle *Taq* DNA polimeraz tarafından çoğaltılan PCR moleküllerinin

çoğu tek 3'-A çıkıntılarına sahiptir. Her iki ucunda tek 3'-T çıkıntıları olan doğrusallaştırılmış bir T-vektörünün kullanımı, 3'-A çıkıntıları bulunan PCR ürünlerinin doğrudan ve yüksek verimli bir şekilde klonlanmasına izin verir (Zhou and Gomez-Sanchez, 2000).

Geleneksel restriksiyon enzimi klonlama yöntemleri zaman alıcı yoğun emek isteyen ve nispeten düşük verimliliği olan yöntemlerdir. TOPO PCR klonlama sistemi (Invitrogen), standart klonlama prosedürlerinin zahmetli ve güvenilir adımlarını kaldırarak, çok daha hızlı klonlama reaksiyonlarını mümkün kılıp ve % 95'e kadar rekombinantlar elde edilmesini sağlamaktadır. TOPO klonlama sistemi, doğası gereği hem bir restriksiyon enzimi hem de bir ligaz olarak işlev gören DNA topoizomera z I'in aktivitesini kullanır. Bu enzim Vaccinia virüs replikasyonu sırasında gözlemlendiği gibi DNA'yı kesip yeniden birleştirir. Topoizomera z I, spesifik olarak 5'-(C/T)CCTT-3' pentamerik dizisini tanır ve 3' timidinin fosfat grubu ile kovalent bir bağ oluşturur. Daha sonra bir DNA zincirini keserek DNA zincirinin serbest kalmasını sağlar. Enzim daha sonra koparılmış DNA ipliğinin uçlarını yeniden bağlar ve kendisini DNA'dan ayırır. Topoizomera z I'in yeniden bağlama aktivitesinden yararlanmak için TOPO vektörleri, her 3' fosfata kovalent olarak bağlanan topoizomera z I ile doğrusallaştırılmış olarak sağlanır. Bu, vektörlerin doğrusal DNA fragmentlerini uyumlu uçlarla (5' fosfat) verimli bir şekilde bağlamasını sağlar (Patel, 2009).

Diğer bir klonlama sistemi olan CloneJET PCR klonlama sistemi (ThermoFisher, Kat. No: K1231), *Pfu* DNA polimeraz, *Taq* DNA polimeraz, Dream *Taq* DNA polimeraz (Thermo Scientific) veya diğer ısıya dayanıklı DNA polimerazlarla üretilen PCR ürünlerinin en yüksek verimlilikte klonlanması için geliştirilmiş pozitif seçim sağlayan sistemdir. Kör uçlu veya yapışkan uçlu herhangi bir DNA parçası bu klonlama sistemi kullanılarak başarılı bir şekilde klonlanabilmektedir. CloneJET PCR klonlama sistemi, kullanılan klonlama vektörü olan pJET1.2/blunt vektörüne bağlanacak fragmentlerin olası 3' uzantılarını körleştirme işlemini de içerir. Bu vektör, bir DNA fragmentinin klonlama bölgesine bağlanmasıyla bozulan inhibe edici bir gen içermektedir. Böylelikle rekombinant olmayan vektör taşıyan hücrelerin ölmesini sağlamakta ve yalnızca rekombinant plazmitli hücrelerin çoğalmasını mümkün kılmaktadır. Vektör, *in vitro* transkripsiyon için bir T7 promotörünün yanı sıra genişletilmiş çoklu bir klonlama

bölgesi içermektedir. Klonlanmış fragmentin uygun bir şekilde dizilenebilmesi için vektörün klonlama bölgesinin her iki tarafına dizileme primer dizileri dahil edilmiştir.

pJet 1.2/blunt, 6 baz çiftinden 10 kilobaz çiftine kadar gen bölgelerini kabul eden doğrusallaştırılmış bir klonlama vektörüdür. Vektörün 5' uçları fosforil grupları içermektedir, bu nedenle PCR primerlerinin fosforilasyonu gerekli değildir. Bazı DNA polimerazlar tarafından oluşturulan kör uçlu PCR ürünleri, vektör ile sadece 5 dk. içinde doğrudan bağlanabilmektedirler. *Taq* DNA polimeraz veya diğer DNA polimerazlar kullanılarak oluşturulan 3'A çıkıntılı PCR ürünleri ligasyondan önce ısı dayanıklı DNA körleştirme enzim karışımı ile körleştirilebilmektedir. Yaygın olarak kullanılan *E.coli* suşlarının çoğu, ligasyon ürünü ile doğrudan transforme edilebilmektedir. Amplikon klonlama çalışmalarında CloneJET PCR klonlama kiti etkili bir şekilde kullanılmaktadır.

2.5. Kaynak Özetleri

Siyanobakteriler, 3,5 milyar yıl önce ortaya çıkan olağanüstü çeşitli gram negatif prokaryotlardan oluşan bir gruptur. Çeşitlilikleri tek hücreden çok hücreliye, kokoidden dallanmış filamentlilere, neredeyse renksiz görünümünden yoğun pigmentliye, ototrofidan heterotrofiye, psikrofilikten termofiliğe, asidofilikten alkalofiliye, tatlı sulardan hipersalin sulara kadar çok çeşitli habitatlara yayılmışlardır. Hem serbest yaşam hem de endosimbiontlar olarak bulunurlar. İnsanlığa çeşitli şekillerde faydalı olabilecek potansiyel organizmalardan biri olarak kabul edilirler (Thajuddin and Subramanian, 2005). Çok farklı morfolojik ve genetik özelliklere sahip olmaları, gerek tür çeşitliliği gerek genetik çeşitliliği gerekse habitat çeşitliliği, taksonomileri, çok geniş alanda yayılış göstermeleri, ekosisteme faydaları veya zararları siyanobakteriyel araştırmaların başlıca araştırma konularını oluşturmaktadır.

Fotosentetik büyüme yeteneğine sahip olan siyanobakteriler, yüksek yapılı bitkilerin oksijenli fotosentez çalışmaları için model organizma olarak kullanılmışlardır. Çünkü hem çekirdek yapısı hem de kloroplast bulunduran daha yüksek yapılı organizmalarla karşılaştırıldığında nispeten daha basit genetik sistemlere sahip olmaları çeşitli araştırma alanlarında siyanobakterileri önemli organizmalar haline getirmektedir. 1996 yılında *Synechocystis sp.* PCC 6803, genomu yayınlanan ilk siyanobakteri olmuştur (Kaneko et al., 1996).

1996 yılında Neilan tarafından yapılan bir çalışmada. sınıflandırmanın morfolojik karakterlerdeki farklılıklara dayandığı ve taksonların ayrı ayrı tanımlanmasında daha çok kesinlik, genomun doğrudan analizi ile elde edilebilir olduğunu belirtilmiştir. Mikrobiyal ekoloji ve evrim çalışması, DNA amplifikasyonu ve dizi analizi için hızlı yöntemlerin tanıtılmasıyla büyük ölçüde kolaylaştırılmıştır. Çalışmada, siyanobakteriyel grup içerisindeki farklılığın tanımlanması ve sınıflandırılması için yararlı olabilecek toksik ve bloom oluşturan siyanobakterilerin genetik özelliklerinin karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Tek tip mikroorganizma bulundurmeyen karışık doğal popülasyonlarda mikroorganizmaların moleküler olarak tiplendirilmesi için DNA amplifikasyonu yöntemlerinin kullanılması, siyanobakteriyel sistematiğe filogeninin önemini artırmıştır (Neilan, 1996).

2001 yılında Lopez ve arkadaşları Meksika Baja Kaliforniya'daki ekstrem koşullarda siyanobakteriyel çeşitliliği polifazik bir yaklaşımla incelemişlerdir. Ekstrem koşullar, hipersalin ekosistemleri, deniz dibini, hidrotermal kaynakları ve karides çiftliğini içermektedir. Bu çalışmada dört yeni siyanobakteriyel morfotip tanımlamışlardır. Tanımladıkları bu morfotipleri, ellerinde mevcut olan 16S rRNA genlerinin kısmi dizileri ve dört siyanobakteriyel suşun filogenetik ilişkileri ile birlikte sunmuşlardır. Işık mikroskobu, kültürler ve 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılmalı analizini içeren polifazik çalışmalar, bu oksijen üreten fotosentetik mikroorganizmaların kültürde ve doğada çeşitliliğini belirleyebilmek için o dönemde mevcut olan en güçlü yaklaşımı sağlamıştır (López-Cortés et al., 2001).

2008 yılında Dorador ve arkadaşları, Şili'nin kuzeyindeki yüksek rakımlı tuzlu sulak bir alan olan Salar de Huasco'daki siyanobakteriyel çeşitliliği araştırmışlardır. Salar de Huasco'nun dört temsili bölgesinden su ve tortu örneklerindeki siyanobakterilerin çeşitliliğini, denatüre edici gradyan jel elektroforezi ve 16S rRNA gen PCR ürünlerinin klon kütüphanelerinin analizi ile incelemişlerdir. Bu sulak alanın fizikokimyasal koşulları ve ilgili biyotası bakımından zıt olan bir yan akarsu ve üç sığ lagün numunelerini analiz etmişlerdir. Su ve tortu örneklerinin yedi klon kütüphanesinden türetilen toplam 268 klonal dizide yetmiş sekiz filotip tanımlanmıştır. *Oscillatoria* türlerine sıklıkla yan akarsu örneğinde, lagünlerden alınan su numunelerinde ve yine lagünlerden alınan tortu numunelerinde karşılaşmışlardır. *Pleurocapsales* (altbölüm II) üyelerine yalnızca yan akarsu bölgesinde rastlarken, *Chroococcales* (altbölüm I) üyelerini yan akarsu ve lagün

bölgelerinin tortu örneklerinden ve bir başka lagün bölgesindeki su örneklerinden elde edilmişlerdir. *Nostocales* (altbölüm IV) üyelerine iki farklı lagün bölgesindeki tortu örneklerinde ve bir başka lagün bölgesinden alınan su örneklerinde rastlamışlardır ve büyük ölçüde *Nodularia spumigena* türüne oldukça benzer dizilerle temsil edilmişlerdir. Salar de Huasco'daki siyanobakteriyel toplulukların benzersiz olduğunu öne sürmüşlerdir (Dorador et al., 2008).

2012 yılında Rigonato ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, Brezilya'da bulunan Mangrov ormanının filosferindeki siyanobakteriyel biyoçeşitliliği belirlemişlerdir. Bu çalışma, kültürden bağımsız yaklaşımlar kullanılarak Mangrov filosferindeki siyanobakterilerin çeşitliliğinin araştırılmasına öncülük etmiştir. Mangrov ekosistemlerindeki ağaçların yapraklarına kolonileşen siyanobakterilerin genotiplerini ilk kez tanımlamışlar ve bu toplulukların bileşimini şekillendiren çevresel faktörleri açıklamışlardır. Sonuçlar, gelgit rejimi, tuzluluk ve deniz aerosollerini gibi çevresel gradyanların ekosistem ölçeğinde topluluk kompozisyonunu kontrol edebileceğini, bitki türlerinin ise siyanobakteriyel meta topluluğun bir alt kümesini seçebileceğini ve yapıyı daha yerel bir ölçekte empoze edebileceğini öne sürmektedir. Filogeni her zaman işlevi tahmin etmese de, filogenetik analiz, mangrov ağaçlarının filosferinde potansiyel diazotrofların varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu çalışma, mangrov ekosistemlerindeki filosfer nişlerinde yaşayan siyanobakterilerin ekolojisine yeni bakış açıları sağlamıştır. Hem klon kütüphanesi hem de PCR-DGGE sonuçlarının habitatlar arasında ve bitkiler arasında karşılaştırılması, bir ekolojik filtreler hiyerarşisinin siyanobakteriyel topluluk yapısını belirlediğini açıkça ifade etmişlerdir (Rigonato et al., 2012).

2014 yılında Faldu ve diğerleri, Hindistan'ın Gujarat eyaletindeki deniz ve tatlı su siyanobakterilerinin çeşitliliğini belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Daha önce Gujarat'daki habitatlardan gelen siyanobakterilerin, çeşitlilikleri açısından araştırmalarının yetersiz olduklarını düşünmüşler ve bu çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırmalarında, tatlı su ve deniz habitatlarından morfolojik olarak farklı sekiz siyanobakteriyel izolat elde etmişler ve bu izolatların karakterizasyonunu tanımlamışlardır. Tanımlamaları, morfolojik özelliklere ve 16S rDNA dizi analizine dayalı olarak yapmışlardır. Siyanobakteriyel izolatların 16S rDNA dizisine dayalı bir filogenetik ağaç hazırlamışlardır. Filogenetik analiz, morfolojik olarak farklı sekiz izolatı iki ayrı grupta toplamıştır ve böylece

siyanobakteriyel çeşitliliğin incelenmesinde hem morfolojik hem de genetik yöntemlerin önemini vurgulamışlardır (Faldu et al., 2014).

2017 yılında Celepli ve diğerlerinin yapmış olduğu bir çalışmada, Baltık denizi siyanobakterilerinin meta-omik analizlerini çeşitlilik, topluluk yapısı ve tuz iklimini araştırmışlardır. Burada, Baltık denizi siyanobakterilerinin genetik kimliğini, filogenetik çeşitliliğini ve uzamsal dağılımını hedefleyen sonraki analizlerle birlikte metagenomik ve transkriptomik bir araştırma yapmışlardır. Siyanobakteriyel topluluk, “bloom” öncesi dönemde (Haziran ve Temmuz) örneklenen mikrobiyal popülasyonun yaklaşık %12'sini oluşturduğunu söylemişlerdir. Topluluğa tek hücreli pikosiyanobakteriler, özellikle de oldukça bol bulunan birkaç takson (*Synechococcus* ve *Cyanobium*), bu iki taksonda nispeten daha düşük bollukla temsil eden diğer taksonlar eşlik etmiştir. Baltık denizindeki siyanobakterilerin, komşu limnik ve deniz sularında bulunanlardan ve ayrıca ekimi yapılmış ve dizilenmiş pikosiyanobakteriyel türlerden genetik olarak farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Çeşitliliğin, düşük azot ve fosfor oranları ile acı tuzlulukta zirveye ulaştığını iletmişlerdir. Topluluk kompozisyonunda acı sulardan deniz türlerine doğru bir kaymaya, tuz iklimi ile ilgili genlerin repertuarında ve ifadesinde bir değişiklik oluştuğunu ifade etmişlerdir Genel olarak, “bloom” öncesi siyanobakteriyel popülasyon, daha önce belgelendirilenden, genetik olarak daha çeşitli, yaygın ve bol olduğunu; tek hücreli pikosiyanobakteriyel çeşitliliğin, tüm Baltık denizi tuzluluk gradyanı boyunca en bol olan kuşak olduğunu belirtmişlerdir (Celepli et al., 2017).

2018 yılında Affe ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada Shotgun metagenomik dizilimi kullanarak Brezilya'nın kuzeydoğu kıyısında tropikal bir oligotrofik nehir ağız sistemi olan Camamu Körfezi'ndeki siyanobakterilerin tür kompozisyonunu, dağılımını ve fonksiyonel profillerini değerlendirmişlerdir. Yüzey suyu örnekleri körfezin üç hidrodinamik bölgesindeki dokuz istasyonda iki farklı yağış döneminde (yağmurlu ve kurak mevsimler) değerlendirilmiştir. Tek bir istasyondan, her mevsimde, 12 saat boyunca 3 saatlik aralıklarla bir gelgit döngüsü üzerinden numuneler alınmış, çeşitli tatlı su, örihalin ve deniz siyanobakterileri topluluğunu gösteren toplam 219 siyanobakteriyel taksonu tanımlamışlardır. Nispi olarak daha fazla bolluğa sahip cinsler, *Synechococcus* ve *Prochlorococcus* olarak belirlenmiştir. Camamu Körfezi belirgin deniz özelliklerine sahip olmasına rağmen, yağışlı

mevsimde denizel ortama tatlı su girdisi, tür zenginliğinde artışla birlikte siyanobakteri topluluğunda varyasyon artışına neden olmuştur. *Synechococcus*'un yüksek görülme sıklığı (dizilerin % 90'ı) nedeniyle, fonksiyonel analiz kuru ve yağışlı mevsimler arasında gen içeriğinde sadece küçük farklılıklar şeklinde ortaya çıkmıştır. Hem yağışlı hem de kurak mevsimlerde, yüksek gelgit sırasında *Prochlorococcus*'un nispi bolluğunda bir artış meydana geldiğini tespit etmişler ve bu da körfezdeki gelgitin siyanobakteriyel cinslerin nispi bolluğuna etkisinin olduğunu göstermiştir (Affe et al., 2018).

2019 yılında Jankowiak ve diğerleri, Kuzey Amerikanın beş büyük gölünden en sığ olan Erie gölünde (batı kısmı) nitrojen, fosfor ve sıcaklığın siyanobakteriyel ‘‘bloom’’, çeşitlilik ve toksisite üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, doğal ve deneysel gradyanlara yanıt olarak batı Erie gölündeki aşırı alg çoğalması sırasında fitoplankton, siyanobakteriyel (16S rRNA geni ile) ve mikrosistin üreten (*mcyE* geni ile) topluluklardaki değişiklikleri değerlendirmek için geleneksel ve yeni nesil dizileme yaklaşımlarını kullanmışlardır. 16S rRNA ampliconlarının dizilenmesi, bu göldeki her iki koyda iki farklı *Synechococcus* grubunun yüksek bolluğunu içeren kriptik siyanobakteriyel çeşitliliği (47 cins) ve besin açısından zengin yakın kıyı bölgeleri ile daha az ötrofik açık deniz sahaları arasındaki topluluk yapısında önemli farklılıkların olduğunu ortaya çıkarmıştır. *mcyE* genlerinin dizilimi, düşük taksonomik yakınlık ortaya koymuşken yüksek genetik çeşitliliğin olduğu belirlenmiştir. Siyanobakteriyel bolluk, yeşil ve kahverengi algleri aynı anda baskılayan kombine yüksek azot, fosfor miktarı ve sıcaklık faktörleri en büyük artışlarla birlikte, yüksek azot miktarına yanıt olarak önemli ölçüde artmıştır. Azot, mikrosistin konsantrasyonlarını ve *Planktothrix* gibi diazotrofik olmayan cinslerin nispi bolluğunu önemli ölçüde artırırken, *Dolichospermum* ve *Aphanizomenon* gibi diazotrofik cinslerin yüksek fosfor ve sıcaklık varlığında geliştiklerini belirtmişlerdir. Besinler ve yüksek sıcaklıklar cyanoHAB'ları teşvik ederken, farklı kombinasyonlar seçici olarak bireysel siyanobakteriyel cinsleri ve suşları teşvik eder, bu da özellikle göl sıcaklıkları yükseldikçe Erie Gölü'ndeki tüm siyanobakterileri kontrol etmek için hem azot hem de fosfor girdisinin yönetilmesi gerektiğini açıkça vurgulamışlardır (Jankowiak et al., 2019).

2020 yılında Willis ve Woodhouse'nin yayınlamış olduğu bir derlemede, siyanobakterilerin çeşitliliği ve tanımı tartışılmıştır. Tür sınırlarını tanımlamak için

geleneksel ve yeni yöntemlerin olması gerektiğini söylemiş ve genomik yoluyla yapılan ilerlemelere odaklanarak sonuca ulaşılması gerektiğini ifade edilmiştir. Genom plastisitesinin, siyanobakterilerin çevresel değişikliklere hızla adapte olmalarına ve dirençli olmalarına izin verdiğini, kalıcılıklarının çeşitli yollarının olmasının biyolojilerinin önemli bir yönü olduğunu belirtmişlerdir. Yeni taksonomik tanımların, tür kavramı ve bilimsel çabalarla ilgili bir tür sınıflandırması ile tür içi genetik çeşitliliğin hesaba katması gerektiğini ifade etmişlerdir. Karşılaştırmalı genomik yaklaşımlarla tür içi çeşitliliği yakalamak, tür sınıflandırması için yeni bir yol sağlayabilir düşüncesini dile getirmişlerdir. Örneğin, mevcut genomların karşılaştırılması, *Raphidiopsis* ve *Microcystis*'in tür tanımlamalarının farklı temellere dayandığını göstermektedir. Her iki cinste de tür sınırları, homolog rekombinasyonun kısıtlandığı yaklaşık %96 ortalama nükleotid özdeşliğinde meydana gelir ancak *Raphidiopsis raciborskii*, *R. brookii* ve *R. curvata*'nın türleşmesi coğrafi izolasyon yoluyla meydana gelirken, *Microcystis* ile ilgili mevcut veriler, farklı boyutlarda, birlikte var olabilecek farklı ekotipleri yansıtan en az 15 tür ile temsil edildiğini göstermiştir. Her iki durum çalışması da, türlere özgü ve habitata özgü gen havuzlarının tür içi ve türler arası çeşitliliğin itici güçleri olarak göreceli önemini sorgulamaktadır (Willis and Woodhouse, 2020).

Türkiye’de yapılan siyanobakteriyel biyoçeşitlilik araştırmaları, genelde mikroskopik yöntemler kullanılarak yapılmış olan alg çalışmalarının bir parçası olarak karşımıza çıkmaktadır.

2003 yılında Soylu ve Gönüloğlu, Yeşilirmak nehrinde (Amasya) fitoplanktonlar ve mevsimsel değişimlerini içeren bir araştırma yapmışlardır. Nehirdeki alg yoğunluğunu belirlemek için topladıkları su örneklerini fikse etmişler ve mikroskop altında gözlemledikleri morfolojik özelliklerine göre tanımlamışlar ve sayım işlemini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma periyodu boyunca toplam 47 fitoplanktonik takson belirlemişler. Bunlardan 6 taksonu siyanoprokaryotların oluşturduğunu belirtmişlerdir (*Anabaena catenula*, *Anabaena sp.*, *Arthrospira major*, *Cylindrospermum stagnale*, *Phormidium tenue*, *Pseudoanabaena limnetica*) (Soylu and Gönüloğlu, 2003).

2003 yılında Ersanlı ve Gönüloğlu, Samsun Terme ilçesinde konumlanan Simentit gölünde fitoplankton ve mevsimsel değişimi üzerine araştırma yapmışlardır. Fitoplanktonların tanımlamaları morfolojik özelliklerden yararlanılarak mikroskop

altında gerçekleştirilmiştir. 24 taksonun siyanobakteriyel takson olduğunu belirlemişlerdir (Ersanlı and Gönülo, 2003).

2007 yılında Taş ve Gönülo, Türkiye'nin en değerli sulak alanlarından biri olan Kızılırmak deltasının Cernek (Bafra,Samsun) gölünde fitoplanktonlar ile ilgili ekolojik ve taksonomik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Toplamda 104 takson belirlemişler ve bunların 17 tanesinin siyanobakteriyel takson olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri veriler doğrultusunda fitoplanktonlar arasında siyanobakterilerin %16'lık bir dilimde olduklarını ifade etmişlerdir. Diğer çalışmalarında olduğu gibi fitoplanktonların tanımlanmasında morfolojik yapıları baz alarak taksonların teşhisini gerçekleştirmişlerdir (Taş and Gönülo, 2007).

Gönülo ve diğerleri Kızılırmak deltasında yer alan, lagün gölleri olan Balık ve Uzungöl göllerinde epipelik algler ile ilgili taksonomik bir çalışma yapmışlardır. Çalışma, morfolojik karakterlerin mikroskopik inceleme ile arazi örneklerinden fikse edilmiş taksonların teşhisi esasına dayanır. Toplamda 106 takson tespit etmişlerdir. Taksonlardan 85 tanesi Balık gölünde, 78 tanesi Uzun gölde tespit etmişlerdir. Tespit edilen 44 taksonun her iki gölde de mevcut olduğu için değerlendirmeye alınmadığı bildirilmekte, bu taksonlar arasında ne kadarının siyanobakteri olduğu hakkında bilgi verilmemektedir. Sadece Balık gölünde temsil edilen taksonlardan 18'i siyanobakteriyel takson olarak belirlenmiş, sadece Uzun gölde tespitlenler arasında ise 12 tane siyanobakteriyel taksonun mevcudiyeti tespit edilmiştir (Gönülo et al., 2009).

2010 yılında Şahin ve diğerleri, Artvin Şavşat'ta bir göl olan Balık gölündeki epipelik alg türlerinin bileşimi ve çeşitliliği ile ilgili 2008 yılı mayıs ve ekim aylarında aldıkları su örneklerinden çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada toplamda 39 takson tespit etmişler ve bunların sadece 3 tanesinin siyanobakteriyel takson olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada da morfolojik özelliklere göre karakterizasyon işlemi gerçekleştirilmiş olup tür çeşitliliğini belirlemişlerdir (Şahin et al., 2010).

2012 yılında Baykal ve diğerlerinin yayınlamış olduğu bir çalışmada, küçük bir ova nehir-göl sisteminde (Melen Nehri, Türkiye) fitoplankton bileşimi ve biyokütlenin mevsimsel değişimlerini araştırmışlardır. Bu çalışmada 135 takson belirlemişlerdir. Bu taksonlardan 10 tanesinin siyanobakteri olduğunu belirtmişlerdir. Birçok çalışmada olduğu gibi gerek diğer fitoplanktonların gerekse

siyanobakterilerin morfolojik özelliklerinden yararlanılarak organizmaların fiksasyonu yapıldıktan sonra mikroskopik tayin ile tür çeşitliliğini ortaya çıkarmışlardır (Baykal et al., 2011).

