

Salda Gölü Prokaryotik Çeşitliliğinin Yeni Nesil Dizileme Yöntemiyle Belirlenmesi

Nilgün POYRAZ¹, Mehmet Burçin MUTLU¹

ÖZET: Çalışmada Salda Gölü'nden örnekleme yapılmış ve örnek için pH ve tuzluluk değerleri belirlenmiştir. Sonrasında örnekler filtreden geçirilerek, bu filtrelerden DNA ekstraksiyonu işlemi yapılmıştır. Elde edilen DNA Illumina MiSeq dizileme sistemiyle dizilenmiş ve veriler QIIME Programı ile analiz edilmiştir. Analiz sonrası elde edilen veriler değerlendirildiğinde en baskın bulunan Bacteria filumlarının Proteobacteria ve Actinobacteria olduğu belirlenmiştir. Sınıf düzeyinde ise Gammaproteobacteria, Acidimicrobia ve Actinobacteria baskındır. Ordo düzeyinde ise Enterobacteriales, Acidimicrobiales, Actinobacteriales baskındır. Archaea domaini değerlendirildiğinde ise Euryarchaeota filumunun baskın olduğu belirlenmiştir. Sınıf düzeyinde Halobacteria üyeleri baskındır. Halobacteria sınıfının Halobacteriales ordosu Halobacteriaceae familyasının *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halonotius*, *Halorhabdus*, *Halorubrum* ve *Haloplanus* cinsi üyeleri de baskın olarak bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Alkalifilik, prokaryotik çeşitlilik, Salda Gölü, yeni nesil dizileme

Determination Of Prokaryotic Diversity Of Salda Lake By Next Generation Sequencing Method

ABSTRACT: In our study, water sample was taken from Salda Lake and the pH and salinity data for the sample were determined. After that, samples were filtered and DNA extraction was performed. The obtained DNA was sequenced by the Illumina MiSeq sequencing system and data was analyzed by the QIIME program. When the data obtained after the analysis were evaluated, it was determined that the most dominant bacterial phyla are Proteobacteria and Actinobacteria. At class level, Gammaproteobacteria, Acidimicrobia and Actinobacteria were dominant. In order level Enterobacteriales, Acidimicrobiales, Actinobacteriales were abundant. When the Archaea domain was evaluated it was determined that the Euryarchaeota phylum was dominant. Halobacteria members were abundant at the class level. In addition Halobacteria class, Halobacteriales order, Halobacteriaceae family includes *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halonotius*, *Halorhabdus*, *Halorubrum* and *Haloplanus* genus members.

Keywords: Alkaliphilic, prokaryotic diversity, Salda Lake, next generation sequencing

¹ Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji, Eskişehir, Türkiye
Sorumlu yazar/Corresponding Author: Nilgün POYRAZ, nilgunpoyraz@anadolu.edu.tr

GİRİŞ

Aşırı alkalin ortamlar arasında doğal olarak oluşan soda gölleri, soda çölleri, topraklar ve yapay endüstriyel sular bulunmaktadır. Genellikle 10'un üzerinde, bazen de 12'ye ulaşan pH değerlerine sahiptirler ve büyük miktarda Na_2CO_3 varlığı ile karakterize edilirler (Duckworth et al., 1996; Grant, 2006). Soda gölleri, Dünya'da yaygın olan doğal alkalin ortamlardır ve yüksek pH, tuzluluk ve yüksek verimlilik oranlarına sahip olması nedeniyle diğer su ekosistemlerinden oldukça farklıdır (Dudhagara et al., 2015). Bununla birlikte, tüm soda gölleri yüksek oranda verimli değildir ve birincil üretimi kontrol eden kısıtlı besin toksisite veya trofik etkileşimler gibi birçok sınırlayıcı faktör bulunmaktadır. Ayrıca, tuzluluk, mikrobiyal çeşitliliği sınırlayan en güçlü stres faktörü olabilir. Buna rağmen, nötral tatlı su sistemleri ile karşılaştırıldığında mikrobiyal açıdan oldukça yüksek morfolojik çeşitlilik gözlemlenmiştir (Lanzen et al., 2013). Ancak bu tür ortamlarda prokaryotik çeşitlilik hakkında hala yeterli bilgi bulunmamaktadır. Soda göllerindeki mikroorganizmalar biyoteknolojik öneme sahip olmaları nedeniyle de oldukça ilgi çekmektedir (Dudhagara et al., 2015). Çünkü yüksek pH ve yüksek tuzluluk derecelerinde etkin olan enzimler üretme potansiyeline sahip gruplar içermektedir (Horikoshi, 2006).

