



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARKLI KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN BAKTERİ  
İZOLATLARININ METAGENOMİK ANALİZİ**

**Merve AÇIL**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ercan ARICAN**

**Ocak, 2022**

**İSTANBUL**

Bu çalışma, 31.05.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

### Tez Jürisi

Prof. Dr. Ercan ARICAN(Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER  
İstinye Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHAN  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

## **İntihal Programı Beyanı**

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

## **Proje Destekleri**

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 33858 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## **Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri**

--

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, tez aşamasında bana yol gösteren danışmanım **Prof. Dr. Ercan ARICAN'** a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında kullanılan bakteri izolat örneklerini bize sağlayan İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı (TEMA) Laboratuvarına ve yardımlarından dolayı İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü Başkanı **Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'** a teşekkür ederim.

Tezimin biyoinformatik analiz basamağında kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan **Dr. Öğr. Üyesi Kemal ŞANCI'** ya katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tezim boyunca yardımlarını esirgemeyen **Dr. Öğrencisi Neşe AKÇAY'** a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ocak 2022

Merve AÇIL

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ .....	ivv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	ix
ÖZET .....	x
SUMMARY .....	xii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR.....</b>	<b>5</b>
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>16</b>
3.1. Örneklerin DNA İzolasyonu Ve Miktar Tayini .....	16
3.2. DNA'ların 16s rRNA Geninin V3-V4 Bölgesinin PZR Yöntemi İle Çoğaltılması .....	17
3.3. Örneklerin Illumina Yeni Nesil Dizileme Yöntemi ile Dizilenmesi .....	20
3.4. Çoklu Okuma Sayılarını Biyolojik Örneklerle Atama .....	20
3.5. İşlevsel Taksonomik Birimlerin Atanması .....	22
3.6. Her OTU'yu Temsil Eden Dizin Belirlenmesi .....	22
3.7. Temsilci Dizin Taksonomik Ataması .....	22
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>24</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>33</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>43</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>52</b>
EK 1. BK117 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları .....	53
EK 2. BK96 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları .....	54

EK 3. BK93 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları .....	55
EK 4. BK85 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları .....	56
EK 5. BK56 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları .....	57
EK 6. M107 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları .....	58
EK 7. M126 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları .....	59
EK 8. M127 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları .....	60
EK 9. M083 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları .....	61
EK 10. C77 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları .....	62
EK 11. C80 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları .....	63
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>64</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 2-1: Bakteri Hücrelerinde Yer Alan Yapılar.....	5
Şekil 2.2: Bakterilerin morfolojik yapıları.....	6
Şekil 2.3: 16S rRNA genindeki korunmuş ve çok değişken bölgeler.....	11
Şekil 2.4: 16S rRNA geni 2D-3D yapısı.....	13
Şekil 2.5: OTU Klodgramı.....	14
Şekil 4.1: V3 ve V4 bölgesi PZR yöntemiyle çoğaltılan örneklerin elektrofez jel görüntüleri.....	25
Şekil 4.2: BK117 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	27
Şekil 4.3: BK96 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	28
Şekil 4.4: BK93 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	28
Şekil 4.5: BK85 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	29
Şekil 4.6: BK56 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	29
Şekil 4.7: M107 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	30
Şekil 4.8: M126 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	30
Şekil 4.9: M127 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	31
Şekil 4.10: M083 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	31
Şekil 4.11: C77 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	32
Şekil 4.12: C80 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	32

## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 2.1:</b> Yüksek değişken bölgeler ve gen içindeki pozisyonları.....	12
<b>Tablo 3.1:</b> Örneklerin alındığı noktalar ve izolatların kodları.....	16
<b>Tablo 3.2:</b> PZR için gerekli bileşenler.....	18
<b>Tablo 3.3:</b> PZR koşulları.....	19
<b>Tablo 3.4:</b> Agaroz jel elektroferezinde kullanılan çözeltiler.....	19
<b>Tablo3.5:</b> Örneklerle ait spesifik barkod dizileri.....	21
<b>Tablo 4.1:</b> DNA izolasyonu yapılan örneklerin konantrasyon değerleri.....	24
<b>Tablo 4.2:</b> Örneklerin barkod okuma sayısı.....	26
<b>Tablo 5.1. :</b> API 20E test sistemi kullanılarak belirlenen tür tayinleri.....	33

## SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ

### Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
∞	: Sonsuz
>	: Büyüktür

### Kısaltmalar

<b>API</b>	: Analytical Profile Index
<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>C</b>	: Sitozin
<b>Dk</b>	: Dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetra asetik asit
<b>EtBr</b>	: Etidyum bromür
<b>kb</b>	: Kilobaz
<b>km</b>	: Kilometre
<b>Mb</b>	: Mega baz
<b>mg</b>	: Miligram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>NGS(YND)</b>	: Yeni Nesil Dizileme
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>OTU</b>	: İşlevsel Taksonomik Birim
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>pH</b>	: Potansiyel Hidrojen
<b>rRNA</b>	: Ribozomal Ribonükleik Asit
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>QIIME</b>	: Quantitative Insights Into Microbial Ecology
<b>xg</b>	: Time gravity

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### FARKLI KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN BAKTERİ İZOLATLARININ METAGENOMİK ANALİZİ

Merve AÇIL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ercan ARICAN

Mikroorganizmalar, Dünya üzerinde en çok sayıda bulunan biyolojik varlıktır ve en büyük biyolojik ve genetik çeşitliliğini sağlar. Bu çok sayıda mikroorganizma, tüm yaşamı sürdüren enerji ve madde döngülerinde önemli rol oynarlar. Yakın geçmişe kadar bu geniş mikrobiyal dünya çoğunlukla klasik mikrobiyoloji ve kültüre bağlı yöntemlerle araştırılmıştır. Doğrudan çevreden izole edilen büyük rastgele nükleik asit dizileri örnekleri olan metagenomların üretilmesindeki son gelişmeler, mikrobiyal toplulukların bileşimi, yapısı ve işleyişinin kapsamlı portrelerini sunmaktadır. Metagenomik çalışmalar, bir organizmadaki toplam genetik materyalleri ve hücre fonksiyonlarının korunmasında kilit rol oynayan deoksiribonükleik asit ve riboz nükleik asit gibi tüm genetik materyalleri tanımlayan yeni ortaya çıkan bir alandır. Bu teknolojinin en iyi yanı, mikrobiyal toplulukların muazzam genetik çeşitliliğine anında öncülük etmek için çevresel mikrobiyologlara daha fazla esneklik sağlamasıdır.

Bu tez kapsamında İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı (TEMA) Laboratuvarı tarafından Küçükçekmece Gölü, Manyas Gölü ve Batı Karadeniz gibi farklı kaynaklardan alınarak oluşturulmuş bakteri izolatlarının metagenomik analizi yapılmıştır. TEMA Laboratuvarı tarafından ticari olarak mevcut API 20E test sistemi kullanılarak standart biyokimyasal yöntemlerle fenotipik olarak tanımlanan izolatlar, genotipik olarak, 16S bakteriyel rRNA geni, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edildi ve sekanslandı. PCR ürününün dizisi, SILVA ( Version 99) veri tabanındaki bilinen 16S rRNA gen dizileri ile çoklu dizi hizalaması ile karşılaştırıldı. Bu çalışma, klasik yöntemler kullanılarak

yapılan fenotipik tanımlamaların hatalara yol açabileceğini ve dolayısıyla daha güvenilir, ucuz ve hızlı tanımlama yöntemlerinden olan Metagenomik analizlerin önemini gösteren örnek bir çalışma olarak değerlendirilebilir.

Ocak 2022, 77 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** : 16S rRNA, metagenomik, mikroorganizma, mikrobiyoloji.



## **SUMMARY**

### **M.Sc. THESIS**

#### **METAGENOMIC ANALYSIS OF BACTERIAL ISOLATES OBTAINED FROM DIFFERENT SOURCES**

**Merve AÇIL**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Sciences**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Supervisor : Prof. Dr. Ercan ARICAN**

Microorganisms are the most abundant biological entities on Earth and provide the greatest biological and genetic diversity. These many microorganisms play an important role in the energy and matter cycles that sustain all life. Until recently, this vast microbial world has mostly been explored by classical microbiological and culture-dependent methods. Recent advances in generating metagenomes, which are large examples of random nucleic acid sequences isolated directly from the environment, provide comprehensive portraits of the composition, structure, and functioning of microbial communities. The metagenomic study is an emerging field that identifies the total genetic materials in an organism and all genetic materials such as deoxyribonucleic acid and ribose nucleic acid that play key roles in maintaining cellular functions. The best part of this technology is that it gives environmental microbiologists more flexibility to instantly lead to the enormous genetic variability of microbial communities.

In this thesis, metagenomic analysis of bacterial isolates obtained from different sources such as Küçükçekmece Lake, Manyas Lake and Western Black Sea Region was performed by Istanbul University Department of Biology, Department of Basic and Industrial Microbiology (TEMA) Laboratory. These isolates, which were phenotypically identified by standard biochemical methods using the commercially available API 20E test system by TEMA Laboratory, were genotypically amplified and sequenced with the 16S bacterial rRNA gene, polymerase chain reaction (PCR). The sequence of the PCR product was compared with known

16S rRNA gene sequences in the SILVA (Version 99) database by multiple sequence alignment. This study can be considered as an exemplary study showing the importance of metagenomic analysis, which is one of the more reliable, inexpensive and fast identification methods, and those phenotypic descriptions using classical methods can lead to errors.