2014 yılında Atıcı ve Tokatlı'nın yayınladığı bir makalede, Mogan (Ankara), Karagöl (Ankara), Abant (Bolu) ve Poyrazlar (Sakarya) göllerinde alg toplulukların belirlenmesi ve karşılaştırılması yapılmıştır. Fitoplankton örnekleri formaldehitte fikse edildikten sonra mikroskopik olarak morfolojik özelliklerinden yararlanılarak tanımlanmıştır. Toplamda 36 siyanobakteriyel takson belirlemişlerdir. Dört göl için genel olarak diğer fitoplankton varlığına göre az (ml'de 25-49 birey) ve çok az (ml'de 1-24 birey) sayıda siyanobakteri olduğunu tespit etmişlerdir (Atıcı and Tokatlı, 2014).

2016 yılında Yılmaz Cankılıç ve Arık Berk, Afyonkarahisar'da Ömerli, Akkuş-Gazlıgöl ve Hüdai-Sandıklı kaplıcalarının siyanobakteriyel biyoçeşitliliğini DGGE (denatüre gradyent jel elektroforezi) yöntemi ve PCR ile amplifiye edilmiş 16S rRNA fragmentlerinin klonlanması dahil olmak üzere kültür bağımlı ve kültür bağımsız yöntemler kullanılarak analiz etmişler ve analiz sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Kültür çalışmalarında toplam 74 izolatanın 6 farklı ARDRA (Amplifiye Ribozomal RNA Restriksüyon Analizi) profiline sahip olduklarını ve bunların cins düzeyinde tanımlandığını ayrıca tüm siyanobakteriyel izolatların filogenetik olarak *Fischerella*, *Geitlerinema/Leptolyngbya* cinsleri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. 16S rRNA gen kütüphanesinden toplam 97 klonu ARDRA ile analiz etmişlerdir. Bu klonların 16S rRNA dizi analizi, siyanobakteriyel klonların, çevresel örneklerden ve *Geitlerinema* ve *Leptolyngbya* cinsi üyelerinden alınan 16S rRNA dizileri ile ilişkili olduklarını ortaya çıkartmışlardır. Yapmış oldukları bu çalışmada Afyonkarahisar kaplıcalarının siyanobakteriyel çeşitliliğini vurgulamışlardır (Yılmaz Cankılıç and Arık Berk, 2016).

2018 yılında Öztürk ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada, Türkiye'deki göllerden izole edilen siyanobakteri ve klorofitlerin moleküler ve morfolojik karakterizasyonlarının incelenmesi ve karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Yaptıkları çalışmanın genel amacı, *Cyanobacteria* ve *Chlorophyta* türlerinin farklı klonal kültürlerinin Apa baraj gölü ve Beykavağı göletinden (Konya, Türkiye) ve Eber gölünden (Afyon, Türkiye) izolasyonlarını yapmışlardır. Türlerin morfolojik çeşitliliğini kültür koşulları altında hem ışık mikroskobu hem de taramalı elektron

mikroskobu ile görselleştirmişlerdir. Buna ek olarak elde edilen bu suşların 16S rRNA ve 18S rRNA gen dizileri ile filogenetik ilişkilerini belirlemişlerdir. Çalışmada değinilen en önemli nokta, tür karakterizasyonları için morfolojik özelliklerin yeterli olmayışı bunun yanında moleküler tekniklerin de kullanılmasıyla daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi gerektiği görüşüdür (Öztürk et al., 2019).

2020 yılında Özbayram ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada Sapanca gölündeki “bloom” oluşturan siyanobakteriyel türlerin çeşitliliğini belirlemişler ve türlerin karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu çalışmada, Sapanca Gölü'ndeki siyanobakteriyel “bloom” ile ilişkili bakteri topluluğu kompozisyonunun yüksek verimli dizileme yöntemiyle anlık durumun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Sapanca Gölü kıyısında bir siyanobakteriyel “bloom” sırasında örnek toplanmış ve bakteri topluluk profili, Illumina MiSeq platformu kullanılarak 16S rRNA amplicon dizilemesi ile incelenmiştir. Siyanobakteriler, tüm okumaların %94'ünü temsil etmiştir. Bakteri topluluğu, siyanobakteri dizilerini filtreleyerek bakteri çeşitliliğini ayrıntılı olarak değerlendirmek için yeniden hesaplanmıştır. Kompleks organik materyalleri parçalama kabiliyetine sahip tatlı su ekosistemlerinde bol miktarda bulunan *Proteobacteria* (%44) ve *Bacteroidetes* (%33) türleri topluluğa hakim olmuştur. Sınıflandırılmış cinsler arasında, *Flavobacterium* ve *Rheinheimera* türlerinin bakteri topluluğuna egemen olduğunu ve bu türler ile siyanobakteriyel bloom arasında güçlü bir bağlantı olabileceğini ifade etmişlerdir. Burada sunulan deneysel çalışma, yüksek verimli dizileme yöntemiyle Sapanca Gölü'ndeki toplam bakteri topluluklarının ilk araştırmalarından biri olmuştur (Özbayram et al., 2020).

2020 yılında Özen, Bursa Uluabat gölünde siyanobakteriyel türlerin ve toksinlerin belirlenmesi amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma ile ekolojik öneme sahip Uluabat Gölü'nün, siyanotoksinler ve potansiyel toksik siyanobakteriler açısından araştırılması amaçlamışlardır. Uluabat Gölü'nden izole edilen siyanobakteri suşlarının kültürü yapılmıştır. Hem arazi örneklerinde hem de kültür örneklerinde mikrosistin, saksitoksin, anatoksin-a ve silindrospermopsin toksinlerinin varlığı enzim bağlı immüno-sorbent deneyi (ELISA) ve reseptör bağlanma analizi (RBA) ile araştırmışlardır. Ayrıca örneklerde (PCR) ile 16S rRNA ve toksin genleri taraması yapılmıştır. Morfolojik karakterizasyon ile izole edilen suşların *Microcystis aeruginosa*, *Dolichospermum cf. sigmoideum*, *Limnothrix planctonica*, *Cuspidothrix issatschenkoi*, *Calothrix elenkinii*, *Planktothrix isothrix*,

Dolichospermum ellipsoides, *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*, *Synechocystis aquatilis*, *Aphanocapsa grevillei* ve *Microcystis smithii* taksonlarına ait olduğunu belirlemişlerdir. 16S rRNA gen dizilerine dayalı neighbor-joining (NJ) ve maximum likelihood (ML) metotlarını kullanarak filogenetik ağaçlar oluşturmuşlar ve yukarıda belirtilen 9 suşun *M. aeruginosa*, *Limnothrix sp.*, *Calothrix sp.*, *S. aphanizomenoides* ve *C. issatschenkoi* taksonlarına ait olduğunu belirlemişlerdir (Özen, 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Alanı

Samsun ili 19 Mayıs ilçesi idari sınırları içinde yer alan $41^{\circ}57'90.48''$ kuzey, $36^{\circ}08'04.74''$ doğu koordinatlarına sahip Balık Gölü, araştırma alanı olarak seçilmiştir. Kızılırmak Deltası'nın doğusunda yer alan göl , bölgede bulunan diğer göller arasında merkezi konumda olup sığ bir kıyı set gölüdür. 19 Mayıs ilçesi sınırları içerisinde yaklaşık 1380 hektarlık alanı kaplar (Cüce vd., 2011). Elipsimsi bir görünümde olan gölün ana yönelimi kuzey güney doğrultusunda olup hafifçe kuzeydoğu-güneybatı yönelimine sahiptir. Şekil 3.1.'de Balık gölü ve çevresindeki göllere ait uydu görüntüsü verilmektedir.

Balık gölü, Kızılırmak deltası üzerinde bulunan diğer göller gibi, tarım, turizm ve balıkçılık açısından önemli bir ekosistemdir. Ancak göl ekosistemi sulama, sediment tortuları, tarım ve evsel atıklardan kaynaklı suyun kirlenmesi ile zamanla bozulmaktadır ve gölün trofi seviyesi de bu yüzden ciddi bir problemle karşı karşıyadır (Bekleyen ve Tas, 2008). Balık gölünün ve bu göle komşu olan göllerin çevresinde sazlık alanlar ve bataklıklar mevcuttur. Delta alanında manda yetiştiriciliği ve diğer hayvancılık faaliyetleri yapılmaktadır. Göl çevresinden yaklaşık 1-2 km uzaklıkta tarım alanları bulunmaktadır ve burada çeltik tarımı yapılmaktadır.



Şekil 3.1. Balık gölü ve çevresini gösteren harita. (<https://www.google.com/maps/@41.5802655,36.0717657,10423m/data=!3m1!1e3> 05.02.2021)

3.2. Su Örneklerinin Alınması, Hücrelerin Hasatı ve Saklanması

Balık Gölü'nden mevsimleri temsilen 2019 yılı Mayıs, Ağustos ve Kasım aylarında ve 2020 yılının Şubat ayında gölün güney kıyısından yaklaşık 800 m uzakta orta kısmına yakın bölgede belirlenen istasyonundan (41°57'90.48'' Kuzey, 36°08'04.74'' Doğu) yüzeyden ve 2 m derinden 1 litrelik şişeler ile su örnekleri alındı. Yüzey örnekleri yüzey altından (yaklaşık 10 cm) doğrudan elle alınırken 2 m derinden Niskin şişesi yardımıyla alındı. Örnekler aynı gün laboratuvara getirildi. Araziden alınan su örnekleri süzme sistemi (Sartorius Stedim, type: 16692) kullanılarak 0,45 µm gözenek açıklığına sahip supor filtreden (Milipore) süzüldü. Bakteriyel komünite üyelerini taşıyan her mevsim için en az 2 adet olarak hazırlanan bu filtreler 1,5 ml steril eppendorf tüplere yerleştirildi ve DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.3. Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözeltiler Sambrook ve Russel tarafından (Sambrook and Russell, 2001) önerildiği gibi hazırlandı.

- 2 M Mg²⁺ Stok Çözeltisi:

20,33 gr MgCl₂.6H₂O (Merck) 50 ml ultra saf suda çözüldü ve steril hale getirildi.

- 250 mM KCl Çözeltisi:

1,86 gr KCl (Sigma Aldrich) 100 ml ultra saf suda çözüldü. Otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildi ve daha sonra oda sıcaklığında saklandı.

- 0,5 M Tris-HCl çözeltisi:

12,11 gr Tris (Sigma Aldrich) 150 ml ultra saf suda çözüldü ve pH HCl ile 8,0'a ayarlandı. Son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı ve otoklavda 121°C' de 20 dk. steril edildi.

- 0,5 M EDTA stok çözeltisi:

186,1 gr disodyum etilen diamin tetraasetat 2H₂O (Appllichem) 800 ml ultra saf suda çözüldü. pH NaOH ile 8,0'a ayarlandı. Ultra saf su ile toplam hacim 1 litreye tamamlandı. Otoklavda 121°C' de 20 dk. steril edildi.

- 10X TBE (Tris Borik Asit- EDTA) stok çözeltisi:

27 gr Tris (Sigma Aldrich) ve 13,75 gr Borik Asit (Sigma Aldrich) 180 ml ultra saf suda çözüldükten sonra 10 ml 0,5 M EDTA (Sigma Aldrich) eklendi, HCl ile pH

8,0'a ayarlandı ve toplam hacim 250 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C'de 20 dk. steril edildi.

- 1X TE (Tris-EDTA) stok çözeltisi:

250 mM Tris-HCl stok çözeltisinden 2 ml alındı (son konsantrasyon 10 mM) ve 500 mM EDTA stok çözeltisinden 200 µl alındı (son konsantrasyonu 1 mM), 90 ml saf su eklendikten sonra pH 8,0'a ayarlandı. Son hacim ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak, otoklavda 121°C' de 20 dk. steril edildi.

- 0,1X TE çözeltisi:

250 mM Tris-HCl stok çözeltisinden 2 ml (son konsantrasyon 10 mM) ve 500 mM EDTA stok çözeltisinden 20 µl alındı (son konsantrasyonu 0,1 mM), 90 ml ultra saf su eklendikten sonra pH 8,0'a ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak, otoklavda 121°C' de 20 dk. steril edildi. Bu çözelti PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılacak DNA stoklarının hazırlanması amacıyla kullanıldı.

- 3 M Sodyum Asetat stok çözeltisi:

246,009 gr sodyum asetat (Sigma Aldrich) 800 ml ultra saf suda çözüldükten sonra glasiyel asetik asit ile pH 5,6'ya ayarlandı. Saf su ile hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 20 dk. steril edildi.

- 1 M Glukoz çözeltisi:

18 gr glukoz (Sigma Aldrich) 90 ml ultra saf suda çözüldü ve sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C'de 20 dk. steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

- 2 M Sükroz çözeltisi:

6,846 gr sükroz (Sigma Aldrich), 5 ml ultra saf suda çözüldükten sonra son hacim 10 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C'de 20 dk. steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

- 10 mg/ml Etidyum Bromür stok çözeltisi:

100 mg etidyum bromür, 10 ml saf suda 2-3 saat çözüldükten sonra ışık almayan cam şişede +4°C'de saklandı.

- 10 mg/ml Ampisilin stok çözeltisi:

100 mg ampisilin (Applichem) 10 ml ultra saf suda çözüldükten sonra 0,20 µm por çaplı filtreden (Minisart) geçirilerek steril edildi ve 1 ml'lik stoklar halinde ependorf tüplere konularak -20°C'de saklandı.

• Inoue Transformasyon tamponu:

0,5 Molar PIPES (piperazine-1.2-bis (2-ethanesulfonic acid) (pH 6,7) hazırlamak için 15,1 gr PIPES saf suda çözüldü. 5 M KOH ile pH 6,7'ye ayarlandı ve ultra saf su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 0,45 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildikten sonra -20°C' de saklandı.

Inoue transformasyon tamponunun hazırlanması için Tablo 3.1'de verilen tüm maddeler 800 ml ultra saf suda çözüldü. Sonra 20 ml 0,5 M PIPES (pH 6,7) eklendi. Inoue transformasyon tamponu son hacmi ultra saf su ile 1 litreye tamamlandı.

Tablo 3.1. Inoue transformasyon tamponunun içeriği

| Maddeler | Litredeki miktar | Son konsantrasyon |
|--------------------------------------|------------------|-------------------|
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 10,88 gr | 55 mM |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 2,20 gr | 15 mM |
| KCl | 18,65 gr | 250 mM |
| PIPES (0,5 M pH: 6,7) | 20 ml | 10 mM |
| H ₂ O | 980 ml | - |

3.4. Kültür Ortamları

• LB (Luria Bertani) besiyeri:

| | |
|------------------|---------|
| Tripton (pepton) | : 10 gr |
| Maya Özütü | : 5 gr |
| NaCl | : 10 gr |

1000 ml ultra saf suda çözüldükten sonra, 5 N NaOH çözeltisi ile pH 7,0'a ayarlandı. Katı besiyeri için ise %1,5 agar ilave edildi. 121°C'de 20 dk. otoklavlanarak steril hale getirildi. Agar besiyerleri steril kabin içinde 9 cm steril plastik petri kaplarına döküldü.

• SOB besiyeri:

| | |
|------------------|----------|
| Tripton (pepton) | : 20 gr |
| Maya özütü | : 5 gr |
| NaCl | : 0,5 gr |

900 ml ultra saf su içerisinde eriyene kadar çözüldü. Sonra 10 ml 250 mM KCl çözeltisi ilave edildi. pH, 5 M NaOH ile 7,0'a ayarlandı ve son hacim 1 litreye tamamlandı. Daha sonra 121°C'de 20 dk. otoklavlanarak steril hale getirildi. Besiyeri kullanılmadan önce steril 2 M MgCl₂.6H₂O stok çözeltisinden 5 ml ilave edildi.

• SOC besiyeri:

| | |
|----------------------|----------|
| Tripton (pepton) | : 2 gr |
| Maya Özütü | : 0,5 gr |
| 1 M NaCl | : 1 ml |
| 250 mM KCl | : 1 ml |
| 1 M Glukoz | : 2 ml |
| 2 M Mg ⁺² | : 1 ml |

Tripton, maya özütü (yeast extract), NaCl, KCl ve 97 ml ultra saf su karıştırıldı. Daha sonra 121°C'de 20 dk. otoklavlanarak steril hale getirildi ve oda sıcaklığında bekletildi. Kullanmadan önce steril Mg²⁺ ve glukoz stoklarından belirlenen miktarlarda eklendi.

3.5. Farklı Fiziksel ve Kimyasal Parametlerin Ölçülmesi

Sıcaklık, pH, nitrat azotu (N) nitrat (NO₃⁻), fosfor (P), fosfat (PO₄³⁻) ve fosfor pentaoksit (P₂O₅) parametleri ölçüldü. Sıcaklığı ölçmek için termometre, pH'ı ölçmek için pH metre, nitrat azotu, nitrat, fosfor, fosfat ve fosfor pentaoksit parametrelerini ölçmek için iki farklı kit kullanıldı ve HANNA C200 Multiparameter Ion Spesific Meter (Multiparameter Bench Photometers) cihazı ile ölçümler yapıldı.

Öncelikle cihaz üzerinde nitrata karşılık gelen program seçildi. Bir pipet yardımıyla alınan göl suyu cihazın küvetine 6 ml'den biraz fazla olacak şekilde konuldu ve küvetin kapağı kapatıldı. İçerisinde göl suyu bulunan küvet cihaz içerisine yerleştirildi ve ilk ölçümde cihaz sıfırlandı. Daha sonra küvet cihazın haznesinden çıkarıldı ve bir paket HI 93728-01 (Hanna) toz reaktifi küvetin içerisine boşaltılarak kapağı hemen kapatıldı. Küvet el ile 10 sn. kuvvetlice çalkalandı. Sonra hava kabarcıkları oluşmamasına dikkat edilerek küvet, 50 sn. yavaşça alt üst edilerek karıştırıldı. Daha sonra küvet sarsmamaya dikkat edilerek cihazın haznesine yerleştirildi. 4 dk. 20 sn. kadar cihazın okuması beklendi. Cihaz ekranında nitrat azotu konsantrasyonu doğrudan görüntülendi. Okunan nitrat azotu konsantrasyonunu

nitrate (NO_3^-) mg/L çevirmek için 4,43 faktörü ile çarpıldı ve çıkan sonuçlar kaydedildi. Bu işlem dört mevsim için aynı şekilde tekrarlandı.

Fosfat ölçümü için düşük dereceli fosfata karşılık gelen program cihaz üzerinde seçildi. Reaksiyona girmemiş göl suyuyla küvetin kapağı durulandı, küvet içerisine de göl suyu eklenerek iyice çalkalandı ve örnek suyu dökülerek küvet boşaltıldı. Bunun ardından göl suyu örneğinden 10 ml alınarak küvet içerisine konuldu ve küvetin kapağı kapatıldı. İçerisinde göl suyu bulunan küvet cihaz içerisine yerleştirildi ve ilk ölçümde cihaz sıfırlandı. Daha sonra küvet cihazın haznesinden çıkarıldı ve bir paket HI 93713-0 (Hanna) toz reaktifi küvetin içerisine boşaltıldı, kapağı kapatıldı ve toz tamamen çözünene kadar hafifçe 2 dk. çalkalandı. Küvet cihazın haznesine yerleştirilerek 3 dakika okuma yapması beklendi. Cihaz ekranında fosfat (PO_4^{3-}) konsantrasyonu mg/L olarak görüntülendi. Okunan bu değeri mg/L fosfor pentaoksit (P_2O_5)'e çevirmek için 0,747 faktörü ile çarpıldı. Okunan değeri mg/L fosfor (P) konsantrasyonuna çevirmek için 0,326 faktörü ile çarpılarak çıkan sonuçlar kaydedildi. Bu işlem de dört mevsim için aynı şekilde tekrarlandı.

3.6. Etanol Çöktürmesi

Seyreltik DNA çözeltilerini yoğunlaştırmak için etanol çöktürmesi işlemi yapıldı. Seyreltik DNA çözeltisi bir eppendorf tüpe alınarak içine toplam hacmin 1/10'u kadar 3 M sodyum asetat çözeltisi (pH 5,6) eklendi. Sonra 2 hacim etanol eklenerek -20°C 'de en az 30 dk. bekletildikten sonra 12000xg'de 30 dk. santrifüj edildi. Sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra çökelti 500 μl %70 etanol ile kısaca yıkandı ve 30 dk. boyunca 12000xg'de çöktürüldü. Sıvı kısım uzaklaştırılıp alkol kalıntılarının uzaklaşması için 1 saat desikatörde bekletildikten sonra DNA, istenilen hacimde safsu, TE veya 0,1X TE içinde çözüldü.

3.7. Çevresel Örneklerden DNA İzolasyonu

Çevresel örneklerden DNA izolasyonu, Giovanni ve diğrleri tarafından önerilen metoda göre yapıldı (Giovannoni et al., 1990). 47 mm, 0,45 μm por çapına sahip supor filtreden süzölen canlı materyal, DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20°C 'de saklandı. -20°C 'den çıkartılan filtreler steril petri içerisinde makas yardımı ile küçük parçalar halinde kesildikten sonra steril eppendorf içerisine aktarılarak 500 μl lizis tamponu içerisinde süspanse edildi. Tablo 3.2'de lizis tamponun içeriğı verilmiştir.

Hücreler, süspansiyon edildikten sonra 37°C'de 20 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 27 µl 5 mg/ml Proteinaz K⁺ (son konsantrasyonu 270 µg/ml) ve 16 µl N-luril sarkosin (%30) eklenerek 55°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında eşit hacimde fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklendi, hafifçe birkaç kez alt üst edildi ve sonrasında 12000xg'de 5 dk. santrifüj edildi. Üst kısımda kalan sıvı kısım dikkatlice steril bir eppendorfa alındı. Daha sonra üzerine eşit hacimde kloroform:izoamil alkol (24:1) eklendi ve birkaç kez alt üst edildikten sonra 12000xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir steril eppendorfa alındı ve 0,1 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim soğuk etanol eklendi ve alt üst edilerek iyice karışması sağlanan tüpler -20°C'de gece boyunca bekletildi.

Tablo 3.2. Lizis tamponunun içeriği

| Stok Çözeltiler | Miktar (500 µl için) | Son Konsantrasyon |
|-----------------|----------------------|-------------------|
| 0,5 M EDTA | 40 µl | 40 mM |
| 0,5 M Tris-HCl | 50 µl | 50 mM |
| 1 M NaCl | 200 µl | 400 mM |
| 2 M Sükroz | 190 µl | 0,75 M |
| Lizozim | 0,5 mg | 1 mg/ml |
| Distile Su | 20 µl | - |

Daha sonra bu tüpler 12000xg'de 25 dk. santrifüj edildi ve sıvı faz uzaklaştırıldı. Çökelti halinde bulunan DNA %70'lik etil alkol ile yıkandı. 12000xg'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra alkol ortamdan uzaklaştırıldı. Alkolün tamamen uzaklaştırılması için desikatörde 1 saat bekletildi. Sonra çökelti 40 µl 0,1X TE (Tris-EDTA) tamponu içerisinde çözüldü ve 5 µl 10 mg/ml RNaz ilave edildikten sonra PCR işlemleri için -20°C'de saklandı.

3.8. PCR Reaksiyonları ve Parametreleri

PCR amplifikasyonu için öncelikle pipetleme hatalarını minimum seviyeye indirebilmek için primerler, 10X Tampon (10X PCR tamponu 2 mM MgCl₂ içerir) ve dNTP'leri içeren bir PCR karışımı hazırlandı (Tablo 3.3). Bu PCR karışımından her bir 25 µl reaksiyon hacmi için reaksiyon tüpüne 21 µl alındı. Bu reaksiyon tüpüne ayrıca kalıp DNA olarak belli miktarda (2 µl) çevresel DNA, enzim çözeltisi (2 µl) eklendi. Kalıp DNA ve enzim miktarları her deney grubu için optimize edildi. Çevresel DNA örnekleri 0,1X TE tamponu ile 1/10, 1/100, 1/500 ve 1/1000 oranlarında sulandırılarak optimum kalıp miktarı belirlendi.

Yüksek ısıya dayanıklı bir enzim olan *Taq* DNA polimeraz (Thermo Scientific 5 ünite/ μ l) kullanıldı. Enzim çözeltisi tüplere eklenmeden önce pipetleme hatasını en aza indirmek için 1X PCR tamponu ile hacmi artırıldı (0,25 ünite/ μ l). İlk denatürasyondan sonra her bir tüpte 0,5 ünite enzim içeren 2 μ l enzim karışımı eklendi. PCR döngüleri ısı döngücü (termal cykler) (ThermoHybaid) kullanılarak yürütüldü. PCR parametreleri Tablo 3.4’de, kullanılan primerler ve dizileri Tablo 3.5’te verilmektedir.

Tablo 3.3. 10 reaksiyonluk PCR karışımı

| PCR Karışımı | Bir Tüpün İçeriği (μ l) | 10 Tüp için Miktar (μ l) | Bir Tüp için Son Konsantrasyon |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 5 μ M Primer F (10 pmol) | 2,5 μ l | 25 μ l | 0,5 mM |
| 5 μ M Primer R (10 pmol) | 2,5 μ l | 25 μ l | 0,5 mM |
| 10X PCR Tamponu | 2,5 μ l | 25 μ l | 1X |
| 10 mM dNTP mix | 0,5 μ l | 5 μ l | 0,2 mM |
| Distile Su | 13 μ l | 65 μ l | - |

Tablo 3.4. PCR ile çoğaltımda kullanılan sıcaklık değerleri ve parametreleri

| Basamak | Zaman | Sıcaklık | Döngü Sayısı |
|---------------------------|--------|----------|--------------|
| İlk Denatürasyon | 3 dk. | 95°C | 1 |
| Denatürasyon | 30 sn. | 95°C | 35 |
| Annealing (Hibridizasyon) | 30 sn. | 50-60°C | |
| Sentez (Ekstension) | 1 dk. | 72°C | |
| Son sentez | 5 sn. | 72°C | 1 |

Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan primer ve dizileri

| Primer Adı | Primer Dizisi (5'-3') | T _m (°C) | Kaynak |
|------------|---------------------------|---------------------|--------------------|
| CYA106F | CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA | 67.7 | Nübel et al., 1997 |
| CYA781R | GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT | 64.2 | Nübel et al., 1997 |

3.9. Klonlama İşlemleri

Hedef amplikonların klonlanması çalışmaları, seçilen bir vektör ile hedef DNA’nın ligasyonu, alıcı (yetkin, “competent”) konak hücrelerin hazırlanması, rekombinant vektörlerin konak hücrelere transformasyonu, olası klonlardan rekombinant plazmit DNA izolasyonu ve bu plazmitlerden hedef DNA bölgesini taşıyanların belirlenmesi işlemlerini kapsamaktadır.