Dünya'da pek çok soda gölü bulunmaktadır ve en çok çalışma yapılan alan, Kenya-Tanzanya Rift Vadisi'dir. Doğu Afrika boyunca uzanan Büyük Rift Vadisi, tektonik faaliyetin bir dizi sığ depresyon yarattığı kurak bir tropikal bölgedir (Grant and Sorokin, 2011). Doğu Afrika Rift vadisinde soda göllerinde gerçekleştirilen kültür bağımlı ve bağımsız çalışmalar sonucu pek çok mikroorganizma izole edilmiştir ve bunların aerobik, heterotrofik ve (halo) alkalifilik Bacteria ve Archaea'lar olduğu belirlenmiştir (Duckworth et al., 1996). Diğer göller üzerine de yapılan pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar Mono Gölü'ndeki bakteriyel çeşitlilik çalışmaları (Humayoun et al., 2003), metanotrofik bakterilerin yapısal gen temelli çeşitlilik analizi (Lin et al., 2005), Soap Gölü'nde kültür bağımlı ve kültür bağımsız yöntemlerle analiz (Asao et al., 2011) ve belli alkalifilik mikroorganizmaların çeşitliliğinin 16S rRNA ve fonksiyonel genler kullanılarak araştırılması üzerinedir (Sorokin and Kuenen 2005; Antony et al., 2012; Tourova et al., 2014).

Ülkemiz de sodalı göller açısından büyük bir potansiyele sahiptir ve bu sodalı göllerden en büyüğü Van Gölü'dür. Bu göl tuzlu bir sodalı göldür ve aynı zamanda kapalı bir havza gölüdür (Reimer et al., 2009). Van gölü mikrobiyal çeşitliliği üzerine de kültür bağımlı ve kültür bağımsız yöntemlerle gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur (López-García et al., 2005; Kavak, 2013). Ülkemizdeki önemli soda göllerinden bir diğeri ise çalışmamızda örnekleme yapılan Salda Gölü'dür. Türkiye'nin güneyinde Göller Bölgesi'nde bulunan derin ve soda içeren bir göldür. Fiziksel ve kimyasal parametreler gölün, tabanında bulunan yeraltı kaynakları tarafından oluşturulan hidrokimyasal olarak farklı su tabakalarından oluştuğunu göstermektedir (Kazancı ve ark., 2004). Salda Gölü'nün suları, magnezyum bakımından zengindir ve yüksek derecede alkalin ($\text{pH} > 9$) 'dir. Gölün üç tarafı serpantinler, dördüncü tarafı ise dolomit ile çevrelenmiştir. Gölün içine giren suyun büyük kısmı meteoriktir ve havzalar gölün ötesine geçen geniş çakıllı alüvyon yelpaze deltaları (çoğunlukla serpantin çakıl taşları ile) üzerinden beslenir. Bu sular, gölün yüzey sularından çok daha soğuktur. Magnezyumun ise çakıllardan süzülmesi olduğu düşünülmektedir (Braithwaite and Zedef, 1996). Bu gölün mikrobiyal çeşitliliği üzerine çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Var olan çalışmaların bir kısmı geleneksel yöntemlere ve spesifik grupların analizine özellikle de Archaea izolasyon ve çeşitliliğine dayanmaktadır (Özcan ve ark., 2006 ; Özcan ve ark., 2007). Yapılan bir başka çalışmada ise ilk kez yeni nesil dizileme teknikleri kullanılarak Acıgöl, Salda Gölü ve Yarışlı Gölü'nün prokaryotik çeşitliliği analiz edilerek değerlendirilmiştir (Demirel ve ark., 2016). Yeni nesil dizileme yönteminin ortaya çıkmasıyla birlikte, doğrudan metagenomik yaklaşımlar, nispeten düşük çeşitlilik gösteren mikrobiyal toplulukları barındıran çevrelere başarıyla uygulanmaktadır. Yüksek verimlilikteki amplikon dizilemesi gibi yeni nesil 'omik' teknolojileri, milyarlarca dizinin elde edilmesine olanak tanır ve istatistiksel yöntemlerin uygulanması, bir sistemdeki sayısız baskın ve nadir bulunan organizmaların saptanmasını sağlar (Green et al., 2008; Bent and Forney, 2008; DeLong 2009, Gonzalez et al., 2012). Bu yüzden bu çalışmada da yeni nesil dizileme yöntemi kullanılmıştır ve çalışmanın temel amacı, Salda Gölü'nün mikrobiyal çeşitliliğinin, yüksek verimli 16S rRNA gen amplikon

dizilimi ile belirlenmesi ve gölün mikrobiyal çeşitliliği üzerine kültür bağımsız bir yaklaşım ile elde edilmiş verilerin sağlanmasıdır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Örnekleme ve fizikokimyasal analiz

Çalışmalarda kullanılmak üzere 10 litre su örneği Salda Gölü kıyısına 1-2 metre uzaklıktan ve 1 metre kadar derinlikten alınmıştır. Örneğin toplam tuz konsantrasyonu el refraktometresi (Eclipse) ile belirlenmiştir. Örneğin pH değeri ise pH metre ile ölçülmüştür. (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland).