January 2022, 77 pages.

**Keywords:** metagenomics, 16SrRNA, microorganism, microbiology.



## 1. GİRİŞ

Bakteriler, nükleer bir zardan yoksun, metabolik olarak aktif olan ve ikili bölünme ile bölünen tek hücreli mikroorganizmalardır (Baron, 1996). Bakteriler neredeyse aklınıza gelebilecek her yerde bulunabilir; tatlı, tuzlu sularda, toprakta, havada, hayvan ve bitkilerin içinde. Bakteriler bilinen en küçük canlı hücrelerdir. Şekillerine göre üç büyük gruba ayrılırlar. Küresel şeklindeki bakteriler coccus, çubuk şeklindeki bakteriler bacillus, sarmal şeklindeki bakteriler spirillum olarak adlandırılır. Türler üzerinde yapılan çalışmalarda doğru ve kesin sonuca ulaşabilmek adına numune ortamdan alındıktan sonra laboratuvarında izolasyon işlemi uygulanmaktadır. Bu işlem sonucu oluşturulan ortam izolat olarak tanımlanır. Daha geniş bir tanımlamayla izolatlar çeşitli doğal ortamlardan ya da karışık bir kültürden alınarak elde edilmiş saf mikroorganizmalardır. Hiç bilinmeyen bir izolatın tanımlanması ile belirli cins veya türün tanımlanması için farklı yöntemler kullanılır (Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri).

Dünya üzerinde canlılığın başlangıcına dair görüş birliğine varılamamış olsa da bu konuda yürütülen çok fazla çalışma vardır. Araştırmalar neticesinde dünya üzerinde var olan birçok canlı türü keşfedilmiştir. Tüm bu canlılar standart bir sınıflandırma ile tanımlanmaktadır ve bakteri âlemi de tüm türleri ile bu sınıflandırma sistemi kullanılarak adlandırılmaktadır. Bakterilerin büyük çoğunluğu henüz tanımlanamamıştır. Bakteri şubelerinin neredeyse yarısı laboratuvar ortamında kültürlenebilen türlerden oluşur. Mikrobiyolojinin alt dallarından biri olan bakteriyoloji bakterileri araştırır. Taksonomi sınıflandırma, isimlendirme ve tanımlama yaparak organizmaların çeşitliliğini belirleyip, farklılıklarını ortaya koyar. Tanımlama taksonominin uygulamasıdır. Organizmaların özelliklerini saptar kaydeder, hangi taksona ait olduklarını tayin eder. Bakteriler hiyerarşik sırada en büyükten en küçüğe doğru alem, bölüm, sınıf, takım, aile, cins, tür şeklindeki taksonomik birimlere yerleştirilir (Carlı, 2015).

Bakteriler ile ilgili ilk sınıflandırma girişimlerinin, 1773'de Alman bilim insanı Müller tarafından *Vibrio* ve *Monas* adlı iki bakteri genusunun tanımlanmasıyla başladığı söylenebilir (Asan, 1991). Küflerin fruktifikasyon yapılarını 1664 yılında rapor eden Robert Hook'tur ama bakterileri kendi yapmış olduğu mikroskopta ilk Anton Van Leeuwenhoek

tanımlamıştır. Van Leeuwenhoek'un gözlemleri diğer bilim insanları tarafından kabul görmesine rağmen, bu organizmaların yapısı ve öneminin anlaşılması gelişmiş mikroskopların yaygınlaşmasıyla ile mümkün olmuştur. Böylece mikrobiyal yaşam şekilleri daha fazla anlaşılır hale gelmiştir (Çökmüş, 2010).

Mikroorganizmaları uzun yıllardır standart bir şekilde sınıflandırma gereği hep var olmasına rağmen, sürekli yeni mikropların keşfedilmesi ve bunların birbirinden farklı özelliklere sahip olmaları nedeniyle yapılan sistematik sınıflandırmalar daima değişmekteydi. Bakterileri modern anlamda ilk sistematize eden kişi Buchanandır (1917). Daha sonra 1984-1986 yıllarında "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" adıyla taksonların tanımlanması ve tek tek isimlendirme için 4 ciltlik bir yayın çıkarılmıştır (Arda, 2000).

Tanımlamada genel olarak basit morfolojik analizler ve biyokimyasal testler uygulanmaktadır. Çok gelişmiş laboratuvarlarda ve bilimsel araştırmalara hizmet etmesi amacıyla faj tiplendirmesi ve genetik esaslı testler kullanılmaktadır. Her bakteri veya bakteri topluluğunun sadece kendisine has bir biyokimyasal özelliği bulunur. Kendine özgü enzimleri sayesinde bazı maddeleri kendine özgü yöntemlerle metabolize eder. Bunun sonucunda kendine özgü yapım ve yıkım ürünleri ortaya çıkararak ayırt edilmesini kolaylaştırır. Tanımlanmamış bir bakteriye, bazı biyokimyasal testler uygulanarak elde edilen veriler, Bergey's Manual gibi kaynaklarda bulunan listeler ile karşılaştırılarak tanımlanır (Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri).

Mikrobiyolojide geleneksel ve hızlı yöntemler temel iki yöntemdir. Geleneksel yöntemler altın standart olarak kabul edilse de hızlı yöntemler avantajları nedeniyle daha çok tercih edilmeye başlamıştır. Hızlı yöntemler, yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip, ucuz ve kısa sürede sonuç verebilirler. Hızlı minyatürize test kitlerinden birisi olan API 20E sistemi birden fazla bakteriyel taksonomik grubu tanımlama için tercih sebebidir. Bu yöntemin kullanıma amacı, çevresel bir örnekte bulunan bakteri, mantar, virüs gibi mikroorganizmaları tespit edip onlara ait metabolitlerin izolasyonunu, identifikasyonu yapıp bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını belirleyebilmektir (Aras, 2011). Geleneksel mikrobiyoloji teknikleri, bir çok mikrobu aynı anda kültürlemek için yetersiz gelmektedir. Bu nedenle tek seferde yalnızca tek mikrobu incelenebilmekteydi. Ayrıca, teknikler zaman alıcı ve kontaminasyona meyillidir. Bir bakteri veya mikrop kültürünün

incelenmesi 3 güne kadar sürebilmektedir. Bu nedenle, tek bir habitattan tüm mikrobiyal topluluğu klasik mikrobiyoloji yöntemlerini kullanarak incelemek zordur. Bu bağlamda hızlı ve toplu olarak tanımlama için başvurulan bilim metagenomiktir (Chauhan, 2020).

Metagenomik, önceden klonal kültürlerin yetiştirilmesine ihtiyaç duyulmadan bir çevresel örnek içinde bulunan genomların doğrudan genetik analizi olarak tanımlanabilir (Oulas ve diğ., 2015). Bu teknoloji ile mikrobiyal genom, örneğin doğasına ve mikrobiyal varlıkların bolluğuna bakılmaksızın doğrudan alınabilir (Dash, 2018). Metagenomik, saf kültürde hala erişemediğimiz organizmaların çoğuna erişmemizi sağlayan çok sayıda veri, araç, teknolojiyi bize sunmuştur (Thomas, 2015).

Son yıllarda bilimsel araştırmalar için oldukça önemli bir teknoloji olan yeni nesil DNA dizileme, genetik ve epigenetik olabilecek düzenleyici ağların, kromatin yapısı, nükleer yapılanması ve genom varyasyonları gibi bilgi akışını sağlamaktadır. Yeni nesil DNA dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukta ve yüksek hızda dizileme yapılabilmektedir. Bu yöntemle şimdiye kadar yapılmış hiçbir deneysel yöntem ile elde edilemeyecek derecede zengin ve özgün bilgiye sahip mikrobiyal genom dizisi elde edilir. Bu bilgi hazinesinin depolanması, analizi ve değerlendirmesi güçlü teknoloji gerektirir ve bu yeni nesil dizileme teknolojisinin başarılı bir şekilde kullanılabilmesi için gelişmiş biyoinformatik araçlar kullanılır. Dolayısıyla metagenomik, mikrobiyoloji, genom bilimi ve biyoinformatik alanlarını birbiriyle buluşturan disiplinler arası bir daldır (Üstek, 2011).