3.9.1. Alıcı Hücrelerin Hazırlanması

Alıcı (yetkin, kompetan) hücreler, Inoue metodunda daha önce anlatıldığı gibi hazırlandı (Sambrook and Russell, 2001). -80°C’de stoklanmış olan *E.coli* DH5- α alıcı hücreleri LB agar besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekildi ve gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Ertesi sabah petriden tek bir koloni alınarak 250 ml’lik erlen içindeki 50 ml LB sıvı besiyerine aktarıldı. Bu kültür 225 rpm hızla çalkalanan bir inkübatörde (Innova 42) 37°C’de 8 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda kültürden, 1 litrelik erlenler içerisinde hazırlanmış 3 farklı 250 ml SOB besiyerine sırasıyla 2 ml, 4 ml, 10 ml aktarıldı. Bu yeni kültürler 80 rpm hızda çalkalanan bir inkübatörde 18°C’de gece boyu (16-20 saat) inkübasyona bırakıldı.

Ertesi sabah her bir kültürün yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçüldü (A_{600}). Yoğunluğu 0,55’e ulaşan kültür hemen buza alındı. Bu aşamadan sonraki bütün çözeltiler soğutulmuş ve bütün basamaklar +4°C’de yürütülmüştür. İstenen düzeyde gelişme gösteren bu kültür, 2500xg’de, +4°C’de 10 dk. santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve sıvı fazı uzaklaştırıldı. Çökelti halindeki hücreler bir miktar Inoue tamponunda hafifçe çalkalanarak süspanse edildi ve iki steril tüpe paylaştırıldı. Her iki tüpün hacmi, Inoue tamponu ile 40 ml’ye tamamlandı. Tüpler 2500xg’de, +4°C’de 10 dk. santrifüj edildi ve Inoue tamponu ortamdan uzaklaştırıldı. Bir miktar Inoue tamponunda hücreler çalkalanarak süspanse edildi, tek tüpte toplandı ve Inoue tamponu ile hacim 20 ml’ye tamamlandı.

Alıcı hücre süspanسیونuna 1,5 ml dimetil sülfoksit (DMSO, Serva) eklenerek 10 dk. boyunca buzda bekletildi. Süspanسیون her birinde 1 ml olacak şekilde steril eppendorf tüplere paylaştırıldı, sıvı azot içinde donduruldu ve -80°C’de saklandı.

3.9.2. Ligasyon

Ligasyon reaksiyonları için “CloneJET PCR Cloning Kit” (Thermo Scientific) kullanıldı ve ligasyon işlemleri üretici firma tarafından önerilen prosedüre göre yapıldı.

Ligasyonu yapılacak olan 16S rDNA bölgesi PCR işlemiyle *Taq* DNA polimeraz (Thermo Scientific) kullanılarak çoğaltıldı. Ligasyonda kullanılacak 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltımı işlemi daha önce anlatıldığı gibi gerçekleştirildi (Bölüm 3.9). PCR ürünleri %0,7’lik agaroz jelde 1 saat yürütüldü. Doğru PCR

ürününün mevcudiyeti gözlemlendikten sonra ligasyon işlemine geçildi. Tipik bir ligasyon işleminde kullanılan reaksiyon karışımları Tablo 3.6’ da verilmektedir.

Öncelikle 5 farklı steril PCR tüpü içerisine 2X reaksiyon tamponundan 10 µl dağıtıldı. Ardından her tüpe 4,5 µl nükleazsız saf su eklendi. Sonra PCR işlemi gerçekleştirilmiş olan kış, ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimine ait DNA içeren PCR ürünlerinden tüplere ayrı ayrı 2,5 µl eklendi. Kit ile birlikte sağlanan kontrol PCR ürününden diğer bir tüpe kit protokolünde belirtildiği gibi 2 µl eklendi. Her tüpe kit ile sağlanan DNA uç körleştirme (kütleştirme, “blunting”) karışımı eklendi. Bu aşamalar gerçekleştirildikten sonra her bir tüp 3-5 saniye kadar vortekslendi ve kısa bir santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Ardından tüpler uç körleştirme reaksiyonu için 70°C’de 5 dk. inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.6. Ligasyon reaksiyonunun içeriği

| Ligasyon Bileşenleri | Sonbahar PCR DNA (µl) | Kış PCR DNA (µl) | İlkbahar PCR DNA (µl) | Yaz PCR DNA (µl) | Kontrol DNA (µl) |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| 2X Reaksiyon Buffer | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Kontrol PCR Ürünü | - | - | - | - | 2 |
| PCR Ürünü | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | - |
| Nükleazsız Saf Su | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 5 |
| DNA Blunting Enzimi | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| pJET 1.2/Blunt Vektörü (50 ng/µl) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| T4 DNA Ligaz (5 ünite/µl) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

İnkübasyondan sonra her bir tüp içerisine önce 1 µl pJet 1.2/blunt vektör, ardından 1 µl T4 DNA ligaz eklendi, 3-5 saniye vortekslendi ve kısa bir süre santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Ardından 22°C’de 5 dakika inkübasyona bırakılarak ligasyon işlemi tamamlandı ve transformasyon işlemi için hazır hale getirildi.

3.9.3. Transformasyon

Transformasyon işlemi, “CloneJET PCR Cloning Kit” (Thermo Scientific K1231) için üretici firma tarafından önerilen prosedüre göre yapıldı. Öncelikle daha önce hazırlanmış ve -80°C’de saklanmakta olan alıcı hücrelerin buz üzerinde kendiliğinden çözünmesi sağlandı. Buz üzerine yerleştirilmiş steril bir eppendorf tüpüne 100 µl alıcı hücre (*E.coli* DH5-α) ve ligasyon karışımı eklendi. Tüpün alt

kısmına hafifçe el ile vurularak karışmaları sağlandı ve 20 dk. boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Sonra hücreler 42°C’de 90 saniye ısı şokuna maruz bırakıldı, ardından 2 dk. buzda bekletildi. Her bir eppendorfa steril SOC besiyerinden 900 µl eklendi ve kültür (alıcı hücre-ligasyon karışımları) 45 dk. süresince 37°C’de 225 rpm hızda çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. Bu sürecin sonunda transformasyon kültüründen 100’er µl alınarak, 100 µg/ml ampisilin içeren katı LB besiyerine yayma ekim yöntemi ile ekildi ve gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

3.9.4. Transformant *E. coli* DH5-α Hücrelerinden Plazmit DNA İzolasyonu

Rekombinant plazmit DNA’sı ile transforme edilmiş *E.coli* DH5-α hücrelerinden sodyum dodesil sülfat (SDS) alkali lizis metodu kullanılarak küçük ölçekte plazmid DNA’sı izolasyonu gerçekleştirildi (Russell and Sambrook, 2001). Plazmit izolasyonu için belli sayıda izole transformant koloniler (klonlar), steril kürdan ile alınarak 50 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerine inoküle edildi. Klon seçimi rastgele yapıldı. Kültür, çalkalayıcı bir inkübatörde 225 rpm hızda 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Gece boyu üreyen hücrelerden 1,5 ml alınarak 1,5 ml’lik eppendorf tüpü içerisine transfer edildi ve ardından 12000xg’de 5 dk. santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Tüpün üzerinde kalan sıvı besiyeri kısmı uzaklaştırıldı. Ardından çökelti halindeki hücreler 5 mg/ml lizozim eklenmiş, 150 µl Çözelti I içinde süspanse edildi ve 5 dk. buzda bekletildi (Çözelti I, II ve III için bakınız Tablo 3.7). Daha sonra karışıma 200 µl Çözelti II eklenip 5-6 defa alt üst edilerek karıştırıldı ve 5 dk. buzda bekletildi. Ardından karışıma 150 µl Çözelti III ilave edildi ve hafif bir şekilde vortekslendikten sonra buz üzerinde 5 dk. daha bekletildi. Bu işlemlerin ardından tüpler 12000xg’de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj edilen tüpün plazmit DNA’sının da bulunduğu sıvı kısım steril eppendorf tüplere alınarak fenol:klorofom: izoamilalkol (25:24:1) ile muamele edildi ve etanolde çöktürüldü (Etanol çöktürmesi için bakınız Bölüm 3.6). Elde edilen plazmit DNA çökeltisi 30 µl 0,1X TE çözeltisinde çözüldü ve -20°C’de muhafaza edildi.

Elde edilen plazmit DNA çözeltisi stoklarından 1 µl alınarak nanodrop spektrofotometre ile DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri ölçüldü. Protein çözeltileri ışığı 260 nm’de, DNA ve RNA çözeltileri 280 nm’de soğurduğundan, A_{260/280} aralığındaki bir oran nükleik asitlerin saflık değerini vermektedir. DNA saflık

değerlerinin ($A_{260/280}$) 1,8 ve 2,0 değerleri arasında olması DNA çözeltisinde kontaminantların belirlenen standartlara uygun seviyede olduğunu göstermektedir (Sambrook and Russell, 2001). Bu değer aralığından daha yüksek saflık değerine sahip olan DNA çözeltilerinde, peptit ve fenol gibi maddelerden kaynaklanan bir kontaminasyon durumunun gerçekleştiği söylenebilir.

Tablo 3.7. Plazmit izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve içerikleri

| Çözelti I İçeriği | Son Konsantrasyon |
|----------------------------|--------------------------|
| Glukoz | 50 mM |
| EDTA | 10 mM |
| Tris-HCl (pH:8.0) | 25 mM |
| Çözelti II İçeriği | Son Konsantrasyon |
| NaOH | 0,2 M |
| SDS | % 1 (w/v) |
| Çözelti III İçeriği | Alınan Miktar |
| Potasyum Asetat (5M) | 50 ml |
| Glasiyel Asetik Asit | 9,58 ml |
| Saf su | 23,77 ml |

3.9.5. Agaroz Jel Hazırlanması, DNA Örneklerinin Yüklenmesi, Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

PCR ürünlere ait DNA fragmentlerini ayırmak için %1'lik agaroz (Sigma-Aldrich) jel kullanıldı. Agaroz jel elektroforez çalışmalarında 1X TBE tamponu kullanıldı.

% 1'lik jel hazırlanırken 0,5 gram agaroz, 50 ml 1X TBE tamponu içerisinde alev üzerinde hafifçe çalkalanarak homojen bir görüntü alınca kadar ısıtılarak eritildi. Erimiş agarozun sıcaklığı 50-55°C'ye düştüğünde 10 mg/ml stoktan 2,5 µl etidyum bromür (son konsantrasyonu 0,5 µg/ml) ilave edildi. Temiz ve kuru jel kabının her iki tarafı yapışkan kağıt bandlarla çevrelenerek tılandı ve yüklüme kuyucuklarının oluşması için uygun taraklar yerleştirildi. Ardından jel, jel kabına döküldü ve soğumaya bırakıldı.

Soğutulmuş ve katılaşmış jel, tarak ve tıkaçları çıkartılarak 1X TBE içeren elektroforez tankı içerisine yerleştirildi. Sonra 2,5 µl PCR ürünü 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırıldı ve kuyucuklara mikropipet yardımı ile yüklendi. PCR ürünlerinin büyüklüğünün tespiti için DNA belirteci (DNA ladder, marker) (Thermo

Scientific) ilk kuyucuğa yüklendi. DNA, 70 mA'de yaklaşık 1 saat veya fragmentler yeterince ayrılıncaya kadar yürütüldü.

Elektroforez sırasında jel içinde bulunan etidyum bromür ile boyanan DNA, transillüminatör (Vilber Lourmat) kullanılarak UV ışık altında gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

3.9.6. DNA Dizi Analizi

Dört mevsimi temsilen toplam 80 klon içindeki çevresel DNA'nın dizisi Sanger dizileme yöntemiyle belirlendi. Dizileme işlemi Macrogen Europe tarafından gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ham diziler öncelikle BioEdit paket programı (Hall, 1999) kullanılarak incelendi ve güvenilirlikleri belirlendi. Gözden geçirilmiş ve vektör dizilerinden ayıklanmış diziler Blastn aracıyla veritabanındaki dizilerle homolojileri bakımından incelenmişlerdir. Bu diziler daha sonra MEGA-X (Kumar et al., 2018) paket programı kullanılarak karşılaştırılmış ve filogenetik analizlere tabi tutulmuştur. Evrimsel geçmiş Maximum Likelihood yöntemi ve Tamura-Nei modeliyle (Tamura and Nei, 1993) değerlendirilmiştir. Ağaç en yüksek log olasılığına göre çizilmiştir. Buluşsal (heuristic) arama için başlangıç ağacı/ağaçları Neighbor_Join ve BioNJ algoritmalarının Tamura-Nei modeli kullanılarak hesaplanmış ikili uzaklıklar matrisine uygulanmasıyla ve sonra en yüksek log olasılık değerine sahip topoloji seçilerek otomatik olarak belirlenmiştir. Ağaç, her bir pozisyondaki değişikliklerin (substitusyonların) sayısı olarak ölçülen dal uzunlukları şeklinde ölçekli olarak çizilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Su Örneklerinin Alınması ve Bakteriyel Komünite Üyelerinin Hasatı

Araştırma alanı olarak belirlenen Balık Gölü, Samsun ili Kızılırmak deltasının 19 Mayıs ilçesi sınırları içerisinde konumlanmıştır. Doğu tarafında Kuzey-güney doğrultusunda koşturulan Uzungöl ile güney ucundan bağlantılıdır (Bakınız Şekil 3.1). Uzungöl'ün yılın bazı zamanlarında denizle bağlantılı olmasından dolayı bu iki göl lagün olarak da anılmaktadır (Gönülol et al., 2009).

Balık Gölü'nün en derin bölgeleri nadiren 2 m'yi aşar. Gölün güney ucundan itibaren kuzeye doğru kıyıdan 800 m içeride belirlenen tek bir istasyonda, su sütununun yüzeyinden (yaklaşık 10 cm) ve 2 m derinden steril plastik örnek toplama şişelerine 1 litre göl suyu araştırma materyali olarak alındı. Örnekler dört mevsimi temsilen 2019 yılı Mayıs, Ağustos, Kasım ayları ve 2020 yılı Şubat ayında alındı. Araştırma alanı olarak seçilen Balık Gölü'nün farklı aylara ait görüntüleri Şekil 4.1'de görülmektedir.

Alınan su örnekleri laboratuvar ortamına getirilerek aynı gün içerisinde hasat işlemi gerçekleştirildi. Mevcut bakteriyel komünite üyelerini de içeren su örnekleri 0,45 µm por çapına sahip Supor filtrelerden (Milipore) süzülerek filtre yüzeyine birikmiş olan canlı materyal elde edildi (Filtrasyon için bakınız Bölüm 3.1). Siyanobakteriyel artışın çok olduğu mevsimlerde, yaz ve sonbahar örneklerinde süzülme durumunun diğer mevsimlere nispeten daha yavaş olduğu gözlemlendi. Dört mevsime ait su örneklerinden birden çok filtre kullanılarak hasat işlemi yapıldı. Her bir filtreden belli bir mevsim için alınan örneklerden 100 ml su örneği süzüldü.



Şekil 4.1. Balık Gölü'ne ait görüntüler. 1: Mayıs 2019, 2:Ağustos 2019, 3: Kasım 2019, 4: Şubat 2020, 5 ve 6: Ağustos 2020

4.2. Alınan Su Örneklerinde Fiziksel ve Kimyasal Parametlerin Değerlerinin Belirlenmesi

Göl ortamında su yüzeyinin altındaki (10 cm) su sıcaklığı termometre daldırılarak ölçüldü. Aylara göre su sıcaklığı değişimleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Su sıcaklığı en düşük Şubat (6°C) ve en yüksek Ağustos (27°C) ayında gözlemlendi. Nisan ve Kasım aylarında ise sıcaklık değerleri birbirine çok yakındır (sırasıyla 18°C ve 17°C).

Tablo 4.1. Örnek alma zamanlarındaki aylara göre yüzeyaltı göl suyu su sıcaklıkları

| Mevsim | Tarih | Su Sıcaklığı (°C) |
|----------|------------|-------------------|
| İlkbahar | 02.05.2019 | 18 |
| Yaz | 02.08.2019 | 27 |
| Sonbahar | 12.11.2019 | 17 |
| Kış | 18.02.2020 | 6 |

Secchi diski kullanılarak su sütununun bulanıklığı belirlendi. Kış, ilkbahar ve yaz mevsimlerinde Secchi disk derinlikleri arasında belirgin bir farklılık mevcut

olmayıp sırasıyla 45, 40 ve 42 cm olarak ölçülmüştür. Ancak sonbaharı temsil eden kasım ayında yapılan ölçümde bu değer belirgin bir şekilde azalarak 30 cm'ye düşmüştür. Bu ölçümlere göre su sütununun en bulanık olduğu mevsim sonbahar mevsimi iken, en berrak olduğu mevsim ise kış mevsimi olduğu görülmektedir.

Su örnekleri laboratuvar ortamına getirildiğinde öncelikle pH ölçümleri gerçekleştirildi (Tablo 4.2). Farklı mevsimlerde alınan su örneklerinde yapılan pH ölçümü sonuçlarına göre yüzey altı ve 2 m derinlikteki değerler arasında büyük bir fark görülmemektedir. pH değerinin en yüksek olduğu mevsim yaz mevsimi iken en düşük olduğu mevsim kış mevsimidir. Bu durum yaz mevsiminde göl suyuna, suyun pH değerini artıran çözülmüş organik madde girdisinin fazla olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.2. Mevsimlere göre örnek sularının pH değerleri

| Mevsim | pH (Yüzey altı, 10 cm) | pH (2 m) |
|----------|------------------------|----------|
| İlkbahar | 8,44 | 8,39 |
| Yaz | 9,13 | 9,09 |
| Sonbahar | 8,25 | 8,12 |
| Kış | 8,06 | 8,04 |

Her mevsim yüzey suyu ve 2 m derinlikten alınan su örneklerinde nitrat azotu konsantrasyonu, nitrat miktarı, fosfat miktarı, fosfor miktarı ve P₂O₅ miktarı ölçüldü (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4). Organizmalar için kullanılabilir azot bileşiği olan nitrat (NO₃⁻) miktarı yüzey suyunda ilkbahar ve sonbaharda yaz ve kış mevsimine göre iki kat daha fazladır. 2 m derinde de ilkbahar ve yaz değerleri yüksek olmasına rağmen aradaki farklılık daha azdır.

Tablo 4.3. Yüzey suyu örneklerinde mevsimlere göre nitrat azotu konsantrasyonu ve nitrat miktarı değerleri

| Mevsim | 10 cm Derinlik | | 200 cm Derinlik | |
|----------|---------------------------------|---|---------------------------------|---|
| | Nitrat Azotu Miktarı (N) (mg/L) | Nitrat Miktarı (NO ₃ ⁻) (mg/L) | Nitrat Azotu Miktarı (N) (mg/L) | Nitrat Miktarı (NO ₃ ⁻) (mg/L) |
| İlkbahar | 3,2 | 14,17 | 3,5 | 15,51 |
| Yaz | 1,7 | 7,53 | 2,5 | 11,07 |
| Sonbahar | 3,4 | 15,06 | 3,6 | 15,94 |
| Kış | 1,5 | 6,64 | 2,4 | 10,63 |

Organizmalar için kullanılabilir fosfat bileşimi olan P_2O_5 miktarı yüzey suyunda yaz ve sonbaharda kış ve ilkbahar mevsimine göre oldukça yüksektir. 2 m derinde ise ilkbahar ve sonbaharda değerler kış ve yaza göre daha yüksektir.

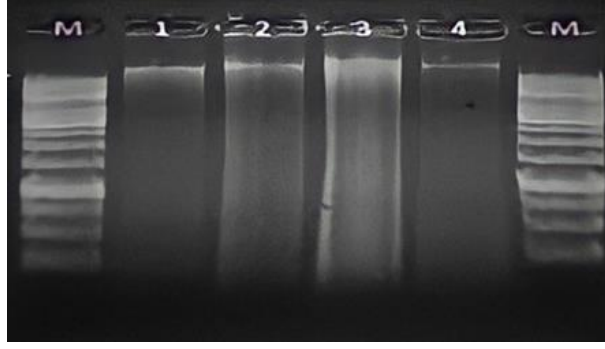
Tablo 4.4. Yüzey suyu örneklerinde mevsimlere göre fosfat, fosfor, P_2O_5 miktarları

| Mevsim | 10 cm Derinlik | | | 200 cm Derinlik | | |
|----------|---------------------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | Fosfat Miktarı (PO_4^{3-}) (mg/L) | Fosfor Miktarı (P) (mg/L) | P_2O_5 Miktarı (mg/L) | Fosfat Miktarı (PO_4^{3-}) (mg/L) | Fosfor Miktarı (P) (mg/L) | P_2O_5 Miktarı (mg/L) |
| İlkbahar | 1,17 | 0,38 | 0,87 | 2,75 | 0,89 | 2,05 |
| Yaz | 2,75 | 0,89 | 2,05 | 1,46 | 0,47 | 1,09 |
| Sonbahar | 2,75 | 0,89 | 2,05 | 2,7 | 0,88 | 2,01 |
| Kış | 0,67 | 0,2 | 0,5 | 0,33 | 0,1 | 0,24 |

4.3. Çevresel Örneklerden DNA İzolasyonu

Göl ortamından alınan su örneklerinde birçok gruba ait farklı organizmalar bulunmaktadır. Bu organizmaları tür düzeyinde tek tek ayırabilmek mümkün olsa bile oldukça emek yoğun ve zaman alıcı süreçleri içerir. Bu nedenle organizmaları izole etmeden çevresel örnekten toplam DNA izolasyonu yapılarak komünite üyeleri hakkında analizlerin yapılması bazı durumlarda daha kullanışlı bir yaklaşımdır. Bu çalışmada çevresel su örneklerinden siyanobakteriyel DNA izole etmek üzere optimize edilmiş bir yöntem kullanılmıştır (Giovannoni et al., 1990) (Bakınız Bölüm 3.7).

Bu yöntem kullanılarak sırasıyla ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış mevsimlerinde alınan çevresel örneklerden DNA izolasyonu gerçekleştirildi, elde edilen çevresel DNA 40 μ l'lik stoklar şeklinde $-20^\circ C$ 'de saklandı. Elde edilen çevresel DNA, stoklardan eşit miktarlarda (2,5 μ l) agaroz jele yüklenerek görüntülendi. Her bir mevsim için az çok farklı konsantrasyonlarda çevresel DNA izolasyonunun gerçekleştiği görüldü (Şekil 4.2). Sonuç olarak PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılabilir miktarda çevresel DNA'nın mevcut olduğu kararına varıldı. Bu çevresel DNA örnekleri siyanobakteriyel 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması işlemlerinde kalıp olarak kullanıldı.



Şekil 4.2. Farklı mevsimlere ait yüzey su örneklerinden elde edilen çevresel DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 1 kb DNA belirteci (1 kb DNA merdiveni, Thermo Scientific) Yol 1, Mayıs 2019; yol 2, Ağustos 2019; yol 3, Kasım 2019 ve yol 4, Şubat 2020

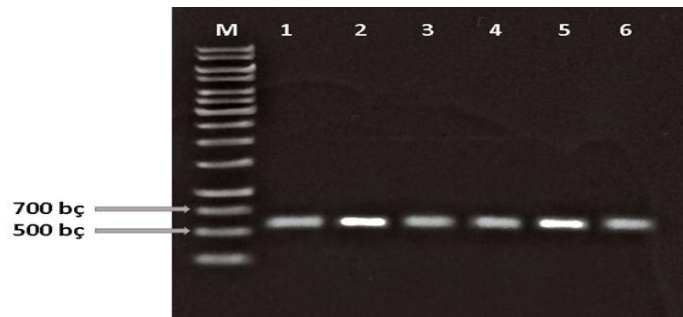
4.3.1. Farklı Mevsimlere Ait Su Örneklerinde Siyanobakteriyel 16S rDNA Dizilerinin Taranması

Mikrobiyal biyoçeşitliliğin belirlenmesi çalışmaları günümüzde, moleküler araçları ve kaynakları daha fazla kullanmaya odaklanmaktadır (Xu and Zhao, 2018). Mikrobiyal komünitelerin popülasyonlarına ait bireylerin karakterize edilmesi için uzun yıllar boyunca kültür bağımlı analiz yöntemleri kullanılmıştır. Üretilen saf kültürlere geleneksel yöntemler uygulanarak izolatların kimlikleri belirlenmeye çalışılsa da bu saf kültürlere moleküler yöntemler de sıklıkla uygulanmıştır. Ancak son çeyrek asır içinde organizmaları saf kültürler şeklinde izole ettikten sonra geleneksel ve/veya moleküler yöntemlerle analiz etmek yerine, belli bir ortamdaki organizmaların tamamının genomları (metagenom) moleküler yöntemler kullanılarak analiz edilmektedir. Bu yaklaşımlardan biri, taksonomik olarak anlamlı bilgiler veren belli gen veya genom bölgelerinin PCR yöntemi ile çoğaltılarak analiz edilmesidir.