Nükleik asit ekstraksiyonu

Metagenomik analiz için, 500 ml su numunesi 0.22 um por çaplı polikarbonat filtreler (Millipore, Isopore GTTP04700) ile filtrelenmiş ve -20 °C derecede saklanmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı DNA, klasik fenol / kloroform yöntemi ile ekstrakte edilmiş ve izopropanol ile çöktürülmüştür (Nogales et al., 1999; Cifuentes et al., 2000). Yöntemin detayları Mutlu ve ark., 2008’ de belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

Dizileme ve veri analizi

Su örneğinden elde edilen yüksek kalitedeki DNA, analiz için Argonne Ulusal Laboratuvarı’na (Argonne National Laboratory, Chicago, A.B.D) gönderilmiştir. Elde edilen DNA, 16S rRNA’nın V4 bölgesi için spesifik primerler (515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' ve 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')) kullanılarak mikrobiyal çeşitliliğin araştırılması için kullanılmıştır. Örnekler üç paralel olacak şekilde, 25 mikrolitrelik amplifikasyon reaksiyonları kurulmuştur. Genomik DNA amplifikasyonu için “Earth Microbiome Project” de önerilen protokollere uygun barkod primer seti Illumina MiSeq cihazına adapte edilmiş olarak kullanılmıştır (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/>). 16S rRNA’nın V4 bölgesine özgü primerler aynı zamanda “Illumina flow cell” adaptor dizilerini içerecek şekilde uygulanmıştır (Caporaso et al., 2010a; b; 2011; 2012). Her 25 mikrolitrelik reaksiyon; 12 ml su, 10 ml HotMaster miks, 1 ml ileri primer (5 mM konsantrasyon, 200 pM son konsantrasyon), 1 ml barkod etiketli geri primer (5 mM konsantrasyon, 200 pM son konsantrasyon) ve 1

ml kalıp DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonları için; 94 °C 3 dakika denatürasyon işlemi sonrası 94 °C’de 45 saniye, 50 °C’de 1 dakika ve 72 °C’de 90 saniye olmak üzere 35 döngü ve son uzama için 72 °C’de 10 dakika şeklinde uygulama yapılmıştır. Yaklaşık 240 ng PZR ürünü tek bir tüpte toplandıktan sonra “MoBio UltraClean PCR Clean-Up” kiti talimatlarına uygun olarak saflaştırılmıştır. A260/280 oranı 1.8-2.0 aralığında olmasına özen gösterilerek dizilemeye alınmıştır (Caporaso et al., 2012). Amplikon kütüphaneleri 2 nM düzeyinde dilüye edilip denature edildikten sonra 6.1 pM son konsantrasyonunda MiSeq cihazı ile üretici firmanın önerdiği protokol kullanılarak dizileme işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen verilerin analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla da QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) programından yararlanılmıştır. Program Linux veya Mac OS X işletim sistemi ile çalışmaktadır. Program kurulumu sonrası komutlar kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. İleri ve geri amplikonlar «fastq-join» kullanılarak kontiglerde toplanmıştır. Çıktı dosyası (.fastq), barkod dosyası (.fastq) ve haritalama dosyası-mapping file (.txt) birlikte işlenmiş ve veri kitaplıkları (split_libraries_fastq.py) oluşturulmuştur (Caporaso et al., 2012). Sonrasında kaliteli filtrelenmiş okumalar pick_open_reference_otus.py komutu verilerek %97 ve üzeri benzerlikte Operasyonel taksonomik birimler (Operational taxonomic unit-OTU’ lar) gruplandırılmıştır. Kimera kontrolü ve OTU seçimi için QIIME komutlarından “pick_OTUs.py” kullanılmıştır. Bu komut ile %97 benzerlik gösteren OTU seçimi yapılmakta ve bununla birlikte “de novo” kimera tespiti ise USEARCH (Edgar, 2010) algoritması ile sağlanmaktadır. Bu komut ile HDF5 formatında OTU tablosu içeren bir BIOM dosyası oluşturulmaktadır. Örnek spesifik OTU tablosu oluşturulduktan sonra “singleton” ların filtrelenmesi için QIIME komutlarından biri olan “filter_otus_from_otu_table.py” kullanılmıştır. Bu işlemlerin ardından çeşitlilik analizleri gerçekleştirilmiştir.