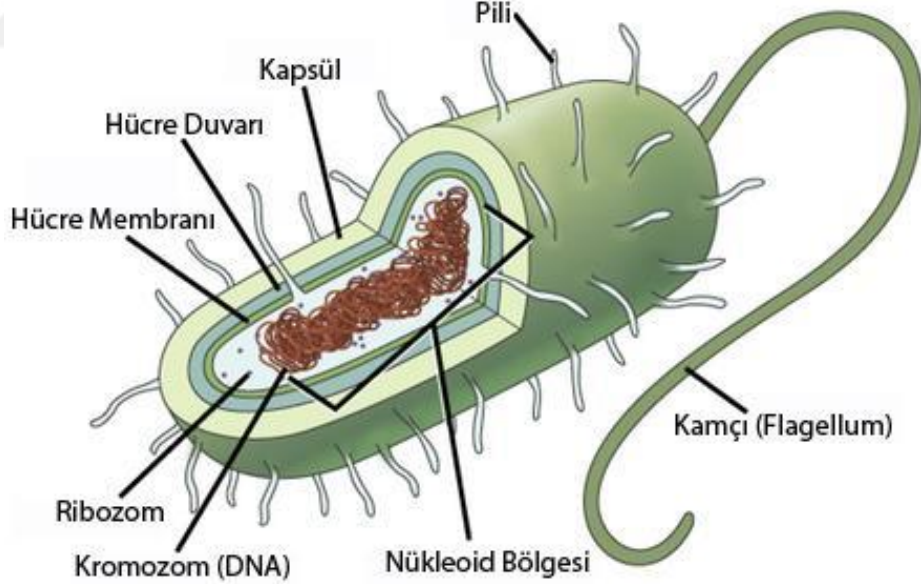
Metagenomik, Sanger dizileme yöntemini baz alarak başlamıştır. Bu dizilemede 1.5 kb uzunluğundaki 16S rRNA genini hedef alınır. 16S rRNA geni, bakteriler arasındaki filogenetik ilişkileri belirleyici özelliktedir (Kolbert ve Persing, 1999). Bu dizi 9 korunmuş C1-C9 bölgelerinden ve 9 çok değişken V1-V9 bölgelerinden oluşmaktadır (Petrosino ve diğ., 2009). Bir çok metagenomik çalışmalarda dizileme için çok değişken bölgeler hedef alınırken, dizilemede ise Illumina tercih edilmektedir (Alves ve diğ., 2018). Metagenomik çalışmalarda Illumina tercih edilmesinin sebebi olarak hedef DNA dizisinin boyutu, çevresel örneklerden alınan mikroorganizmaların çeşidi ve miktarının fazla olması gösterilebilir (Culligan ve diğ., 2014). Verilerin analizi için genellikle QIIME programı kullanılmaktadır (Oulas ve diğ., 2015). QIIME ile DNA dizilerinin kalite kontrolü yapılır ve dizilere ait işlevsel taksonomik birimler (OTU) saptanır. Böylece taksonomik çeşitlilik için veriler elde edilmiş olur (Kuczynski ve diğ., 2011).

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı (TEMA) Laboratuvarı tarafından Küçükçekmece Gölü, Manyas Gölü ve Batı Karadeniz gibi farklı kaynaklardan alınarak oluşturulmuş bakteri izolatlarının metagenomik analizi yapılmıştır. Alınan örneklerin bir kısmı TEMA Laboratuvarı tarafından API 20E Test Sistemi ile tanımlanmışken bir kısmı herhangi bir tanımlama işlemine tabi tutulmamıştır. Örneklerin, DNA izolasyonu yapıp, 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgelerini çoğaltılması, Illumina ile dizilenmesi, dizileme sonucunda QIIME programı kullanılarak yapılan metagenomik analiz ile OTU'ların belirlenmesi ve böylece taksonomik analizin incelenmesi ve mikroorganizma çeşitliliğinin ortaya konması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL KISIMLAR

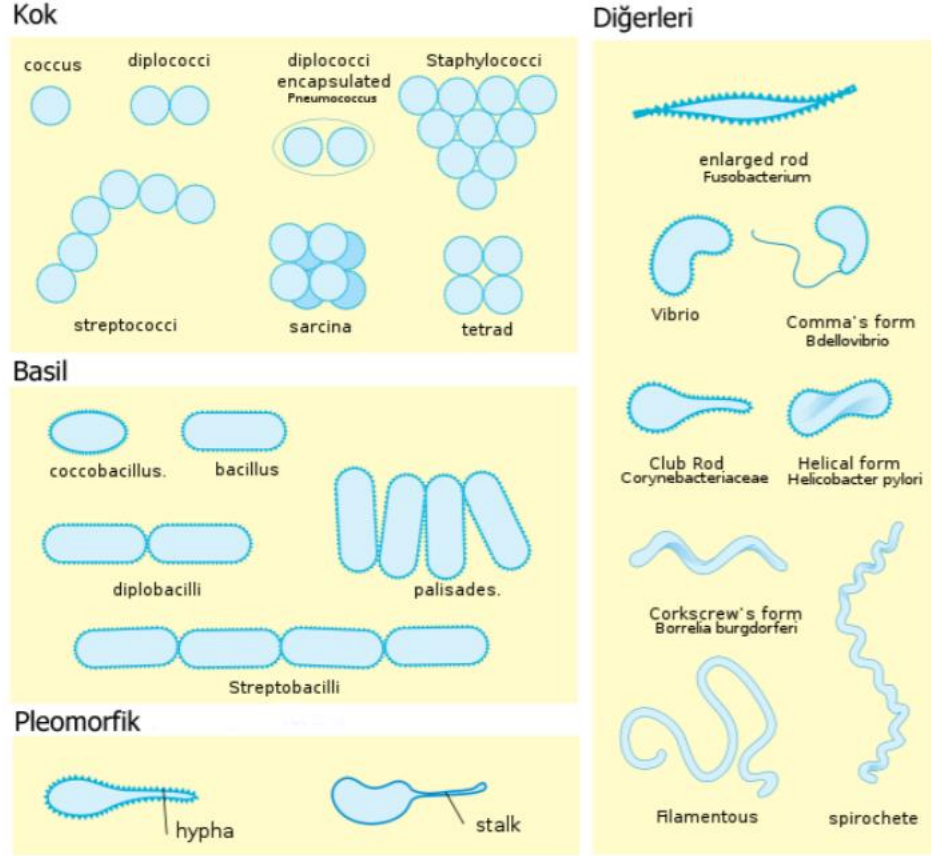
Mikroorganizmalar, çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük ve tek hücreye sahiptir. Bu tek hücreden oluşan canlılar çoğalıp kolonileri oluştururlar. Bu koloni toplulukları çıplak gözle görülebilir. Dünyada altı milyon çeşit mikroorganizma olduğu düşünülmektedir. Bu mikroorganizmaların yaklaşık % 5'i tanımlanabilmiştir. Mikroorganizmaların keşfedilmesiyle bitki ve hayvanlar olarak ayrılan canlı grubuna 1866'da Haeckel'in yaptığı çalışmalarla üçüncü bir alem olan protistalar da eklenmiştir. Protistalar algler, mantarlar, protozoonlar, ve bakterileri kapsar. Protistalar, hücre yapısına bakıldığında ikiye ayrılır. Ökaryotik hücreler bitki ve memeli hücrelerini andırıken, prokaryotik hücreler daha ilkel yapıdadır. Bakteriler prokaryot hücre yapısında, doğada yaygın olarak bulunan ve canlılarda bir çok hastalığın sebebi olabilen mikroorganizma türüdür. Bakteri hücresi genel olarak Şekil 2.1'de görüldüğü gibi çekirdek, sitoplazma, hücre zarı ve hücre çeperinden oluşmaktadır. Bakteri hücreleri kapsüle, kirpiğe ve pilusa sahip olabilirler, spor oluşturabilir (T.C. MEB Yayıncılık Hayvan Sağlığı, 2015).



Şekil 2.1: Bakteri Hücrelerinde Yer Alan Yapılar (S. Thenmozhi ve diğ.,2014).

Bakteriler basit ışık mikroskopları ile bile görülebilen, kolay boyanabilen, üretilebilen canlılar olmasının yanında yapı, organel, enzim, toksin ve genetik özellikleri iyi bilinen mikroorganizmalardır. Bu sayede oldukça geniş bir araştırma imkanı sunmakla beraber en

iyi bilinen mikroorganizma grubunu oluşturmaktadır. Bakteriler, morfolojisi oldukça geniştir. Şekil ve boyutları bakımından çeşitlilik gösterir. Bakteriler morfolojik yapıları bakımından kok, basil, spiral ve pleomorfik olarak 4 çeşittir. Basil bakteriler tek-çift veya uzun-kısa zincirler oluşturarak çeşitlilik gösterir (Şekil 2.2) (T.C. MEB Yayıncılık Hayvan Sağlığı, 2015).



**Şekil 2.2:** Bakterilerin morfolojik yapıları.

Bakteriler, okyanus suları içinde, yüksek derinliklerde ve hidrostatik basınç altında kolayca yaşayabilirler (Arda, 2000). Bakterilerin sınıflandırılması biliminde bakteri taksonomisi denir. Sınıflandırma, bakterilerin karşılıklı benzerlikleri veya evrimsel ilişkileri temelinde gruplara veya taksonlara (tekil, takson) düzenlenmesini ifade eder. Adlandırma, yayınlanmış kurallara göre taksonomik gruplara adların atanması ile ilgili disiplindir. Tanımlama, belirli bir izolatin tanınmış bir taksona ait olduğunu belirleme süreci olan taksonominin pratik yönünü temsil eder (Garg, 2016).

Taksonomi, şaşırtıcı bakteri çeşitliliğinin, karşılıklı benzerlikleri veya evrimsel akrabalıkları temelinde gruplara veya taksonlara sınıflandırılmasına ve düzenlenmesine yardımcı olur. Taksonomide bir bakteri küçük ama homojen bir grubun içine bir sıra veya seviyede yerleştirilir. Bu rütbenin veya seviyenin grupları, daha yüksek bir rütbe veya seviye grubu oluşturarak birleşir. Bakteriyel taksonomide, artan sıralarına göre en yaygın kullanılan sıralar veya seviyeler şunlardır: tür, cins, aile, takım, sınıflar, bölüm ve alem. Türler, bakteri taksonomisindeki temel taksonomik gruptur (Ashwathi, 2016).