Bu çalışmada da siyanobakteriyel 16S rRNA geninin belli bir bölgesi (V2-V4 bölgesinin) çoğaltılarak siyanobakterilerin varlığı ve genotipik çeşitliliği belirlenmeye çalışılmıştır. Daha önce tasarlanmış ve siyanobakteriyel 16S rRNA ve bazı algal kloroplast 16S rRNA genlerinin belli bir bölgesini çoğaltmak üzere kullanıla gelen bir primer çifti PCR amplifikasyonu için kullanılmıştır. Primerler *Escherichia coli* 16S rRNA numaralandırma sistemine göre 106-127 (CYA 106F) ve 781-805 (CYA781) bölgeleri ile eşleşmektedir. 16S rRNA değişken bölge değerlendirmeleri göz önünde bulundurulduğunda bu primerlerle elde edilecek ampliconlar V2, V3 ve V4 bölgelerini kapsamaktadır. *E. coli* rRNA gen bölgesine göre 699 bp'lik bir amplicon büyüklüğü beklense de bu büyüklüğün siyanobakteriyel suşlarda bir miktar sapabileceği dikkate alındı.

Araştırma alanından alınmış dört mevsime ait su örneklerinden elde edilen çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak bu evrensel siyanobakteriyel 16S rDNA primerleri (CYA106F ve CYA781R) kullanılarak PCR taraması yapıldı (primer dizileri için bakınız Tablo 3.5). Böylelikle farklı mevsimlerde izole edilmiş çevresel DNA örneklerinde, siyanobakteriyel suşların var olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı.

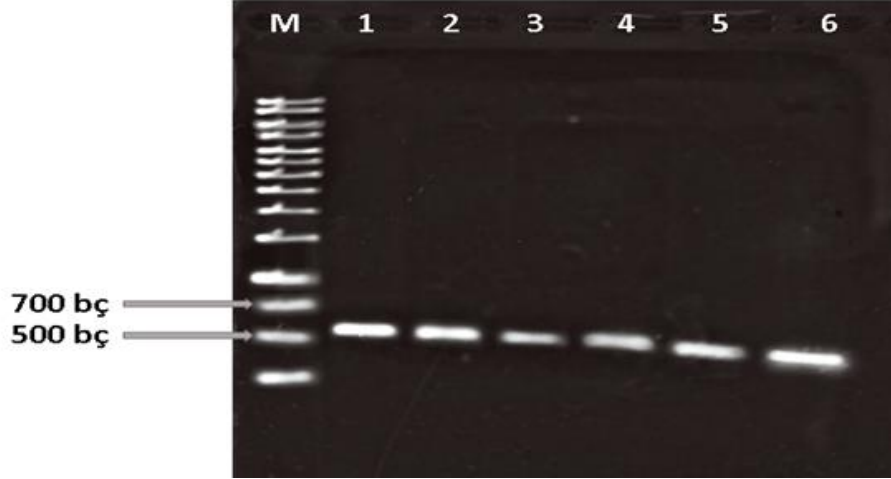
Siyanobakterilere özgü 16S rDNA bölgesinin PCR amplifikasyonu çalışmalarında, ilk olarak her mevsim için ayrı ayrı kalıp DNA optimizasyonu denemeleri yapıldı. İlk olarak, ilkbahar mevsiminde yüzey ve 2 m derinlikten alınan su örneklerinden izole edilen çevresel DNA örneğinde PCR amplifikasyon çalışması yapıldı. PCR taraması için çevresel kalıp DNA 10^{-1} , 10^{-2} , 2×10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} oranlarında seyreltildi. Daha sonra seyreltilmiş her bir kalıp DNA için PCR amplifikasyonu ve sonra amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapıldı. İlkbahar mevsimi yüzey suyundan elde edilen çevresel DNA'dan en fazla ürün 10^{-2} seyreltme oranında elde edildi. 2 m derinden elde edilen meta DNA (çevresel DNA, metagenom) ile yapılan optimizasyon çalışmasında 10^{-2} ve 2×10^{-1} seyreltmelerde yeterli yoğunlukta amplikon elde edildi. İlkbahar örneklerinden elde edilen ve optimize edilmiş kalıp DNA miktarlarıyla yürütülen PCR amplifikasyonu sonucunda hem yüzey ve hem de 2 m derinlikte siyanobakteriyel 16S rDNA amplikonları gözlemlendi (Şekil 4.3). Elektroforez sonuçları elde edilen amplikon büyüklüklerinin 600 bp civarında olduğu beklenen büyüklükten bir miktar kısa olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.3. İlkbahar mevsimi yüzey ve 2m deriden elde edilen çevresel DNA örneklerinden elde edilmiş siyanobakteriyel 16S rDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 1 kb DNA belirteci (1 kb DNA merdiveni, Thermo Scientific) . Yol 1, yüzey 10^{-1} ; yol 2, yüzey 10^{-2} ; yol 3,yüzey 2×10^{-1} ; yol 4, 2 m derin 10^{-1} ; yol 5, 2 m derin 10^{-2} ve yol 6, 2 m derin 2×10^{-1} . Gözlenen amplikon büyüklüğü 600 bp

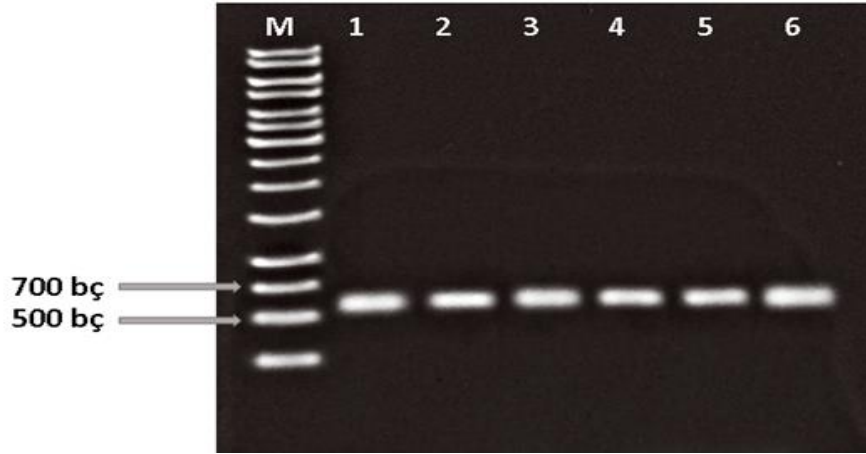
Yaz mevsimine ait yüzey ve 2 m derinlikten alınan su örneklerinden izole edilen çevresel DNA kullanılarak siyanobakteriyel 16S rRNA genini taramak üzere PCR işlemleri gerçekleştirildi. PCR taraması için yüzey ve 2 m derinden elde edilen

çevresel DNA 10^{-1} , 10^{-2} , 2×10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} oranlarında seyreltildi ve her bir seyreltilmiş DNA kalıp olarak kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı Bu mevsime ait yüzey ve 2 m örneklerinin her ikisinde de, 10^{-1} , 10^{-2} , 2×10^{-2} DNA konsantrasyonlarında siyanobakteriyel 16S rDNA ampliconları net bir şekilde gözlemlendi (Şekil 4.4).



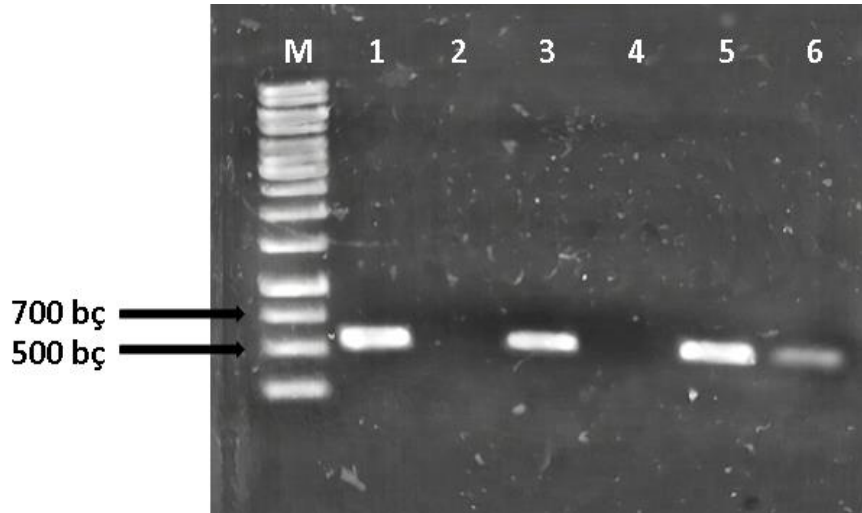
Şekil 4.4. Yaz mevsimi yüzey ve 2 m deriden elde edilen çevresel DNA örneklerinden elde edilmiş siyanobakteriyel 16S rDNA ampliconlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 1 kb DNA belirteci; yol 1, yüzey 10^{-1} ; yol 2 yüzey 10^{-2} ; yol 3, yüzey 2×10^{-2} ve yol 4, 2 m derin 10^{-1} ; yol 5, 2 m derin 10^{-2} ; yol 6, 2 m derin 2×10^{-2} Amplicon büyüklüğü 600 bç

Sonbahar mevsimine ait yüzeyden ve 2 m derinden alınan su örneklerinden izole edilen çevresel DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak ayrı ayrı PCR işlemleri gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışmaları sonrasında sonbahar mevsimi yüzey ve 2 m örneklerinde en iyi amplifikasyon 2×10^{-2} oranında seyreltilmiş kalıp DNA ve 2,5 mM $MgCl_2$ varlığında elde edildi. Sonbahar örneklerinden elde edilmiş her iki çevresel DNA'dan da siyanobakteriyel 16S rDNA ampliconu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Sonbahar mevsimi yüzey ve 2 m deriden elde edilen çevresel DNA örneklerinden elde edilmiş siyanobakteriyel 16S rDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 1 kb DNA belirteci. Yol 1, yüzey 2×10^{-1} ; yol 2, yüzey 2×10^{-2} ; yol 3, yüzey 10^{-3} ; yol 4 derin 10^{-1} ; yol 5, derin 2×10^{-2} ; yol 6, derin 2×10^{-2} . Beklenen amplikon büyüklüğü 699 bç

Kış mevsimine ait yüzey ve 2 m derinlikten alınan su örneklerinden izole edilen çevresel DNA örneklerinde ayrı ayrı PCR işlemleri gerçekleştirildi. PCR taraması için çevresel DNA, 10^{-1} , 10^{-2} ve 2×10^{-2} oranlarında seyreltilerek optimizasyonu yapıldı. Yüzeyden elde edilen çevresel DNA 10^{-1} ve 2 m derinden alınan çevresel DNA 2×10^{-2} sulandırıldığında beklenen amplikonlar açık bir şekilde gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Kış mevsimi yüzey ve 2 m deriden elde edilen çevresel DNA örneklerinden elde edilmiş siyanobakteriyel 16S rDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 1 kb DNA belirteci. Yol 1, yüzey 10^{-1} ; yol 2, yüzey 10^{-2} ; yol 3, yüzey 2×10^{-2} ve yol 4, 2 m derin 10^{-1} ; yol 5, 2 m derin 10^{-2} ; yol 6, 2 m derin 2×10^{-2} . Beklenen amplikon büyüklüğü 600 bç

Sonuç olarak dört mevsimden yapılan göl suyu örneklerinin tamamında elde edilen çevresel DNA'dan siyanobakteriyel 16S rDNA amplikonu elde edildi. Gerek yüzeyden alınan gerekse de 2 m derinden alınan su örneklerinden yapılan DNA izolasyonları sonucunda göl suyunda yıl boyunca siyanobakteriyel hücrelerin temsil edildiği anlaşılmaktadır.

4.3.2. Siyanobakteriyel 16S rDNA Amplikonlarının Rastgele Klonlanması

Amplifikasyon ürünlerinin klonlanması için farklı stratejiler geliştirilebilir. Bu stratejilerden bir kısmı PCR primerlerinin 5' uçlarına özel restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri ekleyerek vektöre ligasyon için bu dizileri kullanmaktır. Diğer bir strateji ısıya dayanıklı DNA polimeraz tipine bağlı olarak amplifikasyon ürünlerinin 3' ucuna bir adenin eklenmiş amplikonların klonlanması için geliştirilmiştir. Bu durumda 3' ucuna timin eklenmiş vektörlere bu fragmentler bağlanabilmektedir. Bir diğer strateji de kör uçlu ürün oluşturan bir ısıya dayanıklı DNA polimeraz kullanarak elde edilen fragmentleri vektöre kör uç ile bağlama stratejisidir. Bu çalışmada amplikonların klonlanması için uçların doldurulmasından sonra amplikonun kör uçlu bir vektöre ligasyonu stratejisi uygulandı. Bunun için "CloneJET PCR Cloning Kit" (Thermo Scientific) kullanıldı.

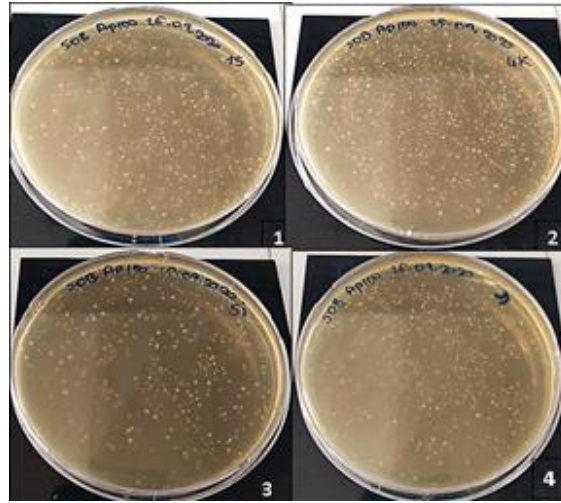
CloneJET PCR klonlama kiti kullanılarak dört mevsime ait 16S rDNA'nın rastgele klonlanma işlemi gerçekleştirildi. Her bir amplikon potansiyel olarak farklı suşlara (taksonlara) ait fragmentlerin karışımı şeklindedir. Klonlama sırasında bu fragmentler rastgele vektöre bağlanır, belli bir fragment tipinin vektöre bağlanma olasılığı o fragmentin amplikon içindeki temsil sayısı ile doğru orantılıdır.

Klonlanacak amplikonların çoğaltılmasında *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanıldı. Dolayısıyla amplikonları oluşturan DNA fragmentlerinin 3' uçlarında ilave olarak birer A nükleotiti eklenmiş durumdadır. Bu durum ligasyondan hemen önce bir uç körleştirme işlemini gerektirmiştir. PCR ürünleri elektroforez sonrasında yeterince net bir band şeklinde gözleendiğinden herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmadan direkt olarak ligasyon işleminde kullanıldı.

pJET 1.2 kör uçlu vektöre ligasyonda kullanılacak farklı mevsimlere ait amplikonların konsantrasyonunu ve ligasyon reaksiyonunda kullanılacak hedef fragment (insert) miktarını belirlemek için 2,5 µl PCR ürünü, 1 µl DNA belirteci (Thermo Scientific 1 kb DNA merdiven) ile beraber agroz jelde yürütüldü. Yeterince

ayırışma olduktan sonra miktarı bilinen DNA belirtecinin 600 bç bandı ile amplicon DNA bandının yoğunluğu karşılaştırılarak konsantrasyonu tahmin edildi. Dört mevsime ait amplicon konsantrasyonunun da benzer olduğu ve 20 ng/μl olduğu sonucuna ulaşıldı. Her bir ligasyon reaksiyonunda 1:5 vektör:fragmet molar oranı sağlamak üzere 50 ng PCR ürünü 50 ng pJET 1.2 kör vektörü ile karıştırıldı. Ligasyon karışımını tamamlamadan önce amplicon fragmentlerinin 3' A uzantılarını yıkmak üzere uç körleştirme işlemi gerçekleştirildi (Bölüm 3.10.1). Daha sonra ligasyon işlemi gerçekleştirildi.

Bölüm 3.10.1'de anlatıldığı şekilde ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon karışımının 5 μl'si 100 μl *E.coli* DH5-α alıcı hücrelerinde transforme edildi (Transformasyon için bakınız Bölüm 3.10.2). Transformant hücreler ampisilin içeren SOB veya LB agar besiyeri yüzeyine yayma ekim yöntemiyle ekildi ve gece boyu inkübasyon sonrasında 16S rDNA gen bölgesini içeren klonlar besiyeri yüzeyinde izole koloniler şeklinde gözlemlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Siyanobakteriyel 16S rDNA amplicon fragmentlerini taşıyan klonların besiyeri yüzeyindeki görünüşleri. (Besiyerleri 100 μg/ml ampisilin antibiyotiği içermektedir.) 1: sonbahar mevsimine ait klonları içeren petri, 2: kış mevsimine ait klonları içeren petri, 3: ilkbahar mevsimine ait klonları içeren petri, 4: yaz mevsimine ait klonları içeren petri görüntüleri

Her mevsime ait klonlardan 20'şer tanesi daha ileri analizler için rastgele seçilerek sıvı besiyerinde kültüre alındı. Rastgele seçilen bu klonlar 50 μg/ml ampisilin içeren LB broth besiyerlerine inoküle edilerek üretildi. Her bir sıvı kültürden küçük ölçekli plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi (Bölüm 3.10.4). DNA konsantrasyonları nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific Nanodrop-Colibri Microvolume Spectrometer) ile ölçüldü (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Kış, ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimine ait klonlardan elde edilen plazmit DNA konsantrasyonları (pBK11-30 kış, pBB31-50 ilkbahar, pBY51-70 yaz ve pBS71-90 sonbahar klonlarıdır)

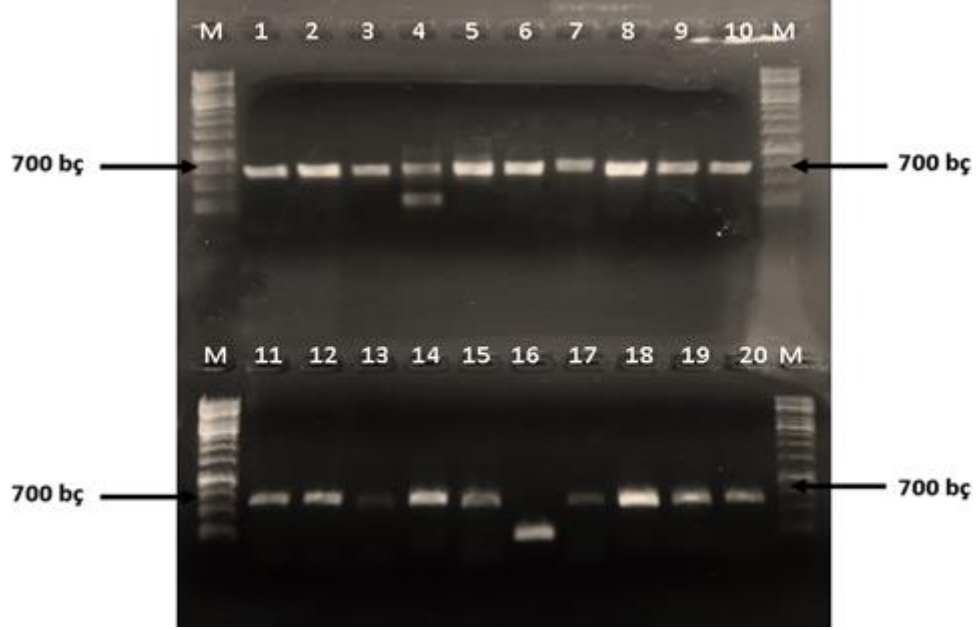
| Klon adı | DNA (ng/ul) | A _{260/280} | Klon adı | DNA (ng/ul) | A _{260/280} |
|----------|-------------|----------------------|----------|-------------|----------------------|
| pBK11 | 315,27 | 2,01 | pBY51 | 176,42 | 2,08 |
| pBK12 | 228,42 | 2,00 | pBY52 | 335,17 | 2,05 |
| pBK13 | 193,39 | 2,00 | pBY53 | 1016,1 | 2,01 |
| pBK14 | 490,08 | 2,08 | pBY54 | 267,58 | 2,08 |
| pBK15 | 186,92 | 1,95 | pBY55 | 367,58 | 2,08 |
| pBK16 | 707,48 | 2,08 | pBY56 | 1024,0 | 2,03 |
| pBK17 | 125,28 | 2,04 | pBY57 | 825,00 | 2,04 |
| pBK18 | 124,45 | 2,00 | pBY58 | 143,11 | 2,04 |
| pBK19 | 144,32 | 2,02 | pBY59 | 833,51 | 2,04 |
| pBK20 | 289,99 | 2,06 | pBY60 | 627,91 | 2,15 |
| pBK21 | 854,10 | 2,05 | pBY61 | 528,19 | 2,04 |
| pBK22 | 165,31 | 2,04 | pBY62 | 228,37 | 2,08 |
| pBK23 | 208,85 | 2,07 | pBY63 | 640,00 | 2,08 |
| pBK24 | 343,07 | 2,07 | pBY64 | 119,99 | 2,06 |
| pBK25 | 408,28 | 2,06 | pBY65 | 756,50 | 2,08 |
| pBK26 | 259,16 | 2,08 | pBY66 | 404,59 | 2,12 |
| pBK27 | 724,15 | 2,06 | pBY67 | 170,14 | 2,07 |
| pBK28 | 684,80 | 2,07 | pBY68 | 160,41 | 2,06 |
| pBK29 | 261,81 | 2,10 | pBY69 | 183,00 | 2,06 |
| pBK30 | 990,20 | 2,02 | pBY70 | 785,00 | 2,05 |
| pBB31 | 895,12 | 2,07 | PBS71 | 99,55 | 2,07 |
| pBB32 | 1176,5 | 2,03 | PBS72 | 192,86 | 2,07 |
| pBB33 | 181,75 | 2,02 | PBS73 | 393,86 | 2,15 |
| pBB34 | 825,00 | 2,04 | PBS74 | 439,11 | 2,10 |
| pBB35 | 582,50 | 2,04 | PBS75 | 552,50 | 2,14 |
| pBB36 | 820,00 | 2,04 | PBS76 | 310,13 | 2,09 |
| pBB37 | 753,50 | 2,04 | PBS77 | 556,12 | 2,11 |
| pBB38 | 106,89 | 1,98 | PBS78 | 665,05 | 2,12 |
| pBB39 | 154,15 | 1,98 | PBS79 | 566,97 | 2,13 |
| pBB40 | 1001,0 | 2,03 | PBS80 | 185,95 | 2,13 |
| pBB41 | 201,60 | 2,00 | PBS81 | 111,10 | 2,06 |
| pBB42 | 829,50 | 2,05 | PBS82 | 434,07 | 2,07 |
| pBB43 | 182,23 | 2,03 | PBS83 | 318,11 | 2,08 |
| pBB44 | 413,98 | 2,08 | PBS84 | 546,39 | 2,13 |
| pBB45 | 155,92 | 2,00 | PBS85 | 461,86 | 2,13 |
| pBB46 | 895,96 | 2,04 | PBS81 | 339,67 | 2,13 |
| pBB47 | 1134,0 | 2,05 | PBS87 | 403,77 | 2,14 |
| pBB48 | 795,00 | 2,06 | PBS88 | 536,16 | 2,15 |
| pBB49 | 190,83 | 2,02 | PBS89 | 735,74 | 2,12 |
| pBB50 | 526,15 | 2,04 | PBS90 | 413,88 | 2,15 |

4.3.3. Klonların Doğruluklarının Belirlenmesi

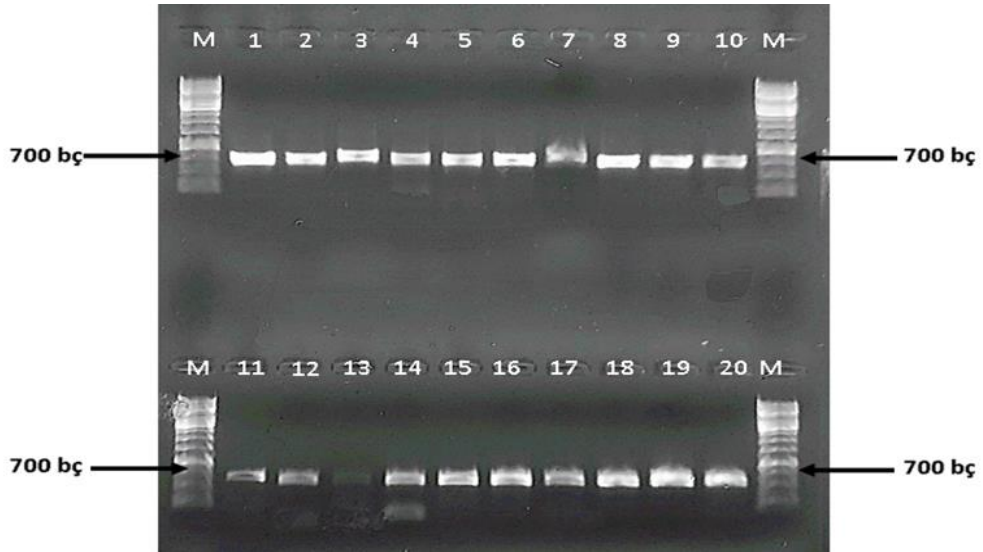
Her mevsim için seçilen 20 klonun, toplamda 80 klonun 16S rRNA gen bölgesine ait yaklaşık 600 bç DNA fragmentini taşıyıp taşımadığı araştırıldı. Plazmitlerin PCR metodu ile 16S rDNA bölgesini taşıyıp taşımadıkları belirlendi. Saflaştırılmış klonlara ait plazmit DNA'ları kalıp olarak kullanılarak bağlı fragment bölgelerinin çoğaltılıp çoğaltılmadığı araştırıldı. Primer olarak çevresel DNA'dan amplikon elde etmek için kullanılmış olan siyanobakteriyel CYA106F ve CYA871R primerleri ve klonlama kitiyle beraber sağlanan ligasyon noktasının hemen yukarısına bağlanan pJET1.2 universal primerleri kullanıldı. PCR işlemi sonucunda beklenen büyüklükte amplikonların gözlenmesi klonun doğru olduğu şeklinde değerlendirildi.