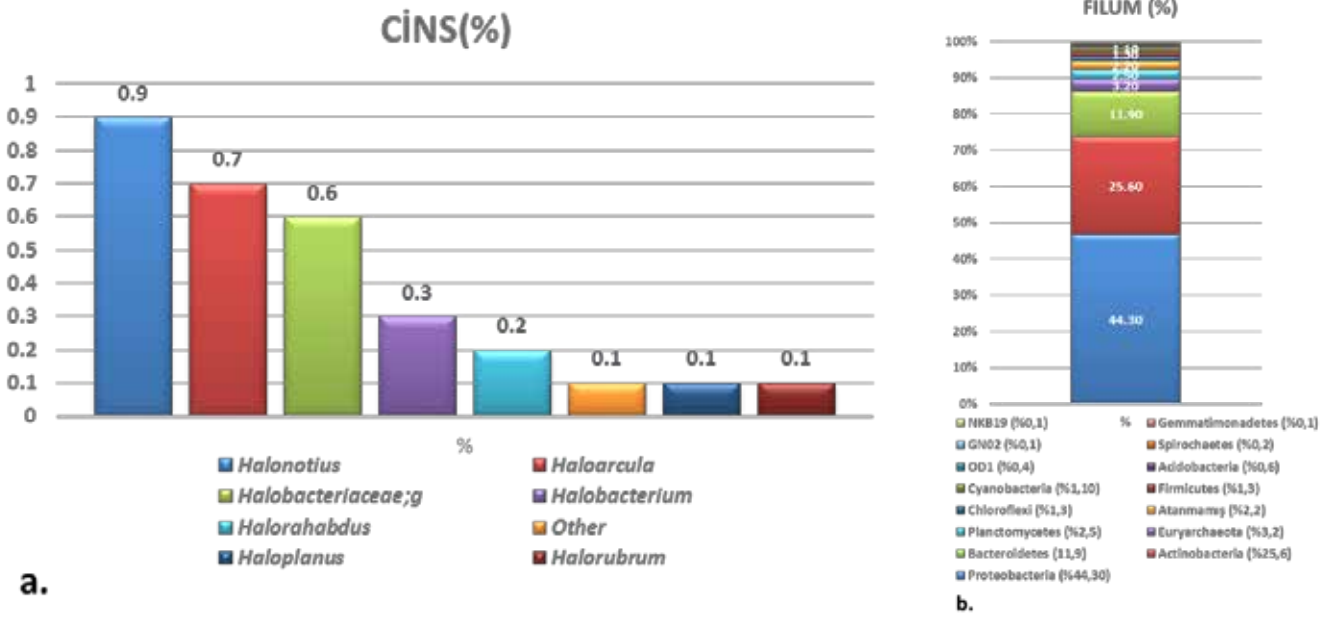
BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmanın sonucuna göre Salda Gölü’nün mikrobiyal çeşitliliği son derece yüksektir. Burada farklı fonksiyonel rollere sahip organizmalar bulunmaktadır. Çalışma kapsamında örneğin toplam tuz konsantrasyonu

% 1.1, pH değeri ise 9.2 olarak ölçülmüş ve örneğin pH değerinin alkalın olduğu belirlenmiştir. Yapılan çeşitlilik analizi sonrası ise yüksek kalitede 36879 adet kaliteli okuma dizisi elde edilmiştir.

Elde edilen OTU'lar analiz edildiğinde komünitenin % 3.2 sini Archaea domaini üyeleri, % 94.4' ünü de Bacteria domaini üyeleri oluşturduğu belirlenmiştir.

Archaea domaini üyeleri incelendiğinde tümü Euryarchaeota filumunun Halobacteriaceae sınıfının Halobacteriales ordosunun Halobacteriaceae familyasına aittir. Cins düzeyinde değerlendirildiğinde ise şekil 1a'da görüldüğü gibi % 0.9 *Halonotius*, % 0.7 *Haloarcula*, % 0.3 *Halobacterium*, % 0.2 *Halorhabdus*, % 0.1 *Halorubrum*, % 0.1 *Haloplanus*'tan oluşmaktadır.