Pennsylvania Üniversitesi'nden David Bergeys, 1923'te bakteri türlerinin tanımlanması için bir el kitabı yayımlanmıştır ve buna Bergey'in Belirleyici Bakterioloji El Kitabı adını verilmiştir. Bakterileri sadece morfolojik karaktere göre sınıflandırır ve filogenetik karakter içermez. Bergey'in Sistemik Bakterioloji El Kitabı'nın ilk baskısı 1984-1989'da yayımlandı. 2001-2012'de yayımlanan ikinci baskı beş cilt ve 1000' e yakın yazarın katkılarından oluşmuştur. Bu Kılavuzlar, prokaryotik grupların taksonomisi, sistematigi, fizyolojisi, ekolojisi ve habitatları hakkında kapsamlı tanımlayıcı bilgilerin yanı sıra prokaryotların evrimsel geçmişlerini yansıtan doğal bir sınıflandırmasını sağlamaktadır (Black, 2012).

Yıllar boyunca, Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında bakteri tanımlama rutin olarak mikroorganizma fenotipine göre gerçekleştirilmiştir. Bu fenotipler morfoloji, farklı boyamalarla tanımlanan duvar yapısı, mikroorganizmanın farklı kültür ortamlarında, sıcaklık ve atmosfer koşullarında üreme yeteneği, farklı biyokimyasal yollar veya substratlar kullanma yeteneği ve bazı durumlarda belirli antimikrobiyallere karakteristik bir duyarlılık gibi özellikleri kapsamaktadır. Bununla birlikte, mikrobiyolojik tekniklerin çoğu, mikroorganizmaların büyümesini gerektiren çok sayıda koşula bağlıdır ve bu tanımlama süresinin oldukça uzamasına neden olur (Martin ve diğ., 2014).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında bakterilerin tanımlanması, geleneksel olarak organizmayı izole ederek ve bakteri tanımlamanın altın standardı olan Gram boyama, kültür ve biyokimyasal yöntemlerle fenotipik olarak inceleyerek gerçekleştirilir. Standart biyokimyasal tayin yöntemlerinden biri API 20E test sistemi yöntemidir. API-20E sistemi, enterik bakterilerin tanımlanması için uygundur ve *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri ve ilişkili organizmalarla ilgili testleri aşlamak ve okumak için uygun bir yöntem sağlar (Thaochan ve diğ., 2010).

API (Analitik Profil İndeksi) 20E, *bakteri* tanımlanması ve ayırt edilmesi için bioMerieux, Inc.'e ait bir biyokimyasal paneldir. Plastik şerit, her test için kimyasal olarak tanımlanmış bileşimlerden oluşan yirmi mini test odası içerir. Kuyuların her birini sulandırmak için bir bakteri süspansiyonu kullanılır. İnkübasyondan sonra bazı kuyucuklarda pH farklılıklarından dolayı renk değişiklikleri olurken bazılarında reaktiflerle tanımlanması gereken son ürünler oluşur. Dizisinden ve test sonuçlarından bir profil numarası belirlenir, ardından bakteri izolatını tanımlamak için bir kod kitabında aranır. Gram pozitif ve Gram negatif bakteri ve mayaların tanımlanması için kullanılan bu sistem, artık APIWEB™ gibi veri tabanları hizmeti aracılığıyla internet üzerinden yapılmaktadır (bioMerieux, Inc., 2019).

Bununla birlikte, bu bakteri tanımlama yöntemlerinin iki büyük dezavantajı vardır. Birincisi, *Tropheryma whippelii* gibi yetiştirilemeyen organizmalar için kullanılamazlar. İkincisi, ara sıra, bilinen herhangi bir cins ve türün kalıplarına uymayan biyokimyasal özelliklere sahip organizmalarla karşılaşmamız mümkün. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve DNA dizilemesinin keşfinden bu yana, bazı bakterilerin genomları tamamen dizilenmiştir. Bakteri türlerinin genomik dizilerinin karşılaştırılması, 16S ribozomal RNA geninin tür veya cinsler içinde yüksek oranda korunduğunu ve dolayısıyla bakterilerin türleşmesi için yeni altın standart olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu yeni standart kullanılarak türler arasındaki temel farklılıklara dayalı filogenetik ağaçlar oluşturulur; bakteriler tanımlanır ve yeni cinslere göre yeniden sınıflandırılır; ve ekilemeyen mikroorganizmaların sınıflandırılması mümkün kılınmış olur (Woo ve diğ., 2000).

Öte yandan, bu teknikler, kültür ortamında büyümesi zor olan veya sınırlı biyokimyasal aktiviteye sahip mikroorganizmalara uygulandığında uygulanabilirlik ve güvenilirlikle ilgili belirgin sınırlamalar gösterir. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek amacıyla, esas olarak genetik tekniklere dayanan farklı metodolojiler geliştirilmektedir. Bu yaklaşımlar, mikroorganizmanın tanımlanmasındaki güvenilirliği artırırken, numunenin önceki kültürü olmadan doğrudan teşhis edilmesini sağlamıştır (Prieto ve diğ., 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, mikrobiyologların mikroorganizmalar hakkındaki görüşleri, kültürlenmiş mikroorganizmalardan kültürlenmemiş mikroorganizmalara dönüşmüştür ve 1985'te yapılan deneysel bir ilerleme, mikrobiyal dünyayı görselleştirme

şeklimizi kökten değiştirmiştir. Kültürlenmemiş mikroorganizmaların incelenmesinin sonuçlarından biri 'metagenomiklerin' ortaya çıkmasıdır (Oulas ve diğ., 2015). Metagenomik terimi ilk olarak 1988'de Jo Handelsman grubu tarafından karışık çevresel DNA türlerinin işlev temelli analizine atıfta bulunarak kullanılmıştır. Norman R. Pace ve meslektaşları, bir çevresel örnekteki mikroorganizmaların çeşitliliğini kültür yapmadan tanımlamak için ortamdaki 5S ve 16S rRNA gen dizilerinin doğrudan analizini kullandılar. Bu, toplu DNA'nın çevresel bir örnekten izole edilmesi ve klonlanmasıyla ilgili ilk raporu ortaya koymuştur (Handelsman, 2004).

Metagenomik, saf kültürler elde etmeye gerek kalmadan mevcut mikroorganizmalar topluluğunu incelemek için çevresel örneklerden elde edilen DNA'yı analiz etmek için kullanılan moleküler bir araçtır. Metagenomik, spesifik olarak, uygun büyüklükte DNA fragmanlarının üretilmesini ve fragmanların uygun bir klonlama vektörüne bağlanmasını içeren metagenomik kütüphanelerin yapımını ifade eder (Ghosh ve diğ., 2019).

Metagenomik analizler yeni nesil dizileme (YND) yöntemleriyle hızlı ve yüksek doğrulukla yapılır. Bu teknoloji ile bitki, bakteri, maya, küf, virüs gibi mikroorganizmaların genomlarını başarılı şekilde dizilenir. Günümüzde popüler olarak, Illumina Genome Analyzer, Complete Genomics, Applied BioSystem SOLID, Helios ve IonTorrent gibi YND araçları kullanılır (Jongman ve ark., 2020; Nair ve ark., 2020). Metagenomiklerin Sanger sonrası dizileme ile birlikte kullanılması, mikrobiyal toplulukları hızlı bir şekilde tanımlama, karakterize etme ve ayrıntılı olarak anlama yeteneği sunmaktadır (Schloss ve Handelsman, 2005).

YND, yöntem ve bulguların analizi bakımından Sanger dizilemeden farklılık gösterir. Elektroforez tabanlı Sanger dizileme halen DNA dizileme için altın standart olarak kabul edilse de son zamanlarda bu yöntemin artık altın standart olmayabileceği üzerine çalışmalarda yapılmaktadır. Sanger dizileme, yüksek güvenilir sonuçlar sağlasa bile çok uzun okuma uzunluklarına sahiptir. Hedeflenen genom alanları uzadıkça maliyet ve gereken süre artar. Bu nedenle Sanger, büyük genomların veya çok sayıda genin aynı anda incelendiği zamanlarda pratik olmaz. YND ise gen panellerinin daha düşük bir maliyetle dizilenmesine sağlar. Hızlı, geniş ölçekli ekzom ve tüm genom dizi analizi gerçekleştirme kabiliyeti sunar (Sanger, 1977).

Metagenomik ampikon ve shotgun dizileme olmak üzere iki şekilde analiz yöntemi kullanılmaktadır. Örnekteki toplam mikroorganizmaların DNA izolasyonu yapıp belirli gen bölgeleri hedeflenir. Bunlar, yüksek oranda korunmuş ve taksonomik bilgi veren 16S rRNA, 18S rRNA ve ITS gibi genlerdir (Parente ve diğ., 2020). Hedeflenen metagenomikleri gerçekleştirmek için, çevresel DNA ekstrakte edilir ve ilgili gen için en büyük sekans çeşitliliğini çoğaltmak üzere tasarlanmış primerler kullanılarak PCR amplifiye edilir. Çoğaltılan gen bölgelerinin dizilemesi ve NGS ile anlam kazanarak tanımlanır. Shotgun dizilemede bir örnekteki tüm genomun rastgele parçalarının dizilenir. Tüm genomun tür düzeyinde tanımlanmasında shotgun dizileme daha güvenilir sonuçlar sunar (Bharagava ve diğ., 2019). Tüm genom shotgun dizileme ve ampikon dizileme de farklı veritabanları kullanılmaktadır ve shotgun dizileme ile daha büyük ham veri elde edilmektedir (Escobar-Zepeda ve diğ., 2018).