İlkbahar, yaz, sonbahar ve kış mevsimine ait klonlar kalıp olarak kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin beklenen siyanobakteriyel 16S rDNA amplikon büyüklükleriyle uyumlu olup olmadığını anlamak için agaroz jel elektroforezi ile amplikon büyüklükleri belirlendi. Klonların büyük çoğunluğunun beklenen yaklaşık 600 bç büyüklükteki siyanobakteriyel 16S rDNA bölgesini taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Klonlardan bazıları beklenen 600 bç fragmentin yanında daha küçük bir diğer fragment daha gözlemlenmiştir. Bazı klonlarda ise 600 bç'den daha küçük tek bir fragment gözlenmiştir.

Kış ayına ait rekombinant plazmitler pBK11-pBK30 olarak, ilkbahar ayına ait rekombinant plazmitler pBB31-pBB50 olarak, yaz ayına ait rekombinant plazmitler de pBY51-pBY70 olarak sonbahar mevsimine ait rekombinant plazmitler pBS71-pBS90 olarak isimlendirildi.



Şekil 4.8. Yaz ve sonbahar mevsimine ait (Ağustos 2019-Kasım 2019), çevresel DNA'dan elde edilen siyanobakteriyel 16S rRNA geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerden elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Her mevsim için temsilen 10 klona ait ampikonlar gösterilmiştir. M: 1 kb DNA belirteci. Yol 1-10, yaz mevsimine ait rekombinant plazmitlerden çoğaltılmış siyanobakteriyel 16S rDNA ampikonlarının görüntüsü; yol 11-20, sonbahar mevsimine ait rekombinant plazmitlerden çoğaltılmış siyanobakteriyel 16S rDNA ampikonlarının görüntüsü



Şekil 4.9. Kış ve ilkbahar mevsimine ait (Şubat 2020-Mayıs 2019), çevresel DNA'dan elde edilen siyanobakteriyel 16S rRNA geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerden elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Her mevsim için temsilen 10 klona ait ampikonlar gösterilmiştir. M: 1 kb DNA belirteci. Yol 1-10, kış mevsimine ait rekombinant plazmitlerden çoğaltılmış siyanobakteriyel 16S rDNA ampikonlarının görüntüsü; yol 11-20, ilkbahar mevsimine ait rekombinant plazmitlerden çoğaltılmış siyanobakteriyel 16S rDNA ampikonlarının görüntüsü

4.3.4. Klonlara Ait Dizilerin Teşhisi

Servis sağlayıcı firma (Macrogen Europe) tarafından sağlanan klonlara ait DNA dizileri öncelikle vektör dizilerinden ayıklandı. Ortalama 600 bç civarındaki hedef diziden daha uzun olan kısımlar diziden uzaklaştırıldı. Bunun için siyanobakteri spesifik PCR primer dizilerinin bulunduğu bölgeler ve vektörün ligasyon noktasının her iki tarafındaki diziler taranarak klonlanmış fragmente ait bölgeler belirlendi. Belirlenen bu hedef dizi dışındaki vektöre ait diziler manuel olarak silinerek uzaklaştırıldı. Bu ilk ayıklaması yapılan diziler, öncelikle tipik bir siyanobakteriyel dizi olarak *Synechococcus sp.* PCC7942 16S rRNA gen bölgesi ile karşılaştırılarak iki amaç için incelendi. Birincisi yüksek bir homolojiye sahip olduğu gözlenerek dizinin bir siyanobakteriyel suşa ait olduğuna karar vermektir. İkincisi ise bu gen bölgesi ile hedef dizinin çakıştığı bölgenin sınırlarını (çakışma uzunluğu) belirlemektir.

Dizilerden siyanobakteriyel olmayan organizmalarla eşleşenler ve herhangi bir eşleşme göstermeyen diziler değerlendirme dışı bırakıldı. Kış mevsimine ait dizilerden 8'i, ilkbahara ait olanlardan 4'ü, yaza ait olanlardan 2'si ve sonbahara ait olanlardan 2'si bu nedenlerle değerlendirmeye alınmadı. Farklı mevsimlere ait toplam 64 metagenomik rDNA dizisi veri bankalarına yüklenmiş olan dizilerle homolojileri bakımından araştırıldı. NCBI platformu üzerinden (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) blastn aracı kullanılarak her bir dizinin en yüksek homolojiye (% identity) sahip olduğu suşlar belirlendi. En yüksek homoloji gösterilen takson ilgili fragmentin dahil olduğu takson olarak kabul edildi.

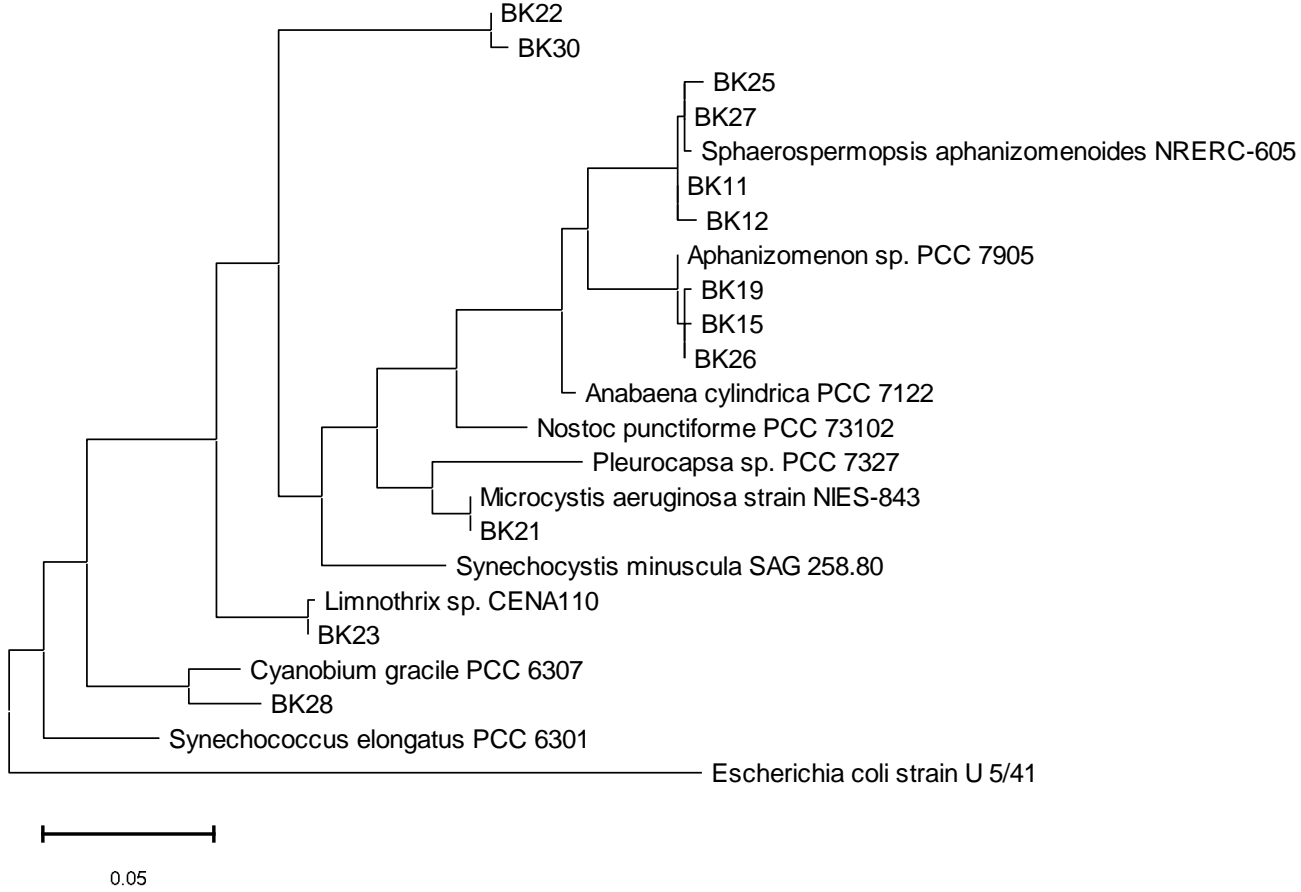
Kış mevsimine ait su örneklerinden elde edilen amplikondan rastgele klonlar elde edilen rastgele seçilmiş 20 fragmentten 12 tanesi siyanobakteriyel ilişkili diziler olarak belirlendi. Bu dizilerden 3'ü *Cyanobacteria* sınıfı altbölüm I'e ait diğer 9'u da altbölüm IV'e ait suşlara ait dizilerle yüksek homoloji göstermektedir (Tablo 4.6). Kış mevsiminde altbölüm IV üyelerinin daha yaygın olduğu ve *Aphanizomenon sp.* ve *Sphaerospermopsis sp.* suşları bu grubun çok büyük bir kısmını oluşturduğu görülmektedir.

Analiz edilen 12 dizi diğer bazı standart siyanobakteriyel suşlara ait veritabanlarına depolanmış diziler de kullanılarak filogenetik analize tabi tutuldu (Şekil 4.10). Maximum Likelihood yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağaçta altbölüm IV'e ait dizilerden 7'si az çok birlikte kümelenmişken 2'si (BK22 ve

BK30) ayrı kümelenmişlerdir. Bu iki dizinin diğer dalında çoğunlukla altbölüm IV dizileri mevcutsa da bazı altbölüm I'e ait standart suşlar ve BK21 dizisi de konumlanmıştır. BK22 nispeten kısa bir dizi olup veritabanında en yüksek eşleşme gösterdiği *Sphaerospermopsis reniformis* SAG 2284 suşu olup %91,50 gibi nispeten düşük bir orandır. BK30 ise sadece bir defa temsil edilen farklı bir cinse ait bir suşla (*Raphidiopsis mediterranea* FCC LP 2014) yüksek oranda (%99,03) eşleşen bir dizidir. Altbölüm I'e ait 3 dizi birbirlerinden uzak da olsalar BK22 ve BK30 dışında diğer altbölüm IV dizilerinden ayrı olarak kümelenmişlerdir. Siyanobakterilerde geleneksel sınıflandırma ile filogenetik sınıflandırmanın sıklıkla birbiriyle uyumsuz olması göz önünde bulundurulduğunda analiz edilen dizilerin filogenetik konumlanmasının beklendiği gibi olduğu değerlendirilebilir.

Tablo 4.6. Kış mevsimine ait çevresel DNA'dan çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerin rastgele klonlanmasıyla izole edilen DNA fragmentlerinin olası kimlikleri

| Dizi Adı | Büyükük (baz) | Çakışma (%) | Homoloji (%) | Altbölüm | Takson | NCBI Taksonomi ID |
|----------|---------------|-------------|--------------|----------|--|-------------------|
| BK23 | 488 | 100 | 100 | I | <i>Limnothrix redekei</i> 2LT25S01 | NCBI:txid543818 |
| BK21 | 558 | 100 | 100 | I | <i>Microcystis aeruginosa</i> 0BB35S02 | NCBI:txid270630 |
| BK28 | 561 | 99 | 98,92 | I | <i>Synechococcus</i> sp. CB0101 | NCBI:txid232348 |
| BK15 | 553 | 100 | 99,64 | IV | <i>Aphanizomenon gracile</i> FBCC-A274 | NCBI:txid2734613 |
| BK19 | 555 | 100 | 99,64 | IV | <i>Aphanizomenon gracile</i> FBCC-A274 | NCBI:txid2734613 |
| BK26 | 555 | 100 | 99,82 | IV | <i>Aphanizomenon gracile</i> FBCC-A274 | NCBI:txid2734613 |
| BB30 | 205 | 100 | 99,03 | IV | <i>Raphidiopsis mediterranea</i> FCC LP 2014 | NCBI:txid1874710 |
| BK11 | 553 | 100 | 99,64 | IV | <i>Sphaerospermopsis reniformis</i> SAG 2284 | NCBI:txid2578138 |
| BK12 | 560 | 100 | 98,93 | IV | <i>Sphaerospermopsis reniformis</i> SAG 2284 | NCBI:txid2578138 |
| BK22 | 562 | 100 | 91,50 | IV | <i>Sphaerospermopsis reniformis</i> SAG 2284 | NCBI:txid2578138 |
| BK25 | 555 | 100 | 99,28 | IV | <i>Sphaerospermopsis reniformis</i> SAG 2284 | NCBI:txid2578138 |
| BK27 | 557 | 100 | 99,82 | IV | <i>Sphaerospermopsis reniformis</i> SAG 2284 | NCBI:txid2578138 |



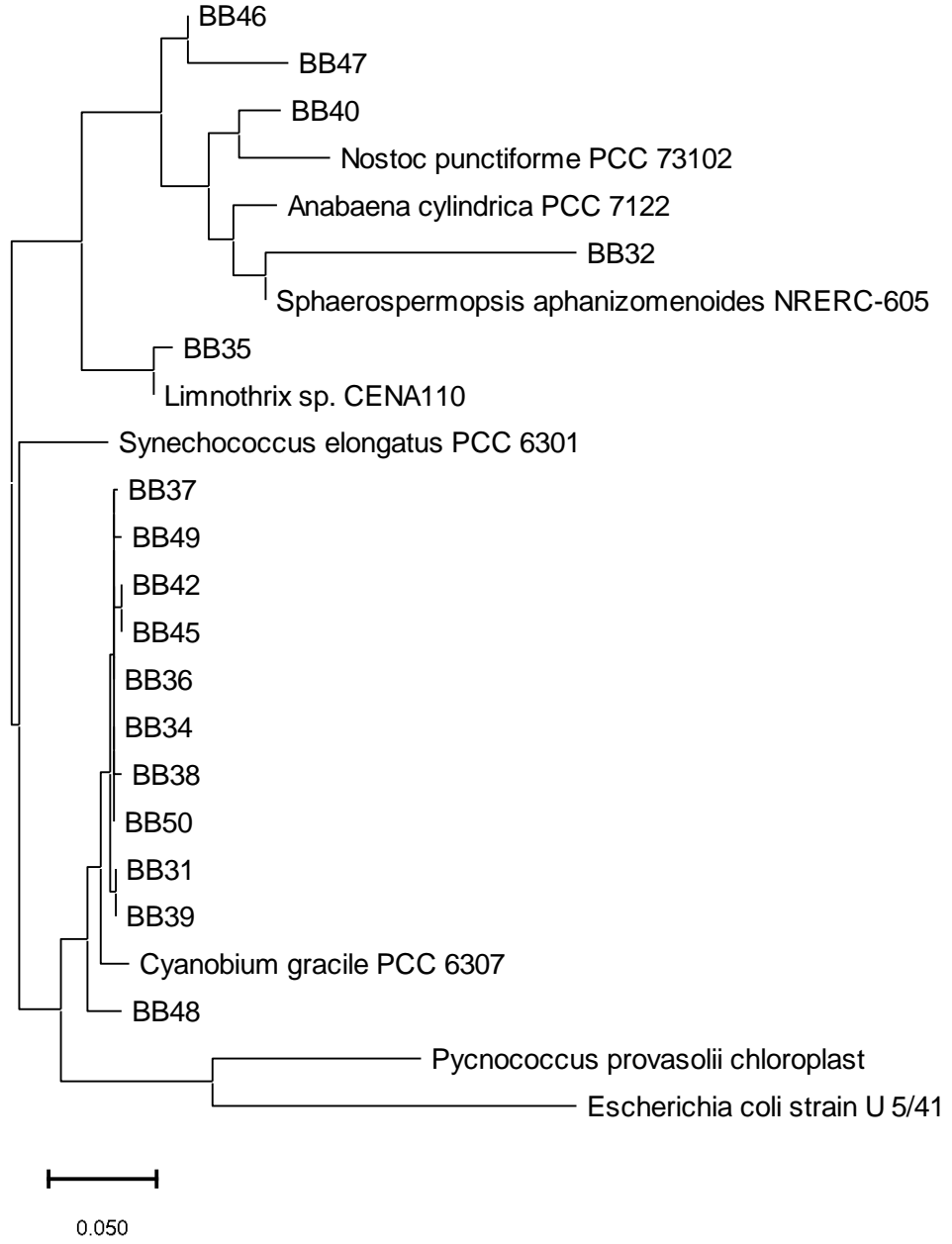
Şekil 4.10. Kış mevsimine ait metagenom fragment dizilerinin Maximum Likelihood yöntemiyle evrimsel analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç. Ağaç en yüksek log olasılığına (-2850.50) göre çizilmiştir. Analiz 23 nükleotit dizisini içerir, son veri setinde toplam 579 pozisyon vardır. Evrimsel analiz MEGA X (Kumar vd, 2018) ile yürütülmüştür.

İlkbahar mevsiminden elde edilen fragmentlere ait dizilerden 16'sı standart siyanobakteriyel 16S rDNA dizileriyle yeterli düzeyde homoloji göstermiş, 4'ü ise homoloji göstermediğinden değerlendirilmemiştir. Bu 16 diziden 11'i altbölüm I'e ait suşlarla homoloji göstermiştir. Dizilerin tamamı suşlardan biri ile %99'un üzerinde bir homoloji göstermiştir (Tablo 4.7). Dizilerden 5'i *Cyanobium sp.* suşlarıyla 5'i *Synechococcus sp.* suşlarıyla 1'i de *Limnothrix sp.* SDEC-19 suşu ile homoloji göstermiştir. Kış mevsimine ait dizilerin aksine ilkbahara ait diziler daha çok altbölüm I'e aittir. Altbölüm IV ilkbaharda 5 dizi ile temsil edilmektedir. Bu dizilerden ikisi (BB31 ve BB40) hariç diğer üçü nispeten düşük homoloji oranları göstermektedir. Özellikle BB32 *Sphaerospermopsis reniformis* SAG 2284 suşuna %86,28 gibi düşük bir homoloji göstermiştir. BB31 dizisi *Scytonematopsis sp.* M07 suşu ile tam homoloji göstermektedir ancak pBB31 klonuna ait diziden ayıklanarak siyanobakteriyel 16S rRNA dizisi olarak kullanılan dizinin çok kısa olması böyle bir yüksek homolojinin olası nedenidir.

İlkbahar mevsimine ait bu 16 dizi standart suşlara ait dizilerle beraber Maximum Likelihood metoduyla evrimsel analize tabi tutuldu. Veritabanı homoloji değerlerine göre altbölüm I ve altbölüm IV'e ait olan dizilerin çoğu filogenetik olarak da benzer şekilde kümelenmişlerdir. (Şekil 4.11). Altbölüm I'e ait 11 dizi *Cyanobium gracile* kısmi 16S rDNA dizisiyle birlikte kümeleşirken sadece 1'i (BB35) altbölüm IV dizilerine daha yakın bir şekilde *Limnotrix sp.* kısmi 16S rDNA dizisiyle beraber yerleşmiştir. Altbölüm IV'e dahil 4 dizi *Nostoc punctiforme*, *Anabaena cylindrica* ve *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* türelerine ait dizilerle tek bir küme oluşturmuştur.

Tablo 4.7. İlkbahar mevsimine ait çevresel DNA'dan çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerin rastgele klonlanmasıyla izole edilen DNA fragmentlerinin olası kimlikleri

| Dizi Adı | Büyüklik (baz) | Çakışma (%) | Homoloji (%) | Altbölüm | Takson | NCBI Taksonomi ID |
|----------|----------------|-------------|--------------|----------|---|-------------------|
| BB34 | 558 | 100 | 99,82 | I | <i>Cyanobium</i> sp. ULC065 | NCBI:txid2137202 |
| BB36 | 556 | 100 | 99,82 | I | <i>Cyanobium</i> sp. ULC065 | NCBI:txid2137202 |
| BB37 | 555 | 100 | 99,64 | I | <i>Cyanobium</i> sp. ULC065 | NCBI:txid2137202 |
| BB49 | 556 | 100 | 99,46 | I | <i>Cyanobium</i> sp. ULC065 | NCBI:txid2137202 |
| BB50 | 557 | 100 | 99,82 | I | <i>Cyanobium</i> sp. ULC065 | NCBI:txid2137202 |
| BB35 | 557 | 100 | 99,28 | I | <i>Limnothrix</i> sp. SDEC-19 | NCBI:txid2052598 |
| BB48 | 55 | 100 | 98,92 | I | <i>Synechococcus</i> sp. CB0101 | NCBI:txid232348 |
| BB38 | 554 | 100 | 99,46 | I | <i>Synechococcus</i> sp. MA0607L | NCBI:txid686856 |
| BB42 | 554 | 100 | 99,46 | I | <i>Synechococcus</i> sp. MA0607L | NCBI:txid686856 |
| BB39 | 558 | 99 | 99,82 | I | <i>Synechococcus</i> sp. MW73B4 | NCBI:txid210710 |
| BB45 | 165 | 100 | 100 | I | <i>Synechococcus</i> sp. SR-R4S6 | NCBI:txid2730092 |
| BB46 | 555 | 100 | 96,22 | IV | <i>Anabaena</i> sp. MBG-AL212 | NCBI:txid2419585 |
| BB47 | 555 | 99 | 92,42 | IV | <i>Anabaena</i> sp. NQAIF321 | NCBI:txid1606566 |
| BB40 | 555 | 100 | 99,46 | IV | <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> GIHE 2018 | NCBI:txid2588993 |
| BB31 | 54 | 100 | 100 | IV | <i>Scytonematopsis</i> sp. M07 | NCBI:txid1931087 |
| BB32 | 556 | 99 | 86,28 | IV | <i>Sphaerospermopsis reniformis</i> SAG 2284 | NCBI:txid2578138 |



Şekil 4.11. İlkbahar mevsimine ait metagenom fragment dizilerinin Maximum Likelihood yöntemiyle evrimsel analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç. Ağaç en yüksek log olasılığına (-3141.28) göre çizilmiştir. Analiz 24 nükleotit dizisini içerir, son veri setinde toplam 573 pozisyon vardır. Evrimsel analiz MEGA X (Kumar vd, 2018) ile yürütülmüştür.

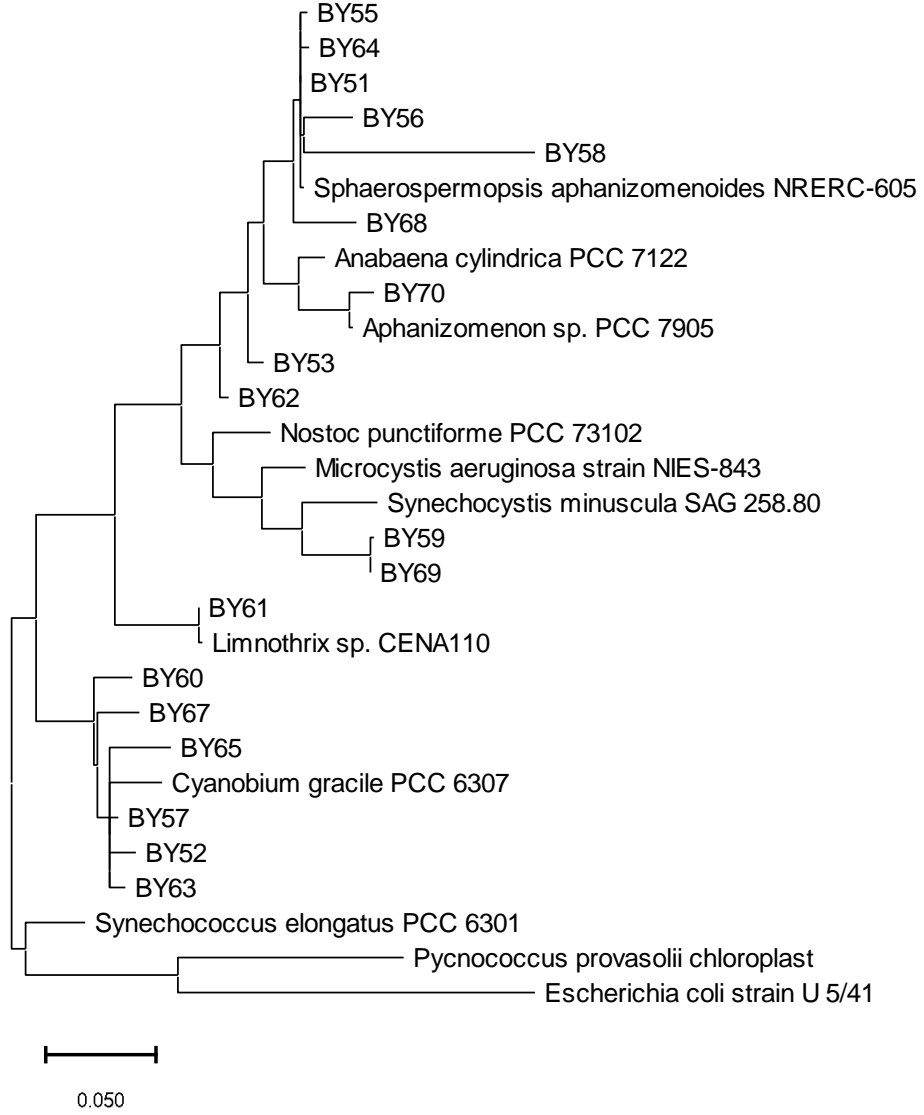
Yaz mevsiminden elde edilen fragmentlere ait dizilerden 18'i standart siyanobakteriyel suşların 16S rDNA dizileriyle yeterli düzeyde homoloji göstermiş, 2'si ise homoloji göstermediğinden değerlendirilmemiştir. Dizilerden 15'i 500-560 nükleotit aralığında iken 3'ü (BY52, BY64 ve BY67) daha kısa (200-250 nükleotit) dizilerdir. Dizilerin standart suşların 16S rDNA dizisileriyle %90,16-%100 arasından

değişmektedir. Dizilerden 8'i altbölüm I ve 8'i de altbölüm IV'e ait suşların 16S rDNA dizisi ile yüksek homoloji (identity) göstermiştir (Tablo 4.8). Altbölüm I üyeleriyle yüksek homoloji gösteren dizilerden 4'ü *Synechococcus* sp. suşlarıyla 2'si de *Snowella litoralis* suşlarıyla benzerlik göstermektedir. Diğer diziler aynı alt bölüme dahil olan farklı suşlarla yüksek homoloji göstermektedir. Altbölüm IV'e dahil olan dizilerden 3'ü *Sphaerospermopsis reinformis* suşlarına yüksek homoloji gösterirken diğer 6'sı herbiri farklı cinslere ait suşlarla yüksek homolojiye sahiptir. En düşük homoloji değeri BY58 dizisine ait olup *Dolichospermum flos-aquae* ile % 90,16 oranında homologdur.