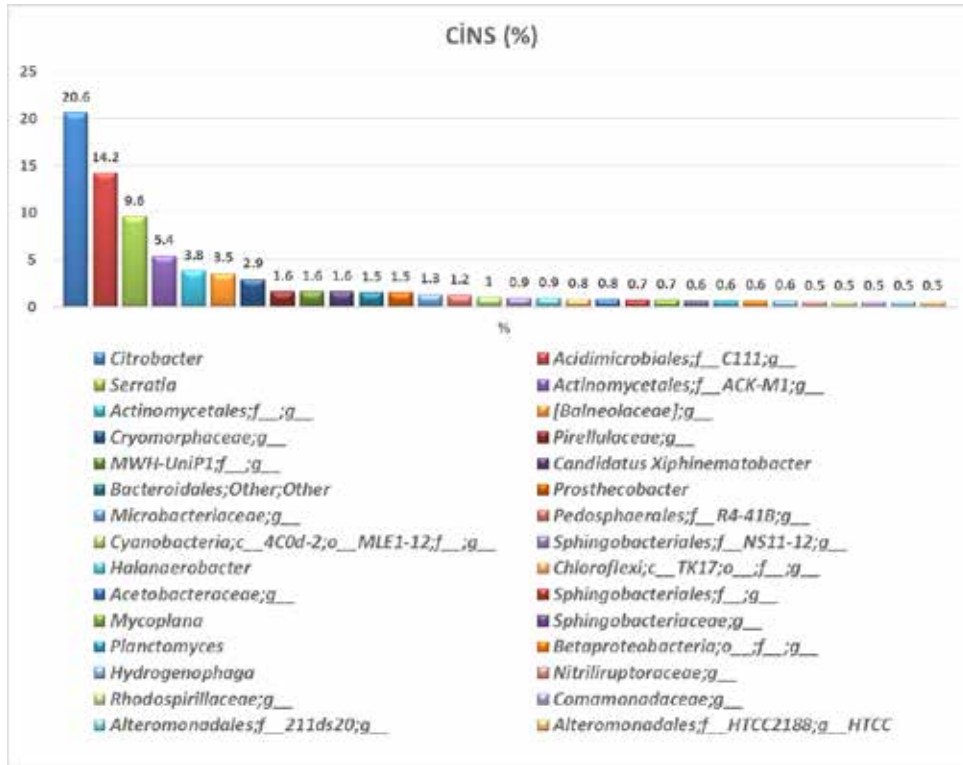


Şekil 1 a. Euryarchaeota filumunda yer alan cinsler

b. Kommünitedeki taksonomik filumlar

Bacteria domaini üyeleri incelendiğinde ise şekil 1b' de görüldüğü gibi toplamda 14 farklı filum üyesi belirlenmiştir. En baskın üç filum ise % 44.3 Proteobacteria, % 25.6 Actinobacteria ve % 11.9 Bacteroidetes üyeleridir. Sınıf düzeyinde değerlendirildiğinde Proteobacteria filumunun Gammaproteobacteria (% 33.3) sınıfı en baskın sınıftır. Bunu Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria ve Deltaproteobacteria izlemektedir. Actinobacteria filumu üyeleri içerisinde ise en baskın sınıf Acidimicrobia (% 14.6) ve Actinobacteria (% 10.5)'dır. Bacteroidetes filumu içerisinde ise Rhodothermii (% 3.8), Flavobacteria (% 2.9) ve Sphingobacteria

(% 2.2) baskındır. Ordo düzeyinde ise en baskın 3 ordo Enterobacteriales (% 30.3), Acidimicrobiales (% 14.6) ve Actinomycetales (% 10.5) ordolarıdır. Familya düzeyinde en baskın 3 familya Enterobacteriaceae (% 30.3) Acidimicrobiales ordosu-familya C111 grubu (% 14.2), Actinomycetales ordosu-familya ACK-M1 grubu (% 5.4) familyalarıdır. Cins düzeyinde ise *Citrobacter* (% 20.6), *Acidimicrobiales ordosu familya C111 içinde yer alan cinsler* (% 14.2) ve *Serratia* (% 9.5) cinsleri en baskın cinslerdir. Ancak örnekte pek çok farklı mikroorganizma cinsi bulunmaktadır. Diğer taksonomik gruplar Şekil 2'de detaylı bir şekilde verilmiştir.



Şekil 2. Bacteria domaininde yer alan cinsler

Sonuçlar değerlendirildiğinde Salda Gölü'ndeki en dominant grup bakterilerdir. Sınıf düzeyinde Gammaproteobacteria, Acidimicrobia, Actinobacteria son derece baskındır. Özellikle *Citrobacter*, *Serratia* ve Acimicrobiales ordosu C111 taksonomik grubu oldukça yoğundur. *Citrobacter* cinsi üyeleri çevresel sularda oldukça yaygındır. Suların dışında kanalizasyon, toprak ve gıda gibi ortamlardan da izole edilmiştir (Cabral, 2010). *Serratia* üyeleri ise bazı çalışmalarda rapor edilmiş olsa da soda göllerinde çok yaygın olmayan gruplardır (Belkova and Matyugina, 2014). Ancak *Serratia* türleri üzerine yapılmış çalışmalarda alkalitolerant oldukları ve alkaline ortamlardan izole edildikleri raporlanmıştır. Bu türlerin iyi proteaz üreticisi oldukları, alkaline demir (III) indirgeme reaksiyonu gerçekleştirmeleri gibi ekolojik özellikleri bulunmaktadır (Thorpe et al., 2012; Kumar et al., 2014). Diğer baskın grup C111 ise Urbach et al., 2001 tarafından rapor edilmiş bir aktinomiset taksonomik grubudur. Bu grup içerisinde tatlı sulardan izole edilmiş taksonomik kümeler yer almaktadır (Urbach et al., 2001; Zwart et al., 2002). Gölde bulunan diğer bakteri üyeleri ise Cryomorphaceae, Balneolaceae, Halobacteroidaceae, Pirellulaceae, Acetobacteraceae,