1986'da Kary Mullis'in bulduğu polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), spesifik bir DNA sekansını, spesifik primerler ve DNA polimeraz enzimi kullanılarak tekrarlanan sentez döngüleri ile in vitro amplifiye etmek için kullanılan bir yöntemdir (Arusha, 2016).

PCR ve ardından 16S rRNA genlerinin dizilenmesi, bakteri ve arkeaların filogenisi anlayışımızda devrim yarattı. Neredeyse bilinen tüm türleri kapsayan 16S rRNA gen veritabanlarının sunulmasıyla, yeni türlerin keşfedilme oranı önemli ölçüde arttı. Yapılan çalışmalarda türlerin tanımlanmasında etkili 16S rRNA geni üzerine bir eğilim oluşturduğumuzda metagenomiğin derinine inmiş oluruz. Prokaryotik ribozomlar, 30S ve 50S' lik alt birimlere sahiptirler. 16S rRNA geni, bakteriyel ribozomun 30S alt biriminin RNA bileşenini kodlar. Bakteri türleri, bu genin bir çok kopyasını içerir ve bu sayede bakteriyel filogeniyi ve cins/tür sınıflandırmasını incelemek için bize avantaj sağlar. Bu yöntem, bilinmeyen suşları tanımlamak için bir çok klinik laboratuvar için güvenilir görülmektedir. 2001 ile 2007 yılları boyunca, 16S rRNA gen dizilenmesi, 29'u yeni cinsler olarak sınıflandırılan 215 yeni bakteri türünü tanımladı. Bakteriyel sınıflandırma için önerilen kılavuzlara göre, 16S rRNA gen dizisinde % 97'den az benzerliğe sahip suşlar, farklı bakteri türlerini temsil eder (Wang ve diğ, 2015). Bu genler, mRNA'dan protein translasyonunda görev aldığı için organizmalar arasında son derece korunmuştur. Ribozom küçük alt birimi, buraya spesifik rRNA primerleri bağlanabildiği için flogenetik analiz için önemlidir. Bu yöntemle oluşturulan ilk filogenetik ağaçlarda *Xenopus laevis* (eukaryote)

*Escherichia coli* (eubacterium), *Zea mays* (eukaryote), *Halobacterium volcanii* (archeabacterium), *Dictyostelium discoideum* (eukaryote), *Saccharomyces cerevisiae* (eukaryote), *Mus mus* (eukaryote),) türlerinin akrabalık ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır (Turan ve diğ., 2018).

Şekil 2.3’de görüldüğü üzere 16S rRNA geni, 1500 bç nükleotid uzunluğundadır. Bakteri türleri arasında korunmuş olan (C1-C9) bölgeleri ve yüksek oranda değişkenlik gösteren (V1-V9) bölgelerini içerir (Petrosino ve diğ., 2009).



**Şekil 2.3:** 16S rRNA genindeki korunmuş ve çok değişken bölgeler (Petrosino ve diğ., 2009).

16S rRNA gen dizisi ilk olarak 1985 yılında filogenetik analiz için kullanılmıştır (Lane ve diğ., 1985). Mikroorganizmaların filogenetik özelliklerini tanımlamada kullanılan 16S rRNA gen dizisi, primer tasarımı için yüksek oranda korunmuş bölgelerle beraber hiperdeğişken bölgelerde içerdiğinden, bakteri topluluklarının profilinin çıkarılmasında en yaygın kullanılan işaretleyici gen haline gelmiştir (Tringe ve Hugenholtz, 2008). Belirli bir hiperdeğişken bölge içindeki türe özgü diziler, teşhis testleri ve diğer bilimsel araştırmalar için yararlı hedefler oluşturur. Tüm bakteriler arasında tek bir bölge ayırt edilemez. Ne yazık ki, 16S rRNA hiperdeğişken bölgeleri, farklı derecelerde dizi çeşitliliği sergiler ve tek bir hiperdeğişken bölge tüm bakteriler arasında ayırım yapamaz (Chakravorty ve diğ., 2007). 16S rRNA geni yüksek oranda korunmuş olmasına rağmen, farklı organizmaları ayırt etmek için kullanılacak dokuz hiperdeğişken bölgeye sahiptir. V2, V3, V6 bölgeleri cins düzeyinde ayırım için yeterlidir ama bazı durumlarda tür düzeyinde ayırma da kullanılmaktadır. Bu bölgeler yüksek değişkenlik oranına sahip oldukları için sınıflandırmada oldukça önemli bir işleve sahiptir. Diğer bölgeler iyi korunduğu için çok tercih edilmezler. Filogenetik ağaçlar, özellikle yeni mikrobiyal soylar olmak üzere farklı türler arasındaki sistematik ilişkileri aydınlatmak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

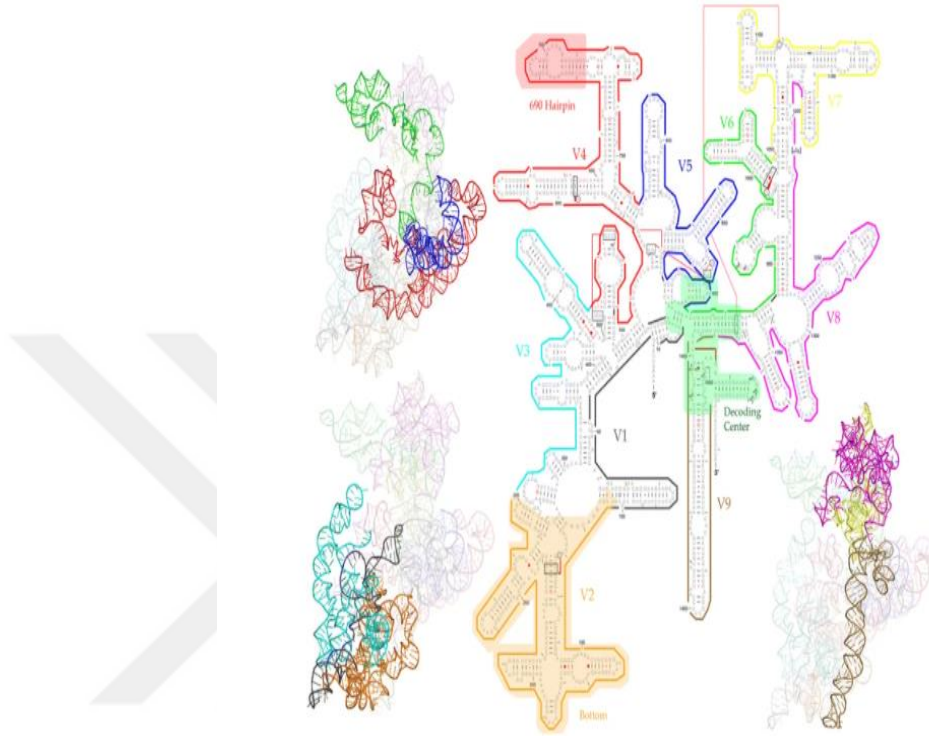
Bununla birlikte, filogenetik çözünürlük açısından farklı 16S rRNA alt bölgeleri arasındaki ilişkileri belirleme stratejileri hala tartışmalıdır. Farklı hiperdeğişken bölgelerin korelasyonu, farklı bölgelerin dizilerine dayalı olarak inşa edilen filogenetik ağaçların jeodezik mesafesinden çıkarılabilir. Jeodezik mesafe, ağaçlar arasındaki farklılıkları ölçmek için kullanılmıştır. Farklı alt-bölgeler arasındaki mesafeler incelendiğinde, bakteri filogenetiği için V4-V6 bölgeleri en güvenilir bölgedir. V2 ve V8' ise en az güvenilir bölgeler olarak belirlenmiştir (Yang ve Diğ., 2016).

Değişken bölgelerin yanında, korunmuş bölgelerinde varlığı bu bölgelere universal primerlerin bağlanmasını kolaylaştırır. Bu sayede mikrobiyota çalışmaları oldukça genişlemiş ve veri tabanlarına kaydedilen 16S rRNA gen dizileri artmaktadır. Bahsedilen yüksek değişkenlik gösteren 'V' bölgelerinin başlangıç ve bitiş pozisyonları aşağıda Tablo 2.1'de gösterilmiştir (Turan ve diğ., 2018).