Yaz mevsimine ait bu 18 dizi standart suşlara ait dizilerle beraber Maximum Likelihood metoduyla evrimsel analize tabi tutulduğunda altbölüm I'e ait dizilerden 6'sı *Cyanobium gracile* ile beraber kümelenmişlerdir (Şekil 4.12). BY61 dizisi ise *Limnotrix* sp. CENA110 suşu ile tek başına konumlanmıştır. Yine aynı altbölüme ait BY59 ve BY60 dizileri de siyanobakteriyel filogenetik çalışmalarda sıklıkla rastlandığı gibi *Synechocystis minuscula*'nın bir suşuyla beraber altbölüm IV'e ait dizilerle beraber kümelenmiştir. Altbölüm IV ile yüksek homoloji gösteren diziler ise birlikte kümelenmişlerdir.

Tablo 4.8. Yaz mevsimine ait çevresel DNA'dan çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerin rastgele klonlanmasıyla izole edilen DNA fragmentlerinin olası kimlikleri

| Dizi Adı | Büyükük (baz) | Çakışma (%) | Homoloji (%) | Altbölüm | Takson | NCBI Taksonomi ID |
|----------|---------------|-------------|--------------|----------|---|-------------------|
| BY67 | 212 | 100 | 98,12 | I | <i>Cyanobacterium</i> sp. CCNP 1105 | NCBI:txid1472743 |
| BY60 | 549 | 100 | 97,45 | I | <i>Cyanobium</i> sp. CZS_22C | NCBI:txid1930119 |
| BY61 | 546 | 100 | 100 | I | <i>Limnothrix</i> sp. SDEC-19 | NCBI:txid2052598 |
| BY59 | 546 | 100 | 99,82 | I | <i>Snowella litoralis</i> 1LT47S05 | NCBI:txid371758 |
| BY69 | 547 | 100 | 100 | I | <i>Snowella litoralis</i> 1LT47S05 | NCBI:txid371758 |
| BY57 | 548 | 100 | 99,82 | I | <i>Synechococcus</i> sp. CBW1006 | NCBI:txid1353138 |
| BY65 | 547 | 100 | 98,91 | I | <i>Synechococcus</i> sp. CENA179 | NCBI:txid1355854 |
| BY63 | 546 | 100 | 99,63 | I | <i>Synechococcus</i> sp. MW73D5 | NCBI:txid210713 |
| BY52 | 245 | 100 | 100 | I | <i>Synechococcus</i> sp. SR-C1 | NCBI:txid2730087 |
| BY55 | 557 | 100 | 99,46 | IV | <i>Anabaena sphaerica</i> FSR1 | NCBI:txid2495425 |
| BY70 | 547 | 100 | 99,64 | IV | <i>Aphanizomenon gracile</i> 1 | NCBI:txid645895 |
| BY53 | 556 | 100 | 99,28 | IV | <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> AK1 | NCBI:txid1382247 |
| BY58 | 548 | 100 | 90,16 | IV | <i>Dolichospermum flos-aquae</i> LMECYA 165 | NCBI:txid463223 |
| BY68 | 546 | 100 | 97,62 | IV | <i>Neowollea manoromense</i> NUACC15 | NCBI:txid2572034 |
| BY62 | 548 | 100 | 99,82 | IV | <i>Raphidiopsis mediterranea</i> FSS1-150/1 | NCBI:txid941186 |
| BY56 | 559 | 100 | 97,32 | IV | <i>Sphaerospermopsis oumiana</i> CHAB338 | NCBI:txid929851 |
| BY64 | 234 | 100 | 99,57 | IV | <i>Sphaerospermopsis reniformis</i> NRERC-608 | NCBI:txid2724495 |
| BY51 | 556 | 100 | 99,82 | IV | <i>Sphaerospermopsis reniformis</i> SAG 2284 | NCBI:txid2578138 |



Şekil 4.12. Yaz mevsimine ait metagenom fragment dizilerinin Maximum Likelihood yöntemiyle evrimsel analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç. Ağaç en yüksek log olasılığına (-3694.08) göre çizilmiştir. Analiz 29 nükleotit dizisini içerir, son veri setinde toplam 569 pozisyon vardır. Evrimsel analiz MEGA X (Kumar vd, 2018) ile yürütülmüştür.

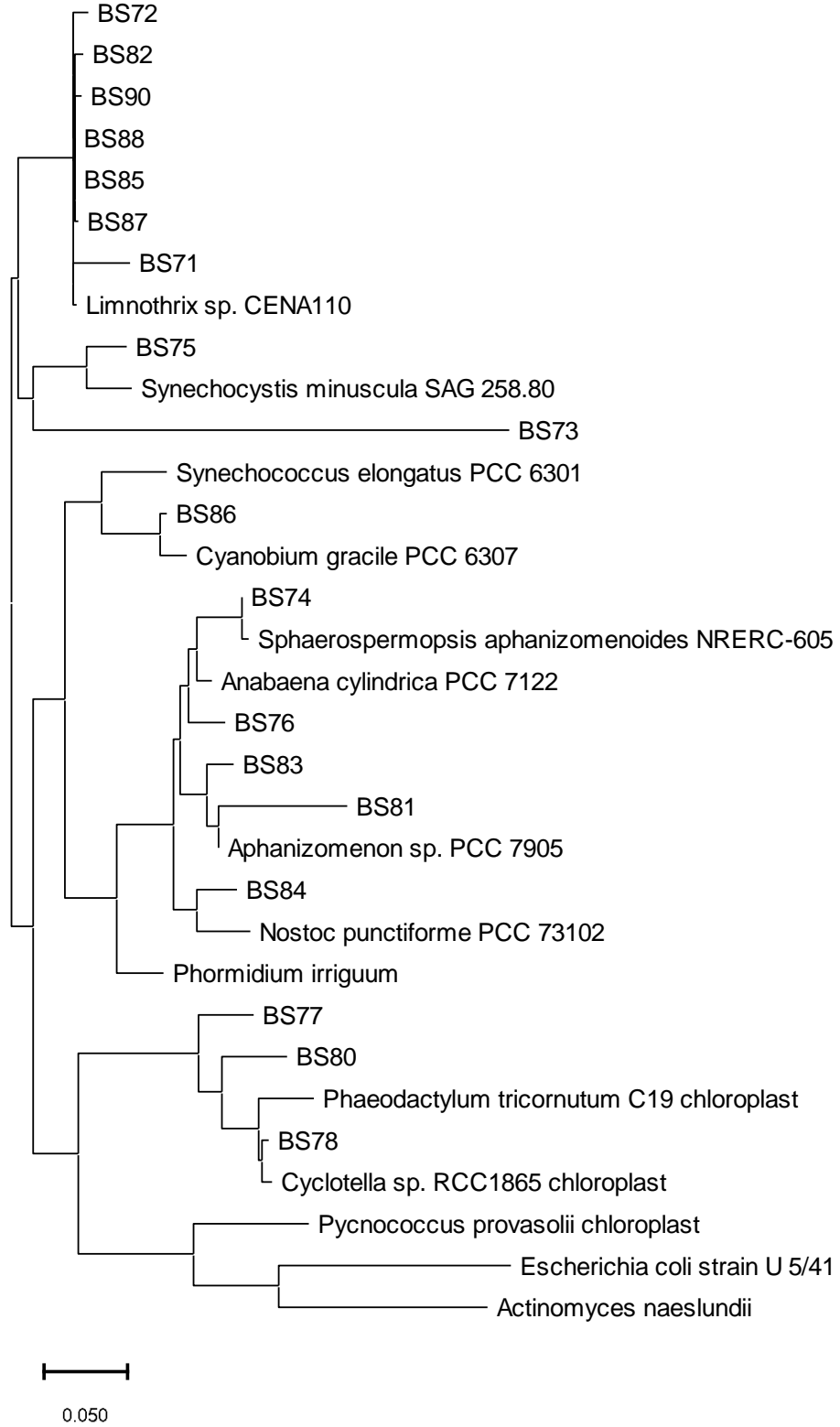
Sonbahar mevsiminden elde edilen fragmentlere ait dizilerden 18'i standart siyanobakteriyel suşların 16S rDNA dizileriyle yeterli düzeyde homoloji göstermiş, 2'si ise homoloji göstermediğinden değerlendirilememiştir. Dizilerin 17'si 550-560 nükleotit büyüklük aralığında dizilerdir, sadece 1'i (BS73) 472 nükleotit uzunluğundadır (Tablo 4.9). Değerlendirilen dizilerden 9'u altbölüm I'e dahildir. Bunların 7'si *Limnothrix* sp. suşlarına, 1'i *Cyanobium* sp. ve 1'i de *Merismopedia glauca* ile yüksek homolojiye sahiptir. Sonbahar dizileri arasında bulunan BS73 altbölüm III'e ait *Phormidium chlorium* ile yüksek homoloji (%99,1) göstermiştir.

Yıl boyunca elde edilen fragmentler arasında altbölüm III sadece bu dizi tarafından temsil edilmiştir. Sonbahar mevsiminde elde edilmiş olan dizilerden 4'ü altbölüm IV'e ait standart suşların 16S rDNA'sı ile yüksek homoloji göstermiş ve bu dizilerin her biri farklı bir suş ile yüksek homoloji göstermiştir. Sonbahar dizileri arasındaki 3 dizi ise (BS77, BS78 ve BS80) algal kloroplast 16S rRNA dizileriyle homoloji göstermiştir (Tablo 4.9). Bunlardan BS77 *Acanthoceras zachariasii* kloroplast ve BS78 ve BS80 de *Cyclotella sp. WC03_2* kloroplast 16S rDNA'sı ile yüksek homoloji göstermiştir. Bu durum sonbaharda Balık Gölü'nde özellikle diatom grubu alglerin de bol bulunduğuna işaret etmektedir.

Sonbahar mevsimine ait bu 18 dizi standart suşlara ait dizilerle beraber Maximum Likelihood metoduyla evrimsel olarak analiz edildiğinde 3 ana kümenin olduğu görülmektedir (Şekil 4.13). Kümelerden biri altbölüm I'e dahil olan dizilerdir. BS75 dizisi dışındaki diziler *Limnotrix sp. CENA110* suşuyla oldukça sıkı bir küme oluşturmaktadır. BS75 ise yine aynı kümenin bir ikinci dalı olarak *Synechocystis minuscula* suşu ile birlikte konumlanmıştır. Bu ana küme içine yerleşen BS73 ise veritabanlarında *Phormidium chlorinum* ile en yüksek homolojiyi (%79,79) göstermesine rağmen bu türe ait diziden uzak olarak altbölüm I kümesine daha yakın konumlanmıştır. Bu ayrışma *Phormidium chlorinum* ile olan düşük homoloji ile ilişkilendirilebilir. İkinci ana küme altbölüm IV ile yüksek homolojiye sahip olan dizilerin oluşturduğu kümedir. Bu kümeye dahil olan diziler (BS74, BS76, BS81, BS83 ve BS84) standart suşlara ait dizilerle uyum içinde konumlanmışlardır. Bu kümeye daha yakın bir konuma *Cyanobium gracile* ile birlikte yerleşen BS86 dizisi ise altbölüm I ile en yüksek homolojiye sahip olduğu halde birinci ana kümeye yerleşmemiştir. Üçüncü ana küme ise diatom kloroplast 16S rDNA'larıyla birlikte kümelenen BS77, BS78 ve BS80 dizileridir. Bu diziler dört mevsim içinde diatomların temsil edildiği yegane dizilerdir.

Tablo 4.9. Sonbahar mevsimine ait çevresel DNA'dan çoğaltılan 16S rDNA fragmentlerin rastgele klonlanmasıyla izole edilen DNA fragmentlerinin olası kimlikleri. kl algal kloroplast

| Dizi Adı | Büyükük (baz) | Çakışma (%) | Homoloji (%) | Altbölüm | Takson | NCBI Taksonomi ID |
|----------|---------------|-------------|--------------|----------|--|-------------------|
| BS86 | 558 | 99 | 99,46 | I | <i>Cyanobium</i> sp. CZS_22C | NCBI:txid1930119 |
| BS85 | 559 | 99 | 100 | I | <i>Limnothrix redekei</i> 165a | NCBI:txid329035 |
| BS90 | 559 | 100 | 99,64 | I | <i>Limnothrix redekei</i> 2LT25S01 | NCBI:txid543818 |
| BS71 | 546 | 100 | 96 | I | <i>Limnothrix</i> sp. SDEC-19 | NCBI:txid2052598 |
| BS72 | 557 | 100 | 99,10 | I | <i>Limnothrix</i> sp. SDEC-19 | NCBI:txid2052598 |
| BS82 | 557 | 100 | 99,46 | I | <i>Limnothrix</i> sp. SDEC-19 | NCBI:txid2052598 |
| BS87 | 558 | 99 | 99,82 | I | <i>Limnothrix</i> sp. SDEC-19 | NCBI:txid2052598 |
| BS88 | 556 | 100 | 99,82 | I | <i>Limnothrix</i> sp. SDEC-19 | NCBI:txid2052598 |
| BS75 | 561 | 99 | 99,1 | I | <i>Merismopedia glauca</i> 0BB39S01 | NCBI:txid371754 |
| BS73 | 472 | 99 | 79,79 | III | <i>Phormidium chlorinum</i> PMC274.06 | NCBI:txid882073 |
| BS76 | 557 | 100 | 99,28 | IV | <i>Anabaena bergii</i> CHAB1385 | NCBI:txid929841 |
| BS81 | 369 | 88 | 100 | IV | <i>Aphanizomenon gracile</i> FBCC-A274 | NCBI:txid2734613 |
| BS83 | 558 | 100 | 99,11 | IV | <i>Dolichospermum spiroides</i> CHAB5817 | NCBI:txid2683312 |
| BS84 | 555 | 100 | 99,64 | IV | <i>Raphidiopsis mediterranea</i> FSS1-150/1 | NCBI:txid941186 |
| BS74 | 555 | 100 | 99,64 | IV | <i>Sphaerospermopsis reniformis</i> ACCS 105 | NCBI:txid1050189 |
| BS77 | 558 | 99 | 95,64 | kl | <i>Acanthoceras zachariasii</i> kloroplast | NCBI:txid451788 |
| BS78 | 556 | 100 | 99,27 | kl | <i>Cyclotella</i> sp. WC03_2 kloroplast | NCBI:txid1549164 |
| BS80 | 559 | 100 | 94,21 | kl | <i>Cyclotella</i> sp. WC03_2 kloroplast | NCBI:txid1549164 |



Şekil 4.13. Sonbahar mevsimine ait metagenom fragment dizilerinin Maximum Likelihood yöntemiyle evrimsel analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç. Ağaç en yüksek log olasılığına (-4865.60) göre çizilmiştir. Analiz 32 nükleotit dizisini içerir, son veri setinde toplam 593 pozisyon vardır. Evrimsel analiz MEGA X (Kumar vd, 2018) ile yürütülmüştür.

Dört mevsime ait fragmentlerin dahil oldukları siyanobakteriyel cins sayısı 16'dır (Tablo 4.10). Bunlardan 7'si altbölüm I, 1'i altbölüm III ve 8'i altbölüm IV'e dahil edilen cinslerdir. Ayrıca üç dizi iki farklı diatom cinsine ait kloroplast 16S rDNA dizilerini temsil etmektedir. En fazla temsil edilen cinsler altbölüm I'den *Limnothrix* ve *Synechococcus*, altbölüm IV'ten *Sphaerospermopsis*'tir.

Tablo 4.10. Balık Gölü'nde tespit edilen siyanobakteri cinsleri, temsil sayıları ve temsil edildikleri mevsimler

| Cins | Altbölüm | Temsil Sayısı | Temsil Edildiği Mevsimler | Dizi Adı |
|---------------------------|----------|---------------|------------------------------|--|
| <i>Cyanobacterium</i> | I | 1 | Yaz | BY67 |
| <i>Cyanobium</i> | I | 7 | İlkbahar, Yaz, Sonbahar | BB34, BB36, BB37, BB49, BB50, BY60, BS86 |
| <i>Limnothrix</i> | I | 10 | Kış, İlkbahar, Yaz, Sonbahar | BK23, BB35, BY61, BS71, BS72, BS82, BS85, BS87, BS88, BS90 |
| <i>Merismopedia</i> | I | 1 | Sonbahar | BS75 |
| <i>Microcystis</i> | I | 1 | Kış | BK21 |
| <i>Snowella</i> | I | 2 | Yaz | BY59, BY69 |
| <i>Synechococcus</i> | I | 10 | Kış, İlkbahar, Yaz | BK28, BB38, BB39, BB42, BB45, BB48, BY52, BY57, BY63, BY65 |
| <i>Phormidium</i> | III | 1 | Sonbahar | BS73 |
| <i>Anabaena</i> | IV | 4 | İlkbahar, Yaz, Sonbahar | BB46, BB47, BY55, BS76 |
| <i>Aphanizomenon</i> | IV | 5 | Kış, Yaz, Sonbahar | BK15, BK19, BK26, BY70, BS81 |
| <i>Cylindrospermopsis</i> | IV | 2 | İlkbahar, Yaz | BB40, BY53 |
| <i>Dolichospermum</i> | IV | 2 | Yaz, Sonbahar | BY58, BS83 |
| <i>Neowollea</i> | IV | 1 | Yaz | BY68 |
| <i>Raphidiopsis</i> | IV | 3 | Kış, Yaz, Sonbahar | BB30, BY62, BS84 |
| <i>Scytonematopsis</i> | IV | 1 | İlkbahar | BB31 |
| <i>Sphaerospermopsis</i> | IV | 10 | Kış, İlkbahar, Yaz, Sonbahar | BK11, BK12, BK22, BK25, BK27, BB32, BY51, BY56, BY64, BS74 |
| <i>Acanthoceras</i> | kl | 1 | Sonbahar | BS77 |
| <i>Cyclotella</i> sp. | kl | 2 | Sonbahar | BS78, BS80 |

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada Balık Gölü (19 Mayıs, Samsun) siyanobakteri komünitesinin mevsimsel siyanobakteriyel çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Gölün orta kısmından seçilmiş bir istasyondan su örnekleri alınmış ve bu örneklerin içindeki toplam canlı kütlede çevresel DNA elde edilerek daha ileri moleküler analizler yapılmıştır. Moleküler analizlerin yanında su örneğinin alındığı istasyondaki göl suyu sütununda ve laboratuvara taşınan su örneklerinde bazı fiziksel ve kimyasal parametreler de ölçülmüş ve değerlendirilmiştir.

Secchi diski ile yapılan bulanıklılık ölçümlerinde kış, ilkbahar ve yaz mevsimlerinde önemli bir fark gözlenmemiştir (40-45 cm) ancak bu değer sonbahar mevsiminde %25 oranında azalmıştır (30 cm). Sonbaharda bulanıklılığın artışının ana nedeni rüzgâr etkisiyle göl suyunun karışarak dibe çöken tortuların su sütunu boyunca az çok eşit olarak dağılmasına bağlanabilir. Yüzeyin 10 cm altında ölçülen sıcaklıklar beklendiği gibi en düşük kış (Şubat) ve en yüksek yaz (Ağustos) mevsiminde görülürken ilkbahar (Nisan) ve sonbahar (Kasım) mevsimlerinde benzer seviyelerde gözlenmiştir. Yüzey altı ve 2 m derinde ölçülen pH değerleri arasında önemli bir fark bulunmamaktadır. En yüksek pH yaz mevsiminde ölçülmüştür (9,13) diğer mevsimlerde yaz mevsimine göre daha düşüktür (8,06-8,44). Bütün mevsimlerde pH'nın nötrale göre daha yüksek olması bu göl ortamını nispeten daha yüksek pH'ları tercih eden siyanobakteriler için (Hinners et al., 2015) uygun bir habitat haline getirmektedir. İlkbahar ve sonbahar mevsiminde muhtemelen göl suyunun rüzgarlar nedeniyle karışıyor olmasından dolayı nitrat miktarı yüzey altı ve 2 m derinde nispeten aynıdır. Ancak yaz ve kış mevsiminde bu iki derinlik arasında önemli bir farklılaşma görülmektedir. Yazın 2 m derindeki nitrat miktarı yüzey altındakinden %68 daha fazla iken bu oran kışın %62 düzeyindedir. Bu farklılığın olası nedeni yaz ve kış mevsiminde göl suyunun durgun olmasına bağlı olarak nitratın yerçekimi etkisiyle dibe doğru tedrici çökmesidir. Takip eden ilkbahar ve sonbahar aylarında göl suyunun tekrar karışarak nitratın su sütunu boyunca az çok homojen bir şekilde dağılmasını sağladığı anlaşılmaktadır. Siyanobakteriler ve diğer organizmalar için kullanılabilir fosfat formu olan P_2O_5 miktarlarında nitrat miktarlarındaki gibi anlamlı bir dağılım gözlenmemiştir. Değerlendirme için her mevsimde sadece tek bir ölçüm sonuçlarının yetersiz kaldığı anlaşılmaktadır,

güvenilir ve anlamlı değerlendirmeler yapabilmek için her bir mevsimde farklı zamanlarda daha fazla ölçüm yapılmasına ihtiyaç olduğu açıktır.

Su örneklerinden saflaştırılan çevresel DNA içinde siyanobakterilere ait genomların varlığı, siyanobakteriyel 16S rRNA geninin bir kısmının spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmasıyla belirlenmiştir. Diğer bakterilerde de olduğu gibi siyanobakterilerin genotipik çeşitliliğinin belirlenmesinde 16S rRNA geninin değişken (variable, V) bölgelerinin kullanılabilmesi rapor edilmektedir (Nübel et al., 1997). Bu amaç için siyanobakteriyel 16S rRNA geninin V2-V4 bölgelerini içeren kısmının çoğaltılması için siyanobakteriler ve diyatom kloroplastları için spesifik olan bir primer çifti kullanıldı. Çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak spesifik primerlerle her bir mevsim ve derinliğe ait ampliconlar elde edilerek siyanobakteriyel bireylerin varlığı belirlendi. İki farklı derinlik ve dört farklı mevsimden elde edilen bütün çevresel DNA'lardan siyanobakteriyel ampliconlar elde edildi. Bu durum Balık Gölü'nün her iki derinliğinde dört mevsim boyunca siyanobakteri komünitesinin temsil edildiğini göstermektedir. Geleneksel PCR her ne kadar nicel bir veri sağlamasa da nitel olarak siyanobakteriyel bireylerin göl suyunda en azından geleneksel PCR ile taranabilir düzeyde bir birey sayısı ile temsil edildiğini göstermektedir.

Çevresel DNA'dan (metagenomdan) elde edilen bir amplicon (meta amplicon) ile bir saf kültüre ait DNA'dan elde edilen amplicon arasındaki temel fark metagenomdan elde edilen ampliconun farklı suşlara ait fragmentlerin bir karışımı şeklinde olmasıdır. Dolayısıyla saf DNA örneklerinden elde edilen ampliconlar geleneksel yöntemlerle dizilenebilir olmasına rağmen metagenomdan elde edilen ampliconlar geleneksel yöntemlerle doğrudan dizilenemez. Bir metagenomdan elde edilen ampliconlar ya yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) dizilenebilir ya da öncelikle klonlanarak bireysel fragmentlerin izolasyonu sağlandıktan sonra geleneksel yöntemlerle dizilenebilir. Bu çalışmada elde edilen ampliconların klonlanarak bireysel fragmentlerin izolasyonu ve daha sonra dizilenmesi stratejisi uygulanmıştır. Klonlama işlemlerine sadece yüzey altı çevresel DNA'dan elde edilen dört mevsime ait amplicon ayrı ayrı klonlandı. Böyle bir klonlamada fragmentler vektörlere rastgele bağlanacağı için amplicon içinde temsil edilen fragmentlerin tamamı değilse bile çoğu ayrı klonlar şeklinde temsil edilecektir. Böylece her amplicondan elde edilen klonlar rastgele seçilerek

dizilenmesi durumunda elde edilecek dizilerin ilgili mevsimde göl suyunda bulunan siyanobakteri genotiplerini temsil edeceği beklenebilir. Bu çalışmada dört mevsime ait dört amplikondan elde edilmiş klon gruplarının her birinden 20'şer adet seçilerek dizilenmiştir. Bu dizilerin ilgili mevsimdeki siyanobakterileri temsil ettiği varsayılmıştır. Bu varsayım elbetteki tam olarak doğadaki durumu yansıtmayabilir ancak yine de hedef komünite hakkında değerli bilgiler vereceği açıktır. Esasında her bir amplikonun NGS yöntemiyle dizilenmesi durumunda daha kapsayıcı sonuçlara ulaşmak daha olasıdır.