Comamonadaceae, Verrucomicrobiaceae ve Chthoniobacteraceae familyalarına ait üyelerdir. Bu üyelerin fonksiyonel özellikleri ve çeşitlilikleri son derece fazladır. Cryomorphaceae üyeleri denizel kökenlidir ve düşük tuzlu çevrelere adapte olmuşlardır (Bowman, 2014). Pirellulaceae amonyak okside eden bakterileri içermektedir ve süngerlerin bulunduğu ortamlardan izole edilirler (Kellogg et al., 2016). Acetobacteraceae familyasının tüm üyeleri aerobiktir ve etanolün asetik aside aerobik oksidasyonunu gerçekleştirir (Kerstens et al., 2006). Salda Gölü'ndeki Archaea domaini üyeleri ise Halobacteriaceae familyasına aittir. Bu grup büyüme için en az 1.5 M NaCl gerektirmektedir (Grant et al., 2001). Archaea domaini içinde *Halonotius* cinsi baskındır ve bu cinsin bilinen habitatları kristalizasyon havuzlarıdır (Burns et al., 2010). Üyelerin bir kısmı ise *Haloarcula* cinsine aittir. *Haloarcula* cinsi üyeleri daha önce de rapor edilmiştir (Jiang et al., 2006). Elde edilen veriler önceki çalışmalardan elde edilen verilerle karşılaştırılarak incelendiğinde bazı benzerlikler ve farklılıklar görülmektedir. Salda Gölü üzerine gerçekleştirilen önceki çalışmada % 39.6 Gammaproteobacteria üyeleri, % 25.6 Alphaproteobacteria üyeleri, % 23.7

Bacilli üyeleri, % 5.3 Cyanobacteria üyeleri, % 1.8 ise Actinobacteria üyeleri belirlenmiştir. Archaea üyeleri değerlendirildiğinde ise % 76.1 Methanobacteria, % 21.4 Halobacteria, % 1.4 Thaumarchaeota üyesi belirlenmiştir (Demirel ve ark., 2016). Kültür bağımlı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise tüm Archaea üyelerinin Halobacteriaceae familyasına ait olduğu belirlenmiştir (Özcan ve ark., 2007). Elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde Gammaproteobacteria (% 33.3) üyeleri baskın olarak belirlenmiştir. Bunu Acidimicrobia (% 14.6) ve Actinobacteria (% 10.5) izlemektedir. Archaea üyeleri değerlendirildiğinde ise çalışmamızdaki tüm üyelerin Euryarchaeota filumunun Halobacteriaceae sınıfının Halobacteriales ordosunun Halobacteriaceae familyasına ait olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar da diğer çalışmalarla büyük oranda örtüşmektedir. Ancak bazı grupların dağılımı ve bolluğu farklılık göstermektedir. Bu farklılığın da çalışmalarda örneklerin tuzluluk değerlerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü mikrobiyal aktiviteler ağırlıklı olarak enerjisel kısıtlamalara bağlı olarak tuzluluk tarafından kontrol edilir ve bu nedenle tuzluluk, mikrobiyal çeşitliliği ve bileşimini şekillendirmede baskın bir faktördür (Yang et al., 2016).

Yapılan diğer çeşitlilik çalışmalarında tuzlu soda göllerinde Bacteroidetes, Alfa ve Gammaproteobacteria üyelerinin baskın olduğu belirlenmiştir. Tuzluluğun yüksek olduğu yerlerde ise Euryarchaeota üyeleri baskındır (Vavourakis et al., 2016). 16S rRNA klon kütüphanesi temelli önceki kültür bağımsız çalışmalarda da tuzlu soda göllerinden Euryarchaeota rapor edilmiştir (Grant et al., 1999; Simachew et al., 2016). Duckworth et al., 1996'da, Doğu Afrika soda göllerinden Archaeae domaininden *Natronococcus*

ve *Natronobacterium*, Bacteria domaininden ise *Halomonas*, *Bacillus* ve *Arthrobacter* gibi alkalifilik bakterileri izole etmiştir. Archaea (Euryarchaeota) ile ilgili birkaç 16S rRNA gen dizisi, Kenya Magadi Gölü'ndeki alkalın tuzludan da belirlenmiştir (Grant et al., 1999). Çeşitli soda gölleri arasında, fotosentetik primer üreticiler gibi mikrobiyal çeşitlilik profillerinde bazı farklılıklar gözlemlenmesine rağmen, benzerlikler en göze çarpan özelliklerdir (Grant and Sorokin, 2011).