**Tablo 2.1:** Yüksek değişken bölgeler ve gen içindeki pozisyonları.

<b>Değişken bölge</b>	<b>Başlangıç ve bitiş numaraları (kb)</b>
V1	66-99
V2	137-142
V3	433-497
V4	576-872
V5	822-879
V6	986-1043
V7	1117-1173
V8	1243-1294
V9	14335-1465

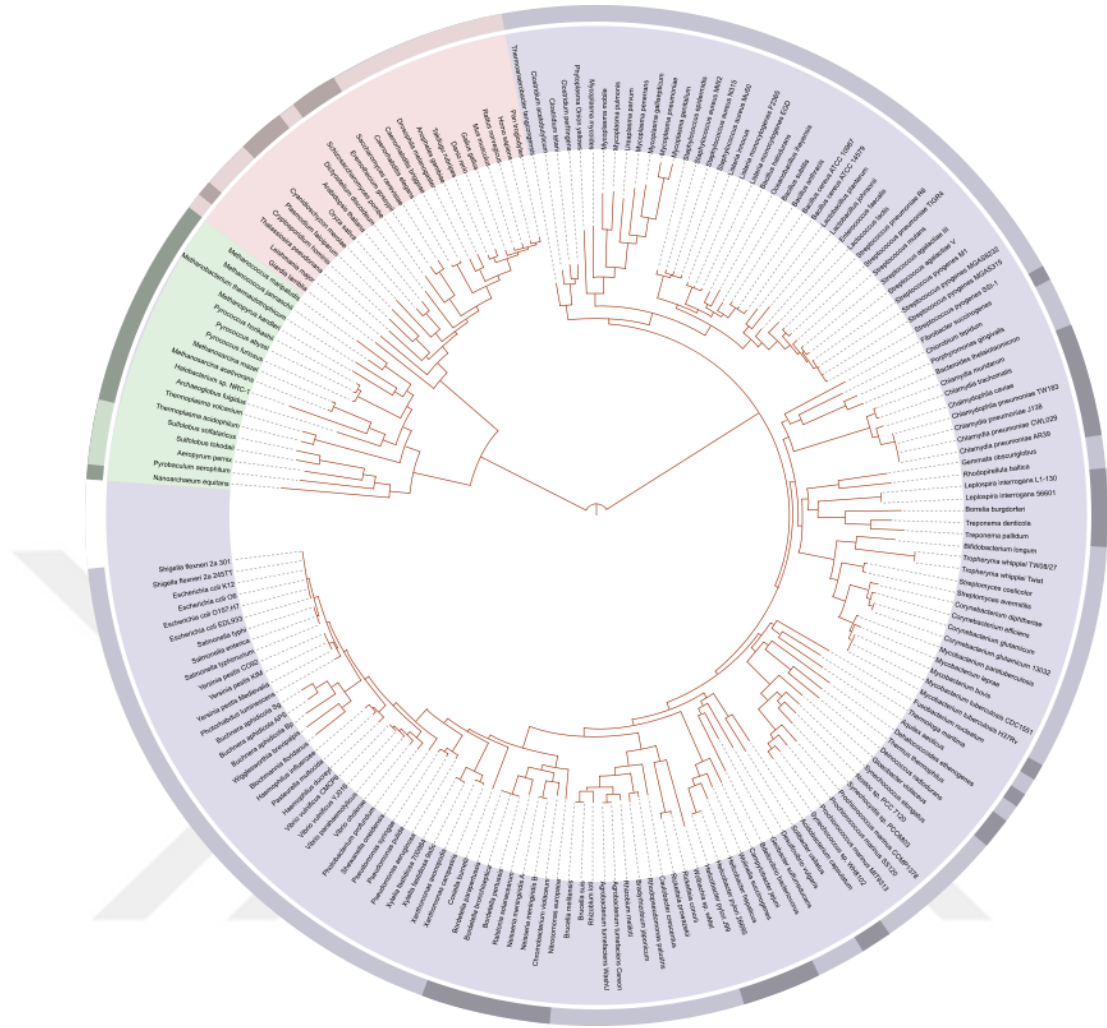
Şekil 2.4'te 16S rRNA genindeki değişken bölgelerin hepsi farklı renkle gösterilmiştir. Şekilde ayrıca 16S rRNA'nın V4 bölgesinde yer alan ve yüksek oranda korunmuş olan 690 firkete yapısı içi dolu şekilde renklendirilmiştir (Yang ve diğ., 2016).



Şekil 2.4: 16S rRNA geni 2D-3D yapısı (Yang ve diğ., 2016).

Elde edilen 16S rRNA gen dizileri uygun biçimde hizalanır. Hizalama belirli bir organizma veya tüm organizmalar üzerinde yapılabilir. Bu işlem bazen çok uzun zaman alabilir, bu durum araştırmacıları kısıtlayan bir noktadır (Turan ve diğ., 2018).

Diziler, benzerliğe göre "Operasyonel Taksonomik Birimler" (OTU'lar) adı verilen kutularda kümelenir. Tipik olarak benzerlik, ikili dizi hizalamasında uyuşan sitelerin yüzdesi olarak hesaplanır. Türleri ayırt etmek için gerekli olan benzerlik oranı % 98'dir (Nyugen ve diğ., 2016). Bir OTU tablosu, her örnekte her taksonomik birim için gözlemlenen dizi sayısını içerir. Okumalar içindeki sıra benzerliğine dayalı olarak OTU'lar ve her OTU'dan temsili bir dizi seçilmesinden oluşur. Protokol ayrıca referans veritabanlarını kullanarak taksonomik kimlikleri atar, OTU dizilerini hizalar, şekil 2.5'te ki gibi filogenetik bir ağaç oluşturur. Her bir mikrobiyal örnekteki her OTU'nun bolluğunu temsil eden bir OTU tablosu oluşturur (Kuczynski ve diğ., 2011).



Şekil 2.5: OTU kladogramı ( Letunic,2007).

Yeni Nesil Dizileme (YND) cihazları, dizileme işlemi sırasında meydana gelen teknik hatalar konusunda bilgi verirken genetik materyalde ortaya çıkan sorunlar hakkında gelişmiş bir bilgi vermez. Kullanılan YND platformunun tedarikçisinin sağladığı yazılım ile yapılan baz çağırma ve de-multiplexing işlemi sonucunda çıktı olarak FASTQ (Fast Adaptive Shrinkage Thresholding Algorithm and Quality) dosyası oluşmaktadır. Fastq nükleotid dizisini ve okuduğu nükleotidin kalite değerlerini bir arada bulundurur. YND, bir referans genomla eşlenmesi veya yeni birleştirilmesi gereken milyonlarca kısa okuma ile çok büyük miktarda veri üretir. Büyük ölçekli verilerin birleştirilip anlamlı kümeler oluşturması işlemine making assembly denir. Veri analizi yüksek kaliteli okumalara dayanmalıdır, çünkü düşük kaliteli okumalar mutasyon sayısının aşırı yorumlanmasına yol açabilir. Ek olarak, yüksek kaliteli okumalar, *de novo* dizi montajının daha yüksek doğruluğuna yol açacaktır. Hem referans tabanlı haritalama hem *de novo* derleme büyük

veri dosyaları oluşturur. De novo dizi montajı üzerinde çalıştığımız örneğe ait hiçbir genetik bilginin olmadığı durumlarda kullanılır (Oral, 2018).

Illumina dizileme yöntemiyle, 16S rRNA işaretleyici geninin yüksek verimli dizilenmesi yöntemi, mikrobiyal toplulukların çeşitliliğini ve bileşimini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır (Pichler ve diğ., 2018). Bu yöntem maliyeti düşürüp kısa süre içinde büyük veriler oluşturur. Metagenomik çalışmalarda Illumina dizileme yönteminin tercih edilmesinin sebebi geniş kapsamlı, yüksek verimli, çok fazla sistematik hata barındırmayan veriler sunmasıdır. Bu verilerin biyoinformatik analizi için QIIME en çok tercih edilen yazılımdır. (Oulas ve diğ., 2015). Standart bir QIIME analizi, Sanger, Roche / 454, Illumina veya diğerleri gibi bir veya daha fazla sekanslama teknolojisinden gelen sekans verileriyle başlar. QIIME genel olarak, bir terminal penceresine bir dizi komut yazmayı ve grafiksel-metinsel çıktıyı görüntülemeyi içerir (Kuczynski ve diğ., 2011).

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı (TEMA) Laboratuvarından alınmış farklı kaynaklardan oluşturulmuş bakteri izolatlarının DNA izolasyonu, 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesinin PCR ile çoğaltılması, Illumina dizileme yöntemiyle dizilenmesi, QIIME programı kullanılarak OTU'lar belirlenmesi ile beraber metagenomik analizi yapılmıştır.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

Tez kapsamında kullanılan Küçükçekmece Gölü, Manyas Gölü ve Batı Karadeniz su örnekleri, İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (TEMA) laboratuvarı çalışanları tarafından alınmış ve izolasyonları yapılmış olan örneklerdir. Tablo 3.1’de örneklerin alındığı nokta ve izolat kodları verilmiştir.

**Tablo 3.1:** Örneklerin alındığı noktalar ve izolatların kodları.

Örneklerin Alındığı Bölge	İzolat Kodları
Batı Karadeniz	BK117
	BK96
	BK93
	BK85
	BK56
Manyas Gölü	M107
	M126
	M127
	M83
Küçükçekmece Gölü	C77
	C80

#### 3.1. Örneklerin DNA İzolasyonu Ve Miktar Tayini

Farklı noktalardan alınan bakteri izolatların izolasyonu, Qiagen firmasının topraktan ve sudan DNA izolasyonu için tasarladığı DNeasy PowerSoil (Cat. no. 12888-50) ile yapıldı. Her izolat bu farklı su kaynaklarının farklı bölgelerinden alınmıştır.