Elde edilen her bir dizinin ait olduğu takson NCBI platformunun sağladığı Blastn aracı kullanılarak belirlenmiştir. Dizilerin büyük çoğunluğu birden fazla taksonla çok yüksek, aynı veya birbirine çok yakın homoloji değerleri göstermiştir. Bu durumda dizinin hangi taksona daha yakın olduğuna karar vermede zorluklar oluşmuştur. Bu zorluklar, yüksek homoloji değerinin yanında çakışma oranının yüksekliği, homoloji listesindeki aynı taksona ait suşların sayısı ve referans dizinin kültüre alınmış bir organizmaya ait olması gibi ölçütler karar vermek için esas alınarak aşılmaya çalışılmıştır. Siyanobakteriyel diziler için bu tip karmaşaların temel nedeni siyanobakterilerin sistematığının hala yerleşik bir sisteme oturtulamamasından kaynaklanmaktadır (Rippka et al., 1979; Wilmotte and Herdman, 2001; Komárek et al., 2014). NCBI platformunda kullanılan taksonomide, diğer organizma gruplarında olduğu gibi siyanobakterilerin hem ICBN (algler, funguslar ve bitkiler için uluslararası isimlendirme kodu) hem de ICNP (prokaryotlar için uluslararası isimlendirme kodu) tarafından geçerli sayılan bütün taksonlar listelenmektedir (Schoch et al., 2020). Siyanobakteriyel sistematikteki bu karışıklığın bir kısmı da özellikle mikroskop altında gözlemlenen hücresel özelliklere ve kültür özelliklerine göre yapılan çok sayıda takson tanımlamalarından kaynaklanmaktadır. Kaldı ki polifazik taksonomi çabaları bile şu an için yerleşik bir siyanobakteri sistematığının oluşturulmasını sağlayamamıştır. Sonuçta veritabanlarındaki dizilerle yapılan karşılaştırma çalışmalarında bir siyanobakteriyel dizinin birden fazla taksona ait diziyile yüksek homoloji göstermesi bugün için kaçınılmaz bir durumdur. Bu çalışmanın sonuçlarını siyanobakteriyel taksonominin karmaşasından nispeten uzak tutmak için, *Cyanobacteria* filumunun 5 altbölüm şeklinde organize edildiği Bergey's Manual of Systematic Bacteriology tarafından önerilen taksonomik anahat (Garrity et al., 2004) esas alınmıştır.

Dört mevsime ait toplam 64 dizinin kimliği veritabanlarındaki dizilerle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bu dizilerden 12'si kış, 16'sı ilkbahar, 18'i yaz ve 18'i sonbahar mevsiminden elde edilmiş metagenomdan çoğaltılıp klonlanarak izole edilmişlerdir. Dizilerin çoğu (60'ı) altbölüm I ve altbölüm IV içinde konumlanmıştır. Geriye kalan dizilerden 1'i nispeten zayıf bir homoloji ile (%79,79) altbölüm III içinde diğer 3'ü de diatom kloroplastlarına aittir. Dolayısıyla yıl boyunca sürekli temsil edilen ve temsil oranı yüksek olan siyanobakteriyel organizmalar altbölüm I ve altbölüm IV üyeleridir. Dört mevsime ait dizilerin homoloji gösterdiği taksonlar incelendiğinde bu taksonların toplam 16 farklı cinse dahil oldukları görülmektedir. Dizilerden 3'ü de iki farklı diatom cinsine ait kloroplast dizileriyle homologdur. Bu siyanobakteriyel cinsler arasında *Synechococcus*, *Limnothrix* ve *Sphaerospermopsis* 10'ar dizi ile en fazla temsil edilen cinslerdir. Daha önce Balık Gölü ile hemen bitişiğinde bulunan ve birbirleriyle bağlantılı olan Uzun Gölü kapsayan, epipelik alglerin taksonomik ve nümerik karşılaştırmasını amaçlayan bir çalışmaya siyanobakteriyel taksonlar da dahil edilmiştir (Gönüloğlu vd., 2009) Taksonlar mikroskopik olarak teşhis edilerek değerlendirilmiştir. Ayrıca seçilen istasyonların tamamında ortak bulunan taksonların değerlendirmeye alınmadığı bildirilmekte olup değerlendirilmeye katılmayan taksonlar arasında siyanobakteriyel olanlar hakkında da herhangi bir bilgi verilmemektedir. Takson listesinde verilen siyanobakteriyel taksonlar incelendiğinde sadece 3 cinsin (*Aphanozymenon sp.*, *Microcystis sp.* ve *Snowella sp.*) bu çalışmada belirlenen cinslerle aynı olduğu görülmektedir. Her ne kadar araştırma alanının bir kısmı çakışıyor da olsa metot, kapsam ve sonuçları bakımından bu iki çalışmanın oldukça farklı olduğu açıktır.

İlkbahar ve sonbaharda tek hücreli forma sahip olan altbölüm I üyeleri daha yaygın iken kış mevsiminde filamentli-heterosistli bir forma sahip olan altbölüm IV üyeleri daha yaygındır. Yaz mevsiminde ise her iki altbölüm üyeleri eşit bir şekilde temsil edilmiştir. Farklı altbölümlerin ve kloroplast dizilerinin yaygınlığı, analiz edilen her mevsime ait diziler içindeki sayıları esas alınarak yapılmıştır. Sonbahar mevsiminde diatom kloroplastlarına ait 16S rDNA dizilerine rastlanması, bu mevsimde göl suyundaki fotosentetik komünite üyeleri arasında siyanobakterilere göre nispeten daha düşük sıcaklık optimumlarına sahip mikroalglerin yaygınlaşmaya başladığını da göstermektedir. Elbette temsil sıklıklarının değerlendirmenin güvenilirliği daha fazla klonun dizilenmesi ve ya NGS yöntemiyle her bir mevsime

ait amplikonların içerdiği fragmentlerin tamamının dizilenmesiyle artırılacaktır. Ancak bu yöntem uygulansa bile komünite içinde nadir olarak temsil edilen ve dolayısıyla PCR amplifikasyonu sırasında çoğaltılamayan bireylerin değerlendirme dışı kalma olasılığı daima mevcut olacaktır.

Dört mevsime ait dizilerin Maksimum Likelihood yöntemiyle filogenetik olarak değerlendirme sonuçları siyanobakteriler için beklenen sonuçlarla uyumludur. Altbölümler I ve IV dizilerinin her birinin genel olarak birbiriyle yakın bir şekilde kümelendikleri görülmüştür. Özellikle altbölüm IV dizileri kararlı bir şekilde birlikte kümelenmişlerdir. Altbölüm I dizilerinin çoğu birlikte kümelenmelerine rağmen az sayıda dizi altbölüm IV dizilerine daha yakın bir şekilde kümelenmişlerdir. Altbölüm IV dizilerine daha yakın bir şekilde konumlanmış olan bu diziler şunlardır: Kış dizilerinden *Microcystis aeruginosa* ile tam homolojiye sahip BK21, ilkbahar dizilerinden *Limnotrix sp.* SDEC-19 ile %99,28 homolog olan BB35, yaz dizilerinden *Snowella litoralis* ile sırasıyla %99,82 ve %100 homolog olan BY59 ile BY69 ve sonbahar dizilerinden *Cyanobium sp.*CSZ_22C ile %99,46 homolog olan BS86. 16S rRNA geninin sadece V2-V4 bölgelerini kapsayan nispeten kısa bir dizi ile kapsayıcı bir filogenetik ilişki tanımlaması zordur. Ancak bu şekilde beklenmedik kümeleşmeler siyanobakteriyel filogenetik araştırmalarda sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (Wilmotte and Herdman, 2001; Komárek, 2016).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Balık Gölü (19 Mayıs, Samsun) siyanobakteri komünitesinin mevsimsel biyoçeşitliliği metagenomik bir yaklaşımla araştırılmıştır. Dört mevsim için Balık Gölü'nde belirlenen bir istasyondan alınan su örneklerinden elde edilen toplam DNA (çevresel DNA, metagenom) içinde siyanobakterilere ait olan genomların tespiti çalışmaları yürütülmüştür. Siyanobakteriyel genomların varlığı, siyanobakteriler için spesifik olan bir çift primer kullanılarak 16S rRNA geninin V2-V4 bölgelerini kapsayan kısmının PCR amplifikasyonu ile çoğaltılması yoluyla belirlenmiştir. Belli bir mevsimde elde edilen çevresel DNA kalıp olarak kullanıldığında spesifik primerler ile bir ampikon oluşumu siyanobakterilerin varlığının kanıtı olarak kabul edilmiştir.

Dört mevsim ve iki farklı derinlikten (10 cm ve 200 cm) elde edilen çevresel DNA örneklerinin tamamından siyanobakteriyel 16S rRNA ampikonu (yaklaşık 600 bç) elde edilmiştir. Bu sonuç siyanobakteri taksonlarına ait hücrelerin dört mevsimde ve her iki derinlikte de temsil edildiği belirlenmiştir.

Ampikonların varlığı siyanobakteriyel hücrelerin varlığını göstermesine rağmen bu hücrelerin hangi taksonomik gruplara dahil olduğunu göstermemektedir. Dizilerin kimliklerinin belirlenmesi için baz dizilerinin belirlenmesi gerekir. Bunun için metagenomdan elde edilmiş karma bir fragment içeriği olan bir ampikonun geleneksel yöntemlerle doğrudan dizilenmesi ile mümkün değildir, öncelikle bireysel fragmentlerin izole edilmesi gerekir. Bunun için yüzey DNA'sından elde edilmiş dört mevsime ait ampikonlar rastgele klonlandı ve elde edilen klonlardan belli sayıda klonun taşıdığı fragmentlerin baz dizileri belirlendi. Kış mevsimi için 12, ilkbahar için 16, yaz ve sonbahar için 18'er fragmente ait baz dizileri elde edilmiştir.

Elde edilen baz dizileri veritabanlarında karşılaştırılarak en yüksek homolojiye sahip taksonlar belirlenmiştir. Yapılan analizlerin sonucunda yıl boyunca göl suyunda mevcut olan siyanobakteriyel dizilerin çoğunun altbölüm I ve altbölüm IV'e dahil olduğu belirlenmiştir. Toplam 64 diziden sadece 1'i altbölüm III'e, 3'ü de diatom kloroplastlarına aittir. Kış mevsiminde altbölüm IV dizileri daha fazla iken ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde altbölüm I ve altbölüm IV eşit olarak temsil edilmektedir. Yaz mevsiminde ise her iki altbölüme dahil diziler eşit miktarda temsil edilmektedir. Sonbahar mevsiminde bu iki alt bölüme ilave olarak az sayıda da olsa

altbölüm III ve diatom kloroplastlarına ait diziler de temsil edilmektedir. Dizilerin tamamı incelendiğinde toplam 15 farklı cinsin temsil edildiği görülmektedir, bu cinslerden 3'ü 10'ar dizi ile temsil edilen *Synechococcus*, *Limnothrix* ve *Sphaerospermopsis* cinsleridir.

Elde edilen 16S rRNA geninin V2-V4 bölgesini içeren fragmentlere ait dizilerin filogenetik ilişkileri de araştırılmıştır. Altbölüm IV'e ait diziler siyanobakteriyel grupların genel eğilimine uygun olarak birlikte kümelenmişlerdir. Yine diatom kloroplastlarına ait diziler de ayrı bir küme oluşturmuştur. Altbölüm I'e ait dizilerin çoğu birlikte kümelenmesine rağmen az sayıda dizi altbölüm IV dizilerinin oluşturduğu kümeye daha yakın bir şekilde konumlanmışlardır. Bu durum da siyanobakterlerin filogenetik ilişkilerinde altbölüm I üyeleri arasında sıklıkla rastlanan bir durumdur.

Siyanobakteriyel çeşitliliğin belirlenmesi için daha zor olan ve siyanobakteriyel sistematığın yerleşmemiş olmasından dolayı geleneksel teşhis yöntemleri yerine moleküler yöntemlerin tercih edilmesi genel bir eğilimdir. İdeal olan her iki yöntemin birlikte değerlendirildiği polifazik bir yaklaşım gibi görülse de bu iki yöntemin sonuçları çoğu durumda çelişmektedir. Bu durumda moleküler veriler ile biyoçeşitliliğin değerlendirilmesi daha tercih edilen bir yaklaşım haline gelmektedir. Diğer prokaryotik gruplarda olduğu gibi siyanobakteriyel taksonomik grupları ayırt edici olacağı kabul edilen kısa DNA dizilerinin değerlendirilmesiyle çeşitlilik belirlenmeye çalışılmaktadır. Özellikle kültüre almaya gerek kalmadan, elde edilen metagenomdan (çevresel DNA'dan) komünitede temsil edilen bütün bireylere ait dizilerin çoğaltılarak biyoçeşitliliğin belirlenmesi daha kullanışlı bir yöntem olarak görülmektedir. Ancak farklı bireylere ait karışık fragmentlerden meydana gelen amplikonlardan, bireysel fragmentlerin dizilerinin belirlenebilmesi için, bu çalışmada da yapıldığı gibi öncelikle klonlanarak izole edilmeleri gerekmektedir. Böyle bir klonlanma işlemine ihtiyaç duyulmadan, yeni nesil dizileme (NGS) yöntemiyle bir amplikondaki bütün fragmentlerin dizilenerek değerlendirme yapılmasının, daha kapsayıcı biyoçeşitlilik bilgileri sağlayacağı kesindir.

Denizler kadar karasal su rezervlerinin siyanobakteriyel biyoçeşitliliğinin belirlenmesi dünyanın, kıtalar gibi belli bölgelerin ve ülkelerin biyolojik zenginliklerinin belirlenmesi bakımından önemlidir. Siyanobakteriyel biyoçeşitliliğin belirlenmesi iklim değişikliklerine bağlı olarak dünyanın sıcaklığının artmakta

olmasıyla ilişkileri bakımından ayrıca önem kazanmaktadır. Siyanobakteriyel populasyonlar, diğer şartların da müsait olması durumunda sıcaklıktaki artışlarla orantılı olarak özellikle yaz ve sonbahar mevsimlerinde daha hızla gelişmekte ve aşırı populasyon büyümelerine neden olmaktadır. Bu durum, ötrofikasyon ve toksin üretimi gibi olumsuzlukların sonucu olarak su rezervlerinin su kalitesinin bozulmasıyla sonuçlanmaktadır. Populasyonların gelecekte olası aşırı çoğalması hakkında öngörülerde bulunabilmek ve önlemler geliştirmek için siyanobakteriyel komünitelerin mevcut durumlarının belirlenmesi ve kayıt altına alınması, sucul ekosistemlerin korunması için gerekli olduğu şüphesizdir.

KAYNAKLAR

- Adams, D. G. (2000). Symbiotic interactions. Whitton, B.A. and Potts, M. (eds.) *The Ecology Of Cyanobacteria*, ss. 523-561. New York: Springer
- Affe, H. M., Rigonato, J., Nuses, J. M. and Menezes, M. (2018). Metagenomic analysis of cyanobacteria in an oligotrophic tropical estuary, South Atlantic. *Frontiers in Microbiology*, 8, s. 1393.
- Alvarenga, D. O., Fiore, M. F., and Varani, A. M. (2017). A metagenomic approach to cyanobacterial genomics. *Frontiers in Microbiology*, 8, s. 809.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), ss. 143-169.
- Atıcı, T. and Tokatlı, C. (2014). Algal diversity and water quality assessment with cluster analysis of four freshwater lakes (Mogan, Abant, Karagöl and Poyrazlar) of Turkey. *Wulfenia*, 21(4), ss.155-169.
- Baykal, T., Açıköz, İ., Udoh, A. U. and Yıldız, K. (2011). Seasonal variations in phytoplankton composition and biomass in a small lowland river-lake system (Melen River, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 35(4), ss. 485-501.
- Bekleyen, A. ve Tas, B. (2008). Çernek Gölü'nün (Samsun) zooplankton faunası. *Ekoloji*, 17(67), ss. 24-30.
- Blainey, P. C. (2013). The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), ss. 407-427.
- Boyer, S. L., Flechtner, V. R. and Johansen, J. R. (2001). Is the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 18(6), ss. 1057-1069.
- Brown, T. A. (2020). *Gene cloning and DNA analysis: An introduction*. Wiley J., and Sons (eds.). ss. 3-11.
- Butterwick, C., Heaney, S.I., and Talling J. F. (2005). Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. Robson, B. (ed.). *Freshwater Biology*, 50(2), ss. 291-300.
- Casamatta, D. A., Johansen, J. R., Vis, M. L. and Broadwater, S. T. (2005). Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the *Oscillatoriales* (Cyanobacteria), *Journal of Phycology*, 41(2), ss. 421-438.
- Castenholz, R. W. (2015) General characteristics of the cyanobacteria. Whitman, W. B. (ed.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, ss. 1-23. USA.
- Castenholz, R. W., Wilmotte, A., Herdman, M., Rippka, R., Waterbury, J.B. and Itean, I. (2001). Phylum BX. cyanobacteria. Boone, D. R., Castenholz, R. W. and Garrity, G. M. (eds.). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, ss. 473-599. New York: Springer.
- Celepli, N., Sundh, J., Ekman, M., Dupont, C. L., Yooseph, S., Bergman, B. and Ininbergs, K. (2017). Meta-omic analyses of Baltic Sea cyanobacteria: Diversity, community structure and salt acclimation. *Environmental Microbiology*, 19(2), ss. 673-686.

- Chirico, N., António, D. C., Pozzoli, L., Marinov, D., Malagó, A., Sanseverino, I., Beghi, A., Genoni, P., Dobricic, S. and Lettieri, T. (2020). Cyanobacterial blooms in lake Varese: Analysis and characterization over ten years of observations. *Water*, 12(3), s. 675.
- Coenye, T., Gevers, T., Peer, Y. V., Vandamme, P. and Swings, J. (2005). Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(2), ss. 147-167.
- Cüce, H., Bakan, G. ve Akıncı, H. (2011). Balık gölü (Kızılırmak Deltası, Samsun) su kalitesinin konumsal analizi. *TMMOB Coğrafi Bilgi Sistemleri Kongresi: Antalya*, 2011.
- Davison, M., Hall, E., Zare, R. and Bhaya, D. (2015). Challenges of metagenomics and single-cell genomics approaches for exploring cyanobacterial diversity. *Photosynthesis Research*, 126(1), ss.135-146.
- Deng, L. and Hayes, P. K. (2008). Evidence for cyanophages active against bloom-forming freshwater cyanobacteria. *Freshwater Biology*, 53(6), ss. 1240-1252.
- Dorador, C., Vila, I., Imhoff, J. F. and Witzel, K. P. (2008). Cyanobacterial diversity in Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile: An example of geographical dispersion? *FEMS Microbiology Ecology*, 64(3), ss. 419-432.
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Davis, J. A. and Kuske, C. R. (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), ss. 1662-1669.
- Engene, N., Gunasekera, S. P., Gerwick, W. H. and Paul, V. J. (2013). Phylogenetic inferences reveal a large extent of novel biodiversity in chemically rich tropical marine cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), ss. 1882-1888.
- Ersanlı, E. and Gönülol, A. (2003). Study on the phytoplankton and seasonal variation of Lake Simenit (Terme-Samsun, Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3(1) ss. 29-39.
- Faldu, N., Patel, S., Vishwakarma, N. P., Singh, A. K., Patel, K. and Pandhi, N. (2014). Genetic diversity of marine and fresh water cyanobacteria from the Gujarat state of India. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(14), ss. 1061-1065.
- Foy, R., Gibson, C. E. and Smith, R. V. (1976). The influence of daylength, light intensity and temperature on the growth rates of planktonic blue-green algae. *British Phycological Journal*, 11(2), ss.151-163.
- García-Martínez, J., Acinas, S. G., Antón, A. I. and Rodríguez-Valera, F. (1999). Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 36(1-2), ss. 55-64.
- Garcia-Pichel, F., Belnap, J., Neuer, S. and Schanz, F. (2003). Estimates of global cyanobacterial biomass and its distribution. *Algological Studies*, 109(1), (ss. 213-227).
- Garrity, G. M., Bell, J. A. and Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. Goodfellow, M. (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Second Edition) New York.
- Gilbert, J. A. and Dupont, C. L. (2011). Microbial metagenomics: beyond the genome. *Annual Review of Marine Science*, 3, ss. 347-371.

- Giovannoni, S. J., Delong, E. F., Schmidt, T. M. and Pace, N. R. (1990). Tangential flow filtration and preliminary phylogenetic analysis of marine picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), ss. 2572-2575.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, J., Lane, D. J. and Pace, N. R. (1988). Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology*, 170(8), ss. 3584-3592.
- Gönülol, A., Ersanlı E. and Baytut, Ö. (2009). Taxonomical and numerical comparison of epipelagic algae from Balık and Uzun lagoon, Turkey. *Journal of Environmental Biology*, 30(5), ss. 777-784.
- Hall, T. A. (1999). *BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*, Paper presented at the Nucleic acids symposium series.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), ss. 669-685.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. and Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*. 5(10), ss. 245-249.
- Heather, J. M. and Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 107(1), ss. 1-8.
- Hinners, J., Hofmeister, R. and Hense, I. (2015). Modeling the role of pH on Baltic Sea cyanobacteria. *Life*, 5(2), ss. 1204-1217.
- Hoffmann, L., Komárek, J. and Kaštovský, J. (2005). System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) state in 2004. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, ss. 95-115
- Hohmann-Marriott, M. F. and Blankenship, R. E. (2011). Evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. 62, ss. 515-548.
- Jankowiak, J., Hattenrath-Lehmann, T., Kramer, B. J., Ladds, M. and Gobler, C. J. (2019). Deciphering the effects of nitrogen, phosphorus, and temperature on cyanobacterial bloom intensification, diversity, and toxicity in western Lake Erie. *Limnology and Oceanography*, 64(3), ss.1347-1370.
- Kaneko, T., et al. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research*, 3(3), ss. 109-136.
- Koboldt, D. C., Steinberg, K. M., Larson, D. E., Wilson, R. K. and Mardis, E. R. (2013). The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*, 155(1), ss. 27-38.
- Komárek, J. (2006). Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae*, 218(4), ss. 349-375.
- Komárek, J. (2016). A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*, 51(3), ss. 346-353.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. and Johansen, J. R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 86(4) ss. 295-335.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), ss. 1547-1549.
- Kumari, N., Srivastava, A. K., Bhargava, P. and Rai, L. C. (2009). Molecular approaches towards assessment of cyanobacterial biodiversity. *African Journal of Biotechnology*, 8(18), ss. 4284-4298.
- Laloui, W., Palinska, K.A., Rippka, R., Partensky, F., Tandeau de Marsac, N., Herdman, M. and Iteman, I. (2002). Genotyping of axenic and non-axenic isolates of the genus *Prochlorococcus* and the OMF-‘*Synechococcus*’ clade by size, sequence analysis or RFLP of the Internal Transcribed Spacer of the ribosomal operon. The GenBank accession numbers for the ITS amplicon sequences reported in this paper are AF387607 (PCC 9511T), AF387610 (PCC 6307), AF387608 (PCC 7001) and AF387609 (PCC 7941). *Microbiology*, 148(2), ss. 453-465.
- López-Cortés, A., García-Pichel, F., Nübel, U. and Vázquez-Juárez, R. (2001). Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: A polyphasic study. *International Microbiology*, 4(4), ss. 227-236.
- Lu, W., Evans, H., McColl, S.M. and Saunders, V.A. (1997). Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR-amplified ribosomal DNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters*, 153(1), ss. 141-149.
- Madigan, M. T. and Martinko, J. (2005). *Brock Biology of Microorganisms*, 11th Edition: SciELO, Espana.
- Mankiewicz, J., Tarczynska, M., Walter, Z. and Zalewski, M. (2003). Natural toxins from cyanobacteria. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45, ss.9-20.
- Neilan, B. A. (1996). Detection and identification of cyanobacteria associated with toxic blooms: DNA amplification protocols. *Phycologia*, 35(6S), ss. 147-155.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. and Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), ss. 3327-3332.
- Oren, A. (2004). A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 54(5), ss. 1895-1902.
- Oren, A. (2011). Naming Cyanophyta/Cyanobacteria—a bacteriologist’s view. *Fottea*, 11(1), ss. 9-16.
- Oren, A. (2015). Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties. *Biodiversity and Conservation*, 24(4), ss. 781-798.
- Özbayram, E. G., Köker, L., Akçaalan, R., İnce, O. and Albay, M. (2020). Bacterial Community Composition of Sapanca Lake During a Cyanobacterial Bloom. *Aquatic Sciences and Engineering*, 35(2), ss. 52-56.
- Özen, M. (2020). Uluabat Gölü toksik siyanobakteri türleri ve toksinlerinin belirlenmesi. Basılmamış Doktora Tezi. Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa
- Öztürk, B. Y., Aşıkkutlu, B., Akkoz, C. and Atıcı, T. (2019). Molecular and Morphological Characterization of Several Cyanobacteria and Chlorophyta Species Isolated from Lakes in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(8), ss. 635-643.
- Pace, N. (1995). Opening the door onto the natural microbial world: molecular microbial ecology. *Harvey Lectures*, 91, ss. 59-78.