SONUÇ

Çalışmamızda ekstrem ortamlardan biri olan Salda Gölü'nün mikrobiyal çeşitliliği belirlenmiştir. Ayrıca çeşitliliğin belirlenmesi soda göllerindeki mikroorganizmaların biyoteknolojik potansiyellerinin değerlendirilmesine de olanak tanımaktadır. Soda gölleri, yüksek pH'da çalışan mikrobiyal enzimlerin de önemli kaynaklarıdır (Grant, 2010). Tarama yöntemleri ve dizileme teknolojisindeki son gelişmeler, salin ve alkalın göl ekosistemlerinden ticari olarak önemli enzimlerin ve biyomoleküllerin keşfedilmesine yol açabilir. Burada sunulan veriler Salda Gölü mikrobiyal topluluğunun büyük oranda halofilik Archaea ve Proteobacteria filumu, Gammaproteobacteria sınıfı ve Actinobacteria sınıfı tarafından oluşturulduğunu göstermektedir. Çalışmamız, Salda gölündeki prokaryotik çeşitliliğin karakterize edilmesine yönelik öncül çalışmalardan biri niteliğindedir ve yeni bakteri türlerini ve izolatları biyoteknolojik potansiyelleriyle tanımlamayı amaçlayan gelecek çalışmaları için temel oluşturarak, bu tip ekosistemlerin tanımlanmamış çeşitliliğe sahip olduğunu vurgulamıştır. Gelecekteki çalışmalarda ise gölün farklı derinlik ve lokasyonlarından örnekler alınarak analizlerin detaylandırılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Antony CP, Murrell JC, Shouche YS, 2012. Molecular diversity of methanogens and identification of *Methanolobus sp.* as active methylotrophic Archaea in Lonar crater lake sediments. FEMS microbiology ecology, 81(1): 43-51.
- Asao M, Pinkart HC, Madigan MT, 2011. Diversity of extremophilic purple phototrophic bacteria in Soap Lake, a Central Washington (USA) Soda Lake. Environmental microbiology, 13(8): 2146-2157.
- Belkova N and Matyugina E, 2014. Vertical distribution of bacteria in Doroninskoe lake (Zabaikalie, Russia): Paradigm of Dominance. Acta Geologica Sinica (English Edition), 88(1): 53-55.

- Bent SJ, and Forney LJ, 2008. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. The ISME journal, 2(7): 689-695.
- Bowman JP, 2014. The Family Cryomorpaceae. The Prokaryotes. Springer, Berlin Heidelberg. 1028p.
- Braithwaite CJR and Zedef V, 1996. Hydromagnesite stromatolites and sediments in an alkaline lake, Salda Golu, Turkey. Journal of Sedimentary Research, 66(5): 991-1002.
- Burns DG, Janssen PH, Itoh T, Kamekura M, Echigo A, and Dyal-Smith ML, 2010. *Halonotius pteroides gen. nov., sp. nov.*, an extremely halophilic archaeon recovered from a saltern crystallizer. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 60(5): 1196-1199.