İzolasyon işlemi, çalışma kabini içerisinde yapıldı. İzolasyondan önce kabin 20 dk UV ışık ile sterilize edildi. Powerbead tüpüne 0.25 ml örnekten alınıp hafifçe çalkalandı. 60 µl C1 solüsyonu eklendi ve birkaç kez ters çevirerek tekrar çalkalandı. Bir vorteks adaptörü tüp tutucusu kullanarak Powerbead Tüpleri yatay olarak sabitlenerek 10 dakika boyunca

maksimum hızda çalkalandı. Tüpler 10.000 xg'de 30 saniye boyunca santrifüjlendi, Süpernant 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne aktarıldı. 250 µl C2 çözeltisi eklendi ve 5 saniye boyunca çalkalandı. 4 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Tüpler 10.000 xg'de 1 dakika santrifüjlendi. Pelletten kaçınarak 600 µl'ye kadar süpernantant temiz bir 2 ml toplama tüpüne aktarıldı. 200 µl C3 çözeltisi eklendi ve kısa süre çalkalandı. 4 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Tüpler 10.000 xg'de 1 dakika santrifüjlendi. Pelletten kaçınarak 750 µl'ye kadar süpernantant temiz bir 2 ml toplama tüpüne aktarıldı. C4 çözeltisi karıştırmak için sallandı ve süpernantana 1200 µl eklendi, 5 saniye vorteksledi. Bir MB döndürme kolonu üzerine 675 µl eklendi ve 1 dakika boyunca 10.000 x g'de santrifüjlendi. Bu işlem iki kez tekrarlandı ve sonra 500 µl C5 çözeltisi eklenerek 10.000 xg'de 30 saniye santrifüjlendi. Devir daim durduktan sonra tekrar 10.000 xg'de 1 dakika santrifüjlendi. MB Döndürme Kolonu 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne dikkatlice yerleştirildi. Beyaz filtre membranının ortasına 100 ml çözelti C6 eklendi. Oda sıcaklığında 30 saniye 10.000 x 'de santrifüjlendi. MB döndürme Oda sıcaklığında 10.000 xg'de 30 saniye santrifüjlendi. MB Döndürme Kolonu çıkarıldı.

İzolasyonu yapılan örneklerin DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri ölçüldü. Bu işlem için Thermo Scientific NanoDrop 2000 spektrofotometre cihazı kullanıldı. DNA miktarı, 260 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine göre hesaplanmıştır. Elution Buffer cihaza 1 µl yüklenerek blank ölçümü yapıldı. Sonra su örneklerinden 1 µl alınarak kit içerisinde bulunan tüplere aktarıldı ve 1 µl Elution Buffer eklenip, DNA konsantrasyonları ölçüldü. Saflık kontrolü için UV ışığını soğurma değerlerinin oranı (A260/A280) kullanıldı. DNA'ların konsantrasyonları aşağıdaki formülle hesaplandı; (Leland J,2004)

$$\text{DNA (ng/l)} = \text{A260} \times 50 \text{ ng/l} \times \text{Seyreltme Faktörü} \quad (3.1)$$

1.8-2.0 değer aralığındaki konsantrasyon oranı DNA'nın saf olduğunu gösterir (Matlock, 2015). Çalışma için yeterli kalite ve miktarda olan DNA örnekleri -20 derece soğutucuda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) analizleri için saklandı.

### **3.2. DNA'ların 16s rRNA Geninin V3-V4 Bölgesinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması**

İzole edilen örneklerin 16S rRNA geni V3-V4 bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltıldı. Böylece, örneklerin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi. Bu protokolda kullanılan primer çiftleri Illumina adaptör çıkıntılı nükleotid dizileri, gene özgü dizilere eklendi. Bu dizilerin kullanılmasında, Klindworth ve arkadaşlarının yayınladığı çalışması referans

alınmıştır (Klindworth ve diğ.,2013). Bu çalışmaya dayanarak, üç amplikon boyut sınıfı (100-400, 400-1000,  $\geq$  1000 bp) için Bakteriler ve Arkeler için 'en uygun' primer çiftlerinin 464 bp amplikon boyutuyla en umut verici bakteri primer çifti SD-Bact-0341-bS-17 / SD-Bact-0785-aA-21 olarak görülmüştür. Bu bölgeyi hedefleyen standart IUPAC nükleotid terminolojisini kullanan tam uzunlukta primer dizileri şunlardır:

16S Amplikon PZR İleri (Forward) Primer = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplikon PZR Geri (Reverse) Primer = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTA  
AT CC

16S rRNA genindeki V3 ve V4 bölgelerinin özgün primer dizileri koyu renkli gösterilmiştir. Illumina evrensel adaptör dizileri normal yazılmıştır.

PZR için Tablo 3.2'deki bileşenler verilen miktarlarda hazırlandı.

**Tablo 3.2:** PZR için gerekli bileşenler.

Bileşen Adı	Hacim ( $\mu$ l)
Mikrobiyal DNA (5ng/ $\mu$ l)	2.5
Amplikon PZR Forward Primer=5'	5
Amplikon PZR Reverse Primer=5'	5
2x KAPA Hifi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, KK2601)	12.5
Toplam	25

Hazırlanan bileşenlerle, Tablo 3.3’de verilen koşullarla C1000 Thermal Cycler (Biorad Laboratories, Inc., ABD) cihazı kullanılarak, PZR işlemi yapıldı.

**Tablo 3.3:** PZR koşulları.

Döngüler	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	25
Bağlanma	55	30 sn	25
Uzama	72	30 sn	25
Son Uzama	72	5 dk	1
Bekleme	4	∞	

Çoğaltılan amplikonların PZR pürifikasyon işlemi yapıldı. Böylece primer, primer dimer ve diğer PZR bileşenlerinden temizlenen amplikona özgün Illumina index dizileri bağlandı ve amplikonlar pürifiye edildi. 460 bç uzunluğunda amplikonlar çoğaltılan örnekler kontrol için jel elektroforezinde görüntülendi. Kalitatif analiz için Tablo 3.4’te belirtilen miktarlarla % 1,2’lik agaroz jel hazırlandı ve elektroforez yapıldı.

**Tablo 3.4:** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

Çözelti Adı	İçeriği
50X TAE Tamponu	2 M Tris bazı (Sigma, T8524) (Sigma, T8524), %0.0571 Glasiyal asetik asit (Sigma, A9967), 50 mM EDTA (pH 8.0)
10mg/ml EtBr	10mg EtBr, 1 ml distile su
6X Yükleme Tamponu	100 mM EDTA (pH8.0), %1 SDS, %60 Gliserol, %0.03 Bromofenol mavisi, %0.03 Ksilen siyanol FF

Elektroforez için 1 kb ladder (NEB) kullanıldı. Yürütme işlemi için 1X Tris-asetat-EDTA (TAE) tampon sistemi kullanıldı. %1,2 agaroz jel elektroforezi için 0.48 g agaroz (Sigma, A5073) tartılıp üzerine 40 ml 1X TAE eklendi ve mikrodalga fırında 2 dakika çözülmesi beklendi. Oda sıcaklığında soğutulan jele 32 µl EtBr eklendi. Tarağı yerleştirilen elektroforez kasedine (BioRad, 1704416EDU) dökülen jelin katılaşması için 30 dakika beklendi. Polimerize olan jel, içinde 1X TAE tamponu bulunan yatay elektroforez tankına yerleştirildi. 5 µl DNA örneği, 1µl 6X DNA Yükleme boyası (Thermo Scientific, R0611) ile karıştırılıp kuyulara yüklendi. 85 V sabit akım ile 50 dakika yürütmesi sağlandı. DNA'lar UV transillüminatör (Vilber Lourmat, ECX-F26.M) kullanılarak kontrol edildi.

### 3.3. Örneklerin Illumina Yeni Nesil Dizileme Yöntemi ile Dizilenmesi

V3-V4 bölgesi çoğaltılmış 11 örnek dizilemeye gönderildi. DNA dizilemesi işlemi için Piya Biyoteknoloji şirketi tarafından profesyonel hizmet verildi. Illumina MiSeq sistemi ile dizileme yapılarak fasta ve qual formatında veriler elde edildi.

Metagenomik analiz için QIIME 1.9.1 versiyonu, grafik görüntülemeleri için QIIME2 versiyonu kullanıldı ve analiz protokolünün uygulanmasında Kuczynski ve diğ.'lerinin (2011) makalesi referans alındı.

İlk aşamada 3 dosya gereklidir:

**1.Dizi Dosyası ‘.fna’:** DNA dizilerini içeren fasta dosyası.

**2.Kalite Skoru Dosyası ‘.qual’**

**3.Haritalama Dosyası ‘.txt’:** Kullanıcı tarafından oluşturulan bu dosya örneklerle ilgili tüm bilgileri içerir. Örneğin adı, örnek için kullanılan barkod dizisi, örneğin çoğaltılması için bağlayıcı primer dizisi ve açıklayıcı sütunu içerir.

### 3.4. Çoklu Okuma Sayılarını Biyolojik Örneklerle Atama

Çoklu okuma sonuçları barkod dizilerine atanır. Dizi, kalite skoru ve haritalama dosyaları kullanılır. Her örnek için kalite filtrelemesi yapılır. Düşük kaliteli okumalar silinir (Kalite skoru >25). İşlem için *split\_libraries.py* komut dizisi uygulandı.

split\_libraries.py -m barkod-dosyaadı.txt -f dizileme dosyaadı.raw.fasta.gz -q dizileme-dosyaadı.raw.qual.gz -o

Bu komutla aşağıdaki iki dosya elde edildi:

**split\_library\_log.txt:** Okuma sayısı ve temizlenen okumaların kısa özeti.

**seqs.fna:** Girilmiş fasta dosyasından okunan isim bilgileri ve düzeltilen tüm barkod hatalarını içerir.

Kalite skoru uygun diziler kendi barkodlarına göre yeniden adlandırılır (Tablo 3.5). (Her örneğe özgü 8 nükleotidten oluşan barkod dizileri eklenerek DNA dizileri ayrıştırılır.)