- Paerl, H. W., Hall, N. S. and Calandrino, E. S. (2011). Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of The Total Environment*, 409(10), ss. 1739-1745.
- Palinska, K. A. and Surosz, W. (2014). Taxonomy of cyanobacteria: a contribution to consensus approach. *Hydrobiologia*, 740(1), ss. 1-11.
- Patel, B. (2009). Simple, Fast, and Efficient Cloning of PCR Products with TOPO® Cloning Vectors. *Biotechniques*, 46(7), s. 559.
- Pope, P. B. and Patel, B. K. (2008). Metagenomic analysis of a freshwater toxic cyanobacteria bloom. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1), ss. 9-2.
- Rigonato, J., Alvarenga, D. O., Andreote, F. D., Dias, A. C. F., Melo, I. S., Kent, A. and Fiore, M. F. (2012). Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(2), ss. 312-322.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), ss. 1-61.
- Robarts, R. D. and Zohary, T. (1987). Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21(3), ss. 391-399.
- Rodríguez-Valera, F. (2004). Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiology Letters*, 231(2), ss. 153-158.
- Russell, D. W. and Sambrook, J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New York
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third edition. Cold spring harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings Of The National Academy of Sciences*, 74(12), ss. 5463-5467.
- Schmidt, T. M., Delong, E. F. and Pace, N. R. (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology*, 173(14), ss. 4371-4378.
- Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hottel, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soudsova, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S. and Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020.
- Simon, C. and Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), ss. 1153-1161.
- Sood, A., Renuka, N., Prasanna, R. and Ahluwalia, A. S. (2015). Cyanobacteria as potential options for wastewater treatment. *Phytoremediation*, ss. 83-93: Springer.
- Soylu, E. N. and Gönülol, A. (2003). Phytoplankton and seasonal variations of the River Yeşilirmak, Amasya, Türkiye. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3(1) ss. 17-14.
- Stal, L. J. (2012). Cyanobacterial mats and stromatolites. Whitton, B. A. (ed.) *Ecology of Cyanobacteria II*, ss. 65-125: Springer..
- Stanier, R. and Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 31:1, ss. 225-274.

- Stanier, R., Siström, W.R., Hansen, T.A., Whitton, B.A., Castenholz, R.W., Pfennig, N., Gorlenko, V.N., Kondratieva, E.N., Eimhjellen, K.E., Whittenbury, R., Gherna, R.I. and Trüper, H.G. (1978). Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 28(2), ss. 335-336.
- Swingland, I. R. (2001). Biodiversity, definition of. *Encyclopedia of Biodiversity*, 1, ss. 377-391.
- Şahin, B., Akar, B. and Bahçeci, İ. (2010). Species composition and diversity of epipelagic algae in Balık Lake (Şavşat-Artvin, Turkey). *Turkish Journal of Botany*, 34(5), ss. 441-448.
- Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), ss. 512-526.
- Taş, B. and Gönülol, A. (2007). An ecologic and taxonomic study on phytoplankton of a shallow lake, Turkey. *Journal of Environmental Biology*, 28(2), ss. 439-445.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., Wit, R. and Wilmotte, A. (2003). Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), ss. 5157-5169.
- Thajuddin, N. and Subramanian, G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*. 89(1) ss. 47-57.
- Thomas, T., Thomas, T., Gilbert, J. and Meyer, F. (2012). Metagenomics-a guide from sampling to data analysis. *Microbial informatics and Experimentation*, 2(1), ss. 1-12.
- Tringe, S. G. and Hugenholtz, P. (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), ss. 442-446.
- Vermaas, W. F. (2001). Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. J. Wiley and Sons. *eLS*, doi:10.1038/npg.els.0001670.
- Wacklin, P. (2006). Biodiversity and phylogeny of planktic cyanobacteria in temperate freshwater lakes. Department of Applied Chemistry and Microbiology University of Helsinki, Finland, ss. 1-52.
- Ward, C. J., Beattie, K. A., Lee, E. Y. C. and Codd, G. A. (1997). Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic analysis for microcystins. *FEMS Microbiology Letters*, 153(2), ss. 465-473.
- Whitton, B. A. (1992). Diversity, ecology, and taxonomy of the cyanobacteria., Mann, N.H. and Carr, N.G. (eds.). *Photosynthetic Prokaryotes*, ss. 1-51: Springer.
- Whitton, B. A. and Potts, M. (2012). Introduction to the cyanobacteria. Whitton B. A., (eds.) *Ecology of Cyanobacteria II*, ss. 1-13. Dordrecht: Springer.
- Willis, A. and Woodhouse, J. N. (2020). Defining cyanobacterial species: Diversity and description through genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39(2), ss. 101-124.
- Wilmotte, A. (1994). Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. Bryant, D.A. (ed.). *The Molecular Biology of Cyanobacteria* ss. 1-25. Dordrecht: Springer.

- Wilmotte, A. and Herdman, M. (2001). Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. Bone, R.D. and Castenholz, R.W (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. ss.487-493: Springer.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), ss. 221-264.
- Wooley, J. C., Godzik, A. and Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. *PLoS Comput Biol*, 6:2, e1000667.
- Xu, Y. and Zhao, F. (2018). Single-cell metagenomics: challenges and applications. *Protein & Cell*, 9(5), ss. 501-510.
- Yılmaz Cankılıç, M. and Arık Berk, G. (2016). Analysis of cyanobacterial diversity of some hot springs in Afyonkarahisar, Turkey. *Applied Ecology and Environmental Research*, 14(2), ss. 463-484.
- Zeidner, G., Preston, C.M., Delong, E.F., Massana, R., Post, A.F., Scanlan, D.J. and Déja, O. (2003). Molecular diversity among marine picophytoplankton as revealed by *psbA* analyses. *Environmental Microbiology*, 5(3), ss. 212-216.
- Zhang, M., Duan, H., Shi, X., Yu, Y. and Kong, F. (2012). Contributions of meteorology to the phenology of cyanobacterial blooms: implications for future climate change. *Water Research*, 46(2), ss. 442-452.
- Zhou, M.-Y. and Gomez-Sanchez, C. E. (2000). Universal TA cloning. *Current Issues in Molecular Biology*, 2(1), ss. 1-8.

EKLER

Ek 1: Balık Gölü (19 Mayıs, Samsun) su örneklerinden izole edilmiş siyanobakteriyel 16S rRNA gen bölgesine ait nükleotit dizileri. Diziler fasta formatına uygun şekilde sunulmuştur. BK11-30 kış, BB31-50 ilkbahar, BY51-70 yaz ve BS71-90 sonbahar mevsimine ait dizilerdir.

>BK11

```
CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG
ACCCGAGCCGTGCCGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTG
ACATCCTGCGAATTTTCCTGAAAGGGGAAAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTA
CGGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTA
GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAATTGC
```

>BK12

```
TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTAT
CGACCCGAGCCGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGT
ACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
TGGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTT
GACATCCTGCGAATTTTCCTGAAAGGGGAAAGTGCCTTCGGGAGCGCAGA
GACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGG
GCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACG
TCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCT
ACGGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGT
AGTCTCAGTTCAGATCGAAGGCCGCAACTCGCCTTCGTGGAGGAGGAATCG
CTAGTAATTG
```

>BK15

```
ATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTA
TCGACCCGAGCTGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAG
TACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGTGGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGC
TTGACATGTCACGAATTCGGTTGAAAGATGGAGGTGCCTTCGGGAGCGTG
AACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT
GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATG
CTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCATAAACC
GTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAAT
CGTAGTAATTG
```

>BK19

```
CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTATCG
ACCCGAGCTGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACATGTCACGAATTCGGTTGAAAGATGGAAGTGCCTTCGGGAGCGTGAAC
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTAGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGG
```

CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCATAAACCGTA
GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAA

>BK21

TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTAT
CGACCCGAGCCGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGT
ACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGACT
TGACATGTCGCGAACCCCTGGTGAAAGCTGGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGA
ACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTG
GGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACACGTACTACAATGG
TCGGGACAAAGGGCAGCGAACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCCAGCAAACC
CGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAAT
CGCTAGTAA

>BK22

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG
ACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGACTTG
ACATCCTGCGAATTTTCCTGAGAGGGAAAAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCACCGAGCGCAACCCTCGTTTTTTAGTTGTCAGCATTAAAGATGGG
CACTCTAAAGAGACTGACGGTGACAAACCGGAGGAAGATGAGGATGTGGA
TGACGTCAAGTCATCCTGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACCTACTACA
AGGTTCCGGACAGAGGCCTGCATCCTCGCGAGAGATATCTAATCTCGTAA
ACCCGGCCTCATTTCAAATTGCAGGCTGCATCTCCCCTGCATGAAAGACG
AATCGCTAGTAAT

>BK23

GATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGT
ATCGACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGA
GTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGTGGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGG
CTTGACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCCGGAGTGCCTTCGGGAGCGC
AGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGT
TGGGGACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATG
ACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAAT
GGTCCGGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGCAAGCTA

>BK25

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG
ACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAGGAACCCTACCGAGACTTG
ACATCCTGCGAATTTTCCTGAAAGGGAAAAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTA
GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAA

>BK26

CCCCGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTATCG
ACCCGAGCTGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACATGTCACGAATTCGGTTGAAAGATGGAAGTGCCTTCGGGAGCGTGAAC
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCATAAACCGTA
GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAA

>BK27

TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTAT
CGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGT
ACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACT
TGACATCCTGCGAATTTTCTGAAAGGGAAAAGTGCCTTCGGGAGCGCAG
AGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATG
GGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGAC
GTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGC
TACGGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCG
TAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATC
GCTAGTAA

>BK28

ACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGCGTCGGGGGAATC
GACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGAGTA
CGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
TGGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTT
GACATCCTGCGAATCTTTTGGAAACAGAAGAGTGCCTTCGGGAACGCAGT
GACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGG
GCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACG
TCAAGTCATCATGCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCT
ACGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCAAGCAAATCCCATAAACCGT
GGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCG
CTAGTAATTG

>BK30

CCCCGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG
ACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTG
ACATCC

>BB31

AGTTCAGATCG TAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAG
TAATTG

>BB32

ACCCCTGTGGTCCTACTCGGAGCGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG
ACCCGAGCCGTGCCGGATCTAACGCGTTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTAC
GTCGGGAGGGTGAAGTTCATAGGTTTTATGGGGATCTCACACACGTTG
GATGATGTGGTTTTCTTCGATGCTTCTTAGGAACCTTACCGAGACTCGAC
ATCCTGAGAATTTTCTGAAAGGGAAAAGTGTCTTCGCGAGCTCAGAAAC
AGGTGGTGCATGGCTGTCGGCAGCTCCTGCCTTGAAGTGTGGGTAAAT
CCCGAAACGAGCGCTACCCTCGTTTTTTCGTTGCCACCCTTAATATGGTCT

CTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCA
TGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTCTCACGAACTACAATGCATCTG
ACAAAGGGCGGCTCCCAGCGATGTGATGCAAATCTCACAACCTCGTAGATG
AGTTCAGATCAAAGGTTGCAACTCGCCTTCGTATTTCGAGGAATCTCTAGC
AA

>BB34

TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAAT
CGACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGT
ACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTT
TGACATCCTGCGAATCCCTTGGAAACTTGGGAGTGCCTTTCGGGAGCGCAG
TGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTG
GGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGAC
GTCAAGTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGC
TACGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCG
TGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATC
GCTAGTAAT

>BB35

TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTAT
CGACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGT
ACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCACACAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCT
TGACATCCTGCGAATCCCTGGGAAAGTTCGGGAGTGCCTTTCGGGAGCGCAG
AGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCACTAAGTTG
GGGACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGAC
GTCAAGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGG
TCGGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGCAAACCC
GGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGGATGAAGGAGGAATC
GCTAGTAA

>BB36

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCG
ACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTT
ACATCCTGCGAATCCCTTGGAAACTTGGGAGTGCCTTTCGGGAGCGCAGTG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGG
CACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTG
GCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAAT

>BB37

CCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCG
ACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTT
ACATCCTGCGAATCCCTTGGAAACTTGGGAGTGCCTTTCGGGAGCGCAGTG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGG
CACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTG
GCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAA

>BB38

CCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAATCGA
CCCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGAAGTACG
CACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
GAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGA
CATCCTGCGAATCCCTTGGAAACTTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGTGA
CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGC
ACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTC
AAGTCATCATGCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTAC
GGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGCGG
CTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCT
AGTAA

>BB39

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAATCG
ACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGA
ACATCCTGCGAATCCCTTGGAAACTTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGG
CACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTG
GCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAATTG

>BB40

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG
ACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTG
ACATCCTGCGAATCCTGGTGAAGCTGGGAGTGCCTTAGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GCCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGG
CACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAGAGGGCAGCGAGCCAGGGATGGCAAGCGAATCCAGAAACCGTAG
CTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCT
AGTAA

>BB42

CCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAATCGA
CCCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACG
CACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
GAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGA
CATCCTGCGAATCCCTTGGAAACTTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGTGA
CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGC
ACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTC
AAGTCATCATGCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTAC
GGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGG
CTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCT
AGTAA

>BB45

GGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACT
ACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCA
TAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGG

AGGAATCGCTAGTAAT

>BB46

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTATCG
ACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTAC
GCCCCGAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGACGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCTCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTA
GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAA

>BB47

CACCTGTAGTCCTACCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTATCG
ACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAATTGTCCCGCCTGGGAAGTAC
GCCCCGAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCCAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCATGCAACGCGAACAACCTTACCAAGGCTTG
ACATCCTGCGAATCCTGTTTAATGTGCGGAGTGCCTTCCGTAGCGCAAAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGACGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCTCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCTGCATTAAGATGGG
CACTCTACACAGACTGCCGGGGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACTCATACTACAATGCTA
CTGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCACAAACCGTA
GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAA

>BB48

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGCGTCGGGGGAATCG
ACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTG
ACATCCTGCGAATCTTTTGGAAACAGAAGAGTGCCTTCGGGAACGCAGTG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGG
CACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCAAGCAAATCCCATAAACCGTG
GCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAAT

>BB49

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAATCG
ACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTG
ACATCCTGCGAATCCCTTGGAAACTTGGAAAGTGCCTTCGGGAGCGCAGTG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGG
TACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTG
GCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAAT

>BB50

ATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAA
TCGACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAG

TACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGC
GGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGT
TTGACATCCTGCGAATCCCTTGGAACTTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCA
GTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAGTT
GGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGA
CGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATG
CTACGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAAC
GTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAAT
CGCTAGTA

>BY51

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG
ACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTG
ACATCCTGCGAATTTTCTGAAAGGGAAAAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTGTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTA
GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAAT

>BY52

AGCGCAACCCACGTCGTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGA
GACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCAT
GCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGG
CAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAG
ATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAAT

>BY53

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG
ACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTG
ACATCCTGCGAATCCTGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTAGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTGTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCACAAAACCGT
AGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCG
CTAGTAA

>BY55

TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTAT
CGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGT
GCGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACT
TGACATCCTGCGAATTTTCTGAAAGGGAAAAGTGCCTTCGGGAGCGCAG
AGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
AAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTGTAGTTGCCAGCATTAAAGATG
GGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGAC
GTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGC
TACGGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCG
TAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATC
GCTAGTAA

>BY56

TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGCGTGGCACTGTA
TCGACCCCGTGCCGTGCCGGAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAG
TACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGC
GGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGC
TTGACATCCTGCGAATTTTCCTGAAAGGGAAAAGTGCCTTCGGGAGCGCA
GAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGT
CAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGAT
GGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGA
CGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATG
CTACGGACAAAGGGCGGCTACACCGCGATGTGATGCTAATCTCAGAAACC
GGAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAAT
CGCTAGTAAT

>BY57

TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGGGGGAAT
CGACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGAGT
ACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGT
TGACATCCTGCGAATCCCTTGGAACGAGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAG
TGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTG
GGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGAC
GTCAAGTCATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTAACAATGC
TACGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCG
TGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAAT

>BY58

TACCCCTGTAGTCCTAACCGTAAACGATGGAATCCCGCCGGGGCTTGTCT
CGACCCGAACCGTGCCTGAGCTAACGCGTTAGGTGTCCCGCCTGGGGAGT
ACGCACGCGGGTGTGAAACTCGCAGGAATTGAAGGGGGCCCCGCACAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAAACT
TGACATCCGGCGGATTTTCCTGAAAGGGAGAAGTGCCTTCGGGAGCGCAG
ACACAGGTGGAGCATGGCTGTCGTTCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGT
AATCCCCACAACCAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCGGGAAGGTGG
GCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGACGAACGAGAGGATGACG
TCCAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACATCCCAACTACCATGCT
ACGGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCTGATCTCAGAATCCGT
AGCTCATGTCTATCGAAGGCTGCTACTCGCCTTCTCGAAGGAGGAAT

>BY59

CCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCACGTATCGA
CCCGTGTGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACG
CTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTG
GAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGA
CATGTCTGGAATCTTGATGAAAGTTGAGAGTGCCTTAGGGAACCAGAACA
CAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTAAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGA
ACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGGTCG
GGACAACGGGCAGCAAATCCGCGAGGACAAGCGAATCCCAACAAACCCGG
CCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGAAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAAT

>BY60

TACCCCTGTTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGGGGGAA
TCGACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGAG
TACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGC
GGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGT
TTGACATCCTGCGAATCCCTTGGAACGAGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCA
GTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAGTT
GGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGCGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGA

CGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATG
CTACGGACAAAGAGCAGCGATCCCGCGAGGGCTAGCAAATCTCATAAAACC
GTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAAT

>BY61

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTATCG
ACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTAC
GCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGG
GACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTC
GGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGTAAACCCGG
CCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAAT

>BY62

TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTAT
CGACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGT
ACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACT
TGACATCCTGCGAATCCTGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAG
AGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTG
GGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGAC
GTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGC
TACGGACAGAGGGCAGCAAGCCAGGGATGGCAAGCGAATCCAGAAACCGT
AGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAAT

>BY63

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTCGGGGGAATCG
ACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTG
ACATCCTGCGAATCCCTTGAAACTTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGG
CACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTG
GCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAAT

>BY64

GCGCAACCCTCGTTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGGCACTCTAGAGAG
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCAGCATG
CCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGC
GGCAACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGA
TCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAAT

>BY65

ACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAATC
GACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGAGTA
CGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
TGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTT
GACATCCCGCGAACCCTGAGAAATCGGGGGGTGCCTTCGGGAACGCGGA
GACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGG
GCACTCTAGAAAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACG
TCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCT
ACGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGT

GGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAAT

>BY67

TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAACGATGAACCCTAGGCGTCGGGGGAAT
CGACCCCTCGGTGTGAAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGAGT
ACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCAGGGTT
TGACATCCTGCGA

>BY68

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGGTACTAGGCGTGGCTTGTATCG
ACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTG
ACATCCTGCGAATTTTCTGAAAGGGAAAAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGATGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCAAGCAAATCCCATAAACCGTG
GCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAAT

>BY69

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTAGCACGTATCG
ACCCGTGCTGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTG
ACATGTCTGGAATCTTGATGAAAGTTGAGAGTGCCTTAGGGAACCAGAAC
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGG
AACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTC
GGGACAACGGGCAGCAAATCCGCGAGGACAAGCGAATCCCAACAAACCCG
GCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGAAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCG
CTAGTAA

>BY70

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTATCG
ACCCGAGCTGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACATGTCACGAATCTATTGAAAGATGGAAGTGCCTTCGGGAACGTGAAC
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCTCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCACAAAACCGT
AGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAAT

>BS71

ATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTA
TCGACCCGAGCTGTGCCGTAGCTAACGCGTTATGTGTCCCGCCTGGGGAG
TACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGC
GGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGC
TTGACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCA
GAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTAGTTGCCAGCATTAAGT
TGGGGACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAAGAAAGTGGTGTGAA
TGAACTTCGAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTTAGGCTACACACGTACTA
CAATGGTCCGGAAACAGAAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTC
GTAAACTCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAA

>BS72

TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGCTGCACGTAT
CGACCCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGT
ACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAAGCT
CGACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAG
AGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGCTGCCAGCATTAAAGTTG
GGACTCTAGGGAGGCCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGAC
GTCAAGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGG
TCGGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGTAAACCC
GGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATC
GCTAGTAA

>BS73

TAGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCAC
GTATCGACCCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGG
GAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACA
ACCGGTGGAGTATGTGGTTTATTCGATCTGGCAGATAAGAACCGCTAGCC
ACACGCATAAACCCAGCGAGAGTTTCGGGATGGGGTCAACTGCCTTCGGG
AGAACAAGAGACAGGTGAGGCCAGGCACCTCACCCCTCCTTTTGTATGTG
ATATTGTGATAATGCGCGCAACAAACGCAACCCCGTCTTTAGCCGCCCG
CAATGAGAGATAGGACACTCTAGCGAGACTGCCCGTGACAAACCGGACGA
AACGCGACACATGACTGAAACGGGACGATGCACCACTTACCTCTCTGGGC
TACATCACGAACTACAACCTGCTGCA

>BS74

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG
ACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTG
ACATCCTGCGAATTTTCTGAAAGGGGAAAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTTTTGTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCGGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTA
GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAA

>BS75

TACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGCTCGTAT
CGACCCGAGCAGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGT
ACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT
TGACATCCCCAGAATCCTCTTGAAGAGAGGAGTGCCTTAGGGAACTGGG
AGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTTTGTAGTTGCCAGCATTAAAGTTG
GGCACTCTAGAGAACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGACGAC
GTCAAGTCATCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGG
TCAGGACAACGGGCAGCGAGCGCAAGTGTAAGCGAATCCCATCAAACC
TGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAAT
CGTAGTAATTG

>BS76

TACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTGGCTTGTAT
CGACCCGAGCCGTACCGTAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGT
ACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT
TGACATGTCGCGAATCTCGACGAAAGTTGAGAGTGCCTTCGGGAACGCGA

ACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTG
GGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAGTCAGCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGC
TCCGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCGTAAACCG
GAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATC
GCTAGTAA

>BS77

CCCCGTGATGCTTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGCTGCACGTATCG
ACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGAAGTAT
GCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTG
ACATGATACGAATTTTTGTGAAAGCGAAAAGTGCCGTTTGGAACGTATAC
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTTTTAGTTGCCTTTTAAAGAACTCT
AAAAAGACTGCTGGTTATAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTC
AGCATGCCCTTACACCCTGGGCTACACACGTGCTACATTGGGCGAGACA
ATTAGAAGCAAATCTGCGAAGACAAGCTAATCTGTAAACTCGCTCTAGGT
TCAGATTGCAAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAAT
TG

>BS78

TACCCAGGTTAGTCTTAGCTGTAAACAATGGATACTAGATGTTGAACAG
ATCGACCTGTGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGAA
GTATGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGG
TTTGACATGATACGAATTTCTTTGAAAGAAGAAAGTGCCGTTTGGAGCGT
ATACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTTTTAGTTGCCTTTTATGGAA
CTCTAAAAGACTGCTGGTTATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCAGCATGCCCTTACACCCTGGGCTACACACGTGCTACATTGGACGA
GACAATGAGATGCAAACCTGTGAAGGCTAGCTAATCTATAAACTCGTTCT
AAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGGAGGAATCGCTAG

>BS80

ATACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTA
TCGACCCGAGCTGTGCCATAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAG
TACGCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGTGGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGC
TTGACATGTCACGAATTTCTGTTGAAAGAAGAAAGTGCCGTTTGGAGCGTA
TACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTTTTAGTTGCCTTTTATGGAGC
TCTAAAAGACCCGCTGGTTATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCAGCATGCCCTTACACCCTGGGCTACACACGTGCTACATTGGACGAG
ACAATGAGATGCAAACCTGTGAAGGCTAGCTAATCTATAAACTCGTTCTA
AGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGGAGGAATCGCTAGT
AA

>BS81

CTCCACCGTCAGCCTCCATAGTAGCTAGGACTACTGGGGTAAGTGCCTT
CGGGAGCGTGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGT
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCA
GCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACG
TACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAAT
CTCATAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTG
AAGGAGGAATCGCTAGTAA

>BS82

ATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTA
TCGACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAG
TACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGTCCGCACAAGC
GGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGC
TTGACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCA
GAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT
GGGACTCTAGGGAAACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGA
CGTCAAGTCATCATGCCCCTTTCGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATG
GTCGGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGTAAACC
CGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAAT
CGCTAGTA

>BS83

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTCGTATCG
ACCCGAGCTGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCAGGCAACTGTGAAACTCAAAGGAACTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGGAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACACGTCACGAATCCTGTGGAACATAGGAGTGCCTTCGGGAGCGTGAAC
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGATGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCGAATCTCATAAACCGTA
GCTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACCCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAATTG

>BS84

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCG
ACCCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTG
ACATCCTGCGAATCCTGGTGAAGCTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGGTGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGG
CACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGGATGACGT
CAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAGAGGGCAGCAAGCCAGGGATGGCAAGCGAATCCAGAAACCGTAG
CTCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCT
AGTAA

>BS85

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTATCG
ACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTAC
GCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGG
GACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTC
GGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGTAAACCC
GGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAA
TCGCTAGTAATTGC

>BS86

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGGGGGAATCG
ACCCCTCGGTGTGCTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTAC
GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTG
ACATCCTGCGAATCTCTTGGAAACGAGAGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGTG

ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGG
CACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTG
GCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGC
TAGTAATTG

>BS87

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTATCG
ACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTAC
GCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGCTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGG
GACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGT
CAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTC
GGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGTAAACCCGG
CCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGC
TAGTAATTG

>BS88

CCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGAGACACTAGGTGTTGCACGTATC
GACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTA
CGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG
TGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
GACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGA
GACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGG
GGACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACG
TCAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGT
CGGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGTAAACCCG
GCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCG
CTAGTAA

>BS90

ATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTA
TCGACCCGTGCAGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAG
TACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGC
TTGACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAGTCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCA
GAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTT
GGGACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGA
CGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATG
GTCGGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGCAAGCTAATCTCGTAAACC
CGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAAT
CGCTAGTAA

ÖZGEÇMİŞ

Merve SAĞLAM, Samsun'da doğdu. Samsun Huriye Süer Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2018 yılında mezun oldu. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen ve Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans eğitimini 28/05/2018 tarihinde 3,74 ortalama ile tamamladı. Mezuniyetinden bu yana biyolog olarak görev yapmakta ve orta seviye İngilizce bilmektedir.

İletişim Bilgileri

Öğrenci No : 18210058

ORCID ID : <https://orcid.org/0000-0001-9489-5228>

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. T.C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen ve Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölüm Birinciliği