- Cabral JP, 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International journal of environmental research and public health*, 7(10): 3657-3703.
- Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL and Knight R, 2010a. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, 26: 266–267.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. 2010b. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5): 335-336.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 : 4516-4522.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R, 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6(8): 1621-1624.
- Cifuentes A, Antón J, Benlloch S, Donnelly A, Herbert R A, and Rodríguez-Valera F, 2000. Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. *Applied and environmental microbiology*, 66(4): 1715-1719.
- DeLong EF, 2009. The microbial ocean from genomes to biomes. *Nature*, 459(7244): 200-206.
- Demirel C, Gül Karagüler N, Menekşe-Kiliç M, Akçer-Ön S, Haydar Gültekin A, Balci N, 2016. Prokaryotic diversity in the extreme lakes of Turkey, SW Anatolia, Turkey. EGU General Assembly Conference Abstracts, 17-22 April 2016, Vienna, Austria.
- Duckworth AW, Grant WD, Jones BE and Van Steenberg R, 1996. Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 19 (3): 181-191.
- Dudhagara P, Ghelani A, Patel R, Chaudhari R and Bhatt S, 2015. Bacterial tag encoded FLX titanium amplicon pyrosequencing (bTEFAP) based assessment of prokaryotic diversity in metagenome of Lonar soda lake, India. *Genomics data*, 4: 8-11.
- Edgar RC, 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26: 2460–2461.
- Gonzalez A, King A, Robeson II MS, Song S, Shade A, Metcalf JL and Knight R, 2012. Characterizing microbial communities through space and time. *Current opinion in biotechnology*, 23(3): 431-436.
- Grant WD, Kamekura M, Ventosa A, McGenity TJ, 2001. Order Halobacteriales. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer, New York, 722p.
- Grant S, Grant WD, Jones BE, Kato C, Li L, 1999. Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. *Extremophiles*, 3(2): 139-145.
- Grant WD and Heaphy S, 2010. Metagenomics and recovery of enzyme genes from alkaline saline environments. *Environmental technology*, 31(10): 1135-1143.
- Grant WD, 2006. Alkaline environments and biodiversity, in extremophiles. *Encyclopaedia of life support systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO: Oxford: Eolss Publishers.
- Grant WD and Sorokin DY, 2011. Distribution and diversity of soda lake alkaliphiles. *Extremophiles Handbook*, Springer, Tokyo. 1247p.
- Green JL, Bohannan BJ and Whitaker RJ, 2008. Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science*, 320(5879): 1039-1043.
- Horikoshi K, 2006. Alkaliphiles: genetic properties and applications of enzymes. Springer, New York. 256p.
- Humayoun SB, Bano N and Hollibaugh JT, 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Applied and environmental microbiology*, 69(2): 1030-1042.
- Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR and Fields MW, 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and environmental microbiology*, 72(6): 3832-3845.
- Kavak N, 2013. Van gölü prokaryotik çeşitliliğinin araştırılması. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 140s.
- Kazancı N, Girgin S, Dügel M, 2004. On the limnology of Salda Lake, a large and deep soda lake in southwestern Turkey: future management proposals. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 14(2): 151-162.
- Kellogg CA, Ross SW, and Brooke SD, 2016. Bacterial community diversity of the deep-sea octocoral *Paramuricea placomus*. *PeerJ*, 4: e2529.
- Kerstens K, Lisdiyanti P, Komagata K and Swings J, 2006. The family Acetobacteraceae: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. *The prokaryotes*, Springer New York. 1115p.
- Kumar Sanjeevi A, Palanisamy K and Prabhu Balasubramani G, 2014. Production Of Protease From Rice Mill Waste By *Serratia* Species. *International Journal of Advances in Interdisciplinary Research*, 1(2): 49-54
- Lanzen A, Simachew A, Gessesse A, Chmolewska D, Jonassen I, Øvreås L, 2013. Surprising prokaryotic and eukaryotic diversity, community structure and biogeography of Ethiopian soda lakes. *PLoS One*, 8(8): e72577.
- Lin JL, Joye SB, Scholten JC, Schäfer H, McDonald IR and Murrell JC, 2005. Analysis of methane monooxygenase genes in Mono Lake suggests that increased methane oxidation activity may correlate with a change in methanotroph community structure. *Applied and environmental microbiology*, 71(10): 6458-6462.
- López-García P, Kazmierczak J, Benzerara K, Kempe S, Guyot F, Moreira D, 2005. Bacterial diversity and carbonate precipitation in the giant microbialites from the highly alkaline Lake Van, Turkey. *Extremophiles*, 9(4): 263-274.
- Mutlu MB, Martínez-García M, Santos F, Peña A, Guven K and Antón J, 2008. Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey. *FEMS microbiology ecology*, 65(3): 474-483.
- Nogales B, Moore ER, Abraham WR and Timmis KN, 1999. Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environmental microbiology*, 1(3): 199-212.

- Özcan B, Cokmus C, Coleri A, Caliskan M, 2006. Characterization of extremely halophilic archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey. *Microbiology*, 75(6): 739-746.
- Özcan B, Özcengiz G, Coleri A, Çökmüş C, 2007. Diversity of halophilic Archaea from six hypersaline environments in Turkey. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 985-992.
- Reimer A, Landmann G, Kempe S, 2009. Lake Van, eastern Anatolia, hydrochemistry and history. *Aquatic Geochemistry*, 15(1-2): 195-222.
- Simachew A, Lanzén A, Gessesse A, Øvreås L, 2016. Prokaryotic community diversity along an increasing salt gradient in a soda ash concentration pond. *Microbial ecology*, 71(2): 326-338.
- Sorokin DY and Kuenen JG, 2005. Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes. *FEMS microbiology reviews*, 29(4): 685-702.
- Thorpe CL, Morris K, Boothman C and Lloyd JR, 2012. Alkaline Fe (III) reduction by a novel alkali-tolerant *Serratia sp.* isolated from surface sediments close to Sellafield nuclear facility, UK. *FEMS microbiology letters*, 327(2): 87-92.
- Tourova TP, Grechnikova MA, Kuznetsov BB and Sorokin DY, 2014. Phylogenetic diversity of bacteria in soda lake stratified sediments. *Microbiology*, 83(6): 869-879.
- Urbach E, Vergin KL, Young L, Morse A, Larson GL, and Giovannoni SJ, 2001. Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic Crater Lake. *Limnology and Oceanography*, 46(3): 557-572.
- Vavourakis CD, Ghai R, Rodriguez-Valera F, Sorokin DY, Tringe SG, Hugenholtz P and Muyzer G, 2016. Metagenomic insights into the uncultured diversity and physiology of microbes in four hypersaline soda lake brines. *Frontiers in microbiology*, 7:211.
- Yang J, Ma LA, Jiang H, Wu G and Dong H, 2016. Salinity shapes microbial diversity and community structure in surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes. *Scientific reports*, 6:25078.
- Zwart G, Crump BC, Kamst-van Agterveld MP, Hagen F and Han SK, 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology*, 28(2): 141-155.