**Tablo 3.5:** Örneklere verilen barkod dizileri.

Örnek	Barkod Dizisi	Primer Dizisi
BK117	CCTACGGG	
BK96	CCTACGGG	
BK93	CCTACGGG	
BK85	CCTACGGG	
BK56	CCTACGGG	
M107	CCTACGGG	CCTACGGGNGGCWGCAG
M126	CCTACGGG	
M127	CCTACGGG	
M083	CCTACGGG	
C77	CCTACGGG	
C80	CCTACGGG	

### 3.5. İşlevsel Taksonomik Birimlerin (OTU'ların) Atanması

Bu aşamada, %97 benzerliğe sahip diziler kümeleme yöntemiyle işlevsel taksonomik birimlere (OTU) atanır. Bu aşama için fasta formatlı (.fna uzantılı) dizi dosyası gerekmektedir.

*pick\_otus.py* komut dizisi uygulandı:

```
pick_otus.py -i split_Library_output_8bp/seqs.fna -o picked_otus_default
```

QIIME ile (default) Uclust parametreleri ile kalite kontrol yapıldı, kimerik diziler filtrelenerek kümelemeler belirlendi.

### 3.6. Her OTU'yu Temsil Eden Dizin Belirlenmesi

Analizlerde kullanmak için her bir OTU için temsili bir dizi belirlenir. Bu aşamada *seqs\_otus.txt* dosyası ve iki basamak önce elde edilen fasta formatlı (.fna uzantılı) dizi dosyası kullanılır

*pick\_rep\_set.py* komut dizisi uygulandı;

```
pick_rep_set.py -i picked_otus_default/seqs_otus.txt -f split_Library_output_8bp/seqs.fna -o rep_set1.fna
```

### 3.7. Temsilci Dizin Taksonomik Ataması

Temmsili dizilere taksonomik atamalar yapıldı. Dizilerin taksonomik atamaları varsayılan (default) Uclust parametreleri ve SILVA Veritabanı (versiyon 99) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu aşamada *rep\_set1.fna* dosyası gerekmektedir.

Bu aşamada *assign\_taxonomy.py* komut dizisi uygulandı:

```
assign_taxonomy.py -i rep_set1.fna
```

Elde edilen otu tablosu, görüntülenmesi ve interaktif grafiklerle incelenmesi için QIIME2 ortamına aktarılmıştır. Bunun için şu komutlar kullanılmıştır:

```
qiime tools import --type FeatureTable[Frequency] --input-path otu_table.biom --output-path frequency_table.qza --input-format BIOMV210Format
```

```
qiime tools import --type FeatureData[Taxonomy] --input-path otu_table.biom --output-path taxonomy_table.qza --input-format BIOMV210Format
```

QIIME2'ye yüklenen otu tablosunun görselleştirilmesi için şu komut kullanılmıştır:

```
qiime taxa barplot --i-table frequency_table.qza --i-taxonomy taxonomy_table.qza --o-visualization barplot.qza
```

Veriler taksonomik basamaklara ayrılarak, örneklerdeki mikrobiyal çeşitlilik belirlendi.



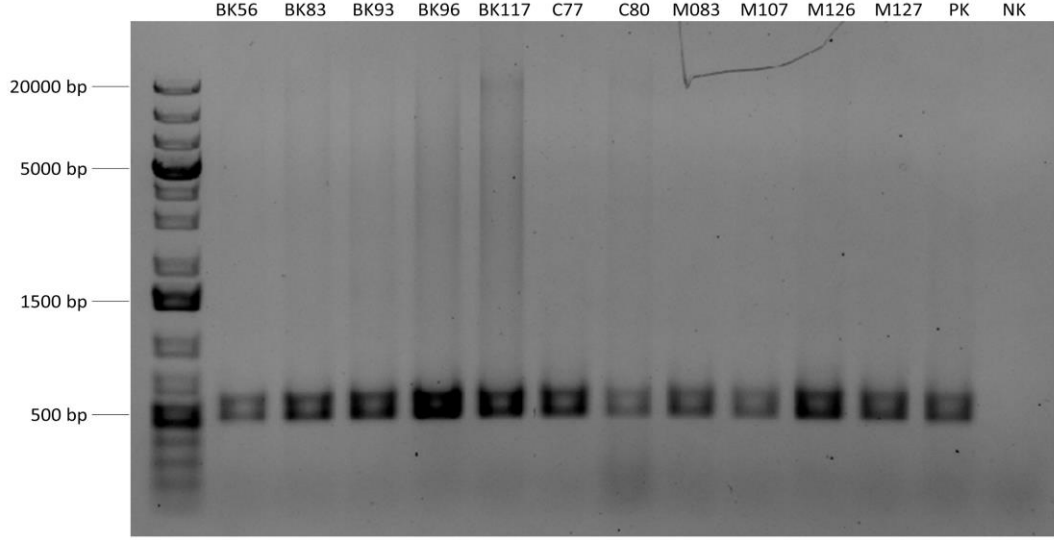
#### 4. BULGULAR

Bakteri izolatlarından alınan örneklerden elde edilen DNA'ların konsantrasyon değerleri Tablo 4.1'de belirtilmiştir.

**Tablo 4.1:** İzole DNA'lar ve konsantrasyon değerleri.

Örnek	Konsantrasyon (ng/μl)
BK117	116,4
BK96	115
BK93	47,9
BK85	38,1
BK56	21,9
M107	55,8
M126	13,3
M127	8,3
M083	19,9
C77	25,9
C80	19,6

İzole edilen 11 örneğin V3-V4 bölgeleri PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Agaroz jel elektroforezinde kalitatif analiz yapıldı ve bantlar Şekil 4.1’de ki gibi görüntüldü. Örneklerin V3-V4 bölgelerinin çoğaltılma işleminin başarı ile yapıldığı görüntüldü.



Şekil 4.1: V3 ve V4 bölgesi çoğaltılan örneklerin elektrofez jel görüntüleri.

Çalışan 11 örnek, Piya Biyoteknoloji şirketi tarafından profesyonel olarak yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak Illumina MiSeq sistemi ile dizilenmiştir. Elde edilen fasta ve qual formatında dizi verilerinin metagenomik analizi yapıldı. Dizilerin çoklu okuma verilerinin, biyolojik örneklere atanması ile elde edilen, dizilenmiş her örneğin barkod okuma sayısı Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

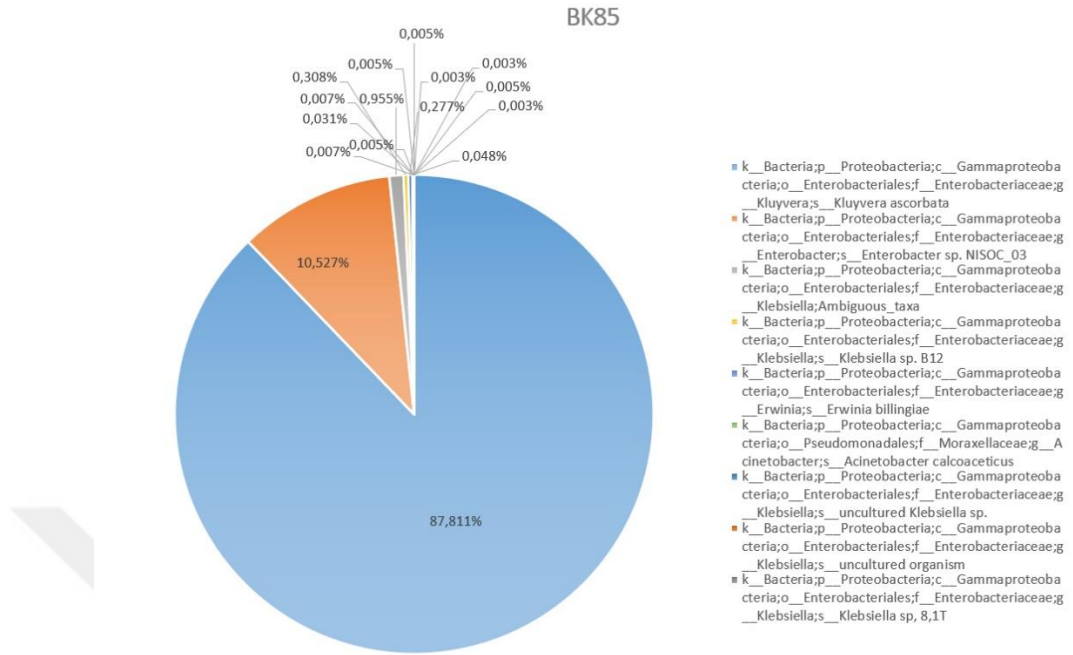
**Tablo 4.2:** Örneklerin barkod okuma sayısı.

<b>Örnek</b>	<b>Okuma Sayısı</b>
BK117	53213
BK96	41027
BK93	49899
BK85	57476
BK56	44407
M107	36530
M126	29179
M127	26214
M083	68204
C77	62305
C80	38227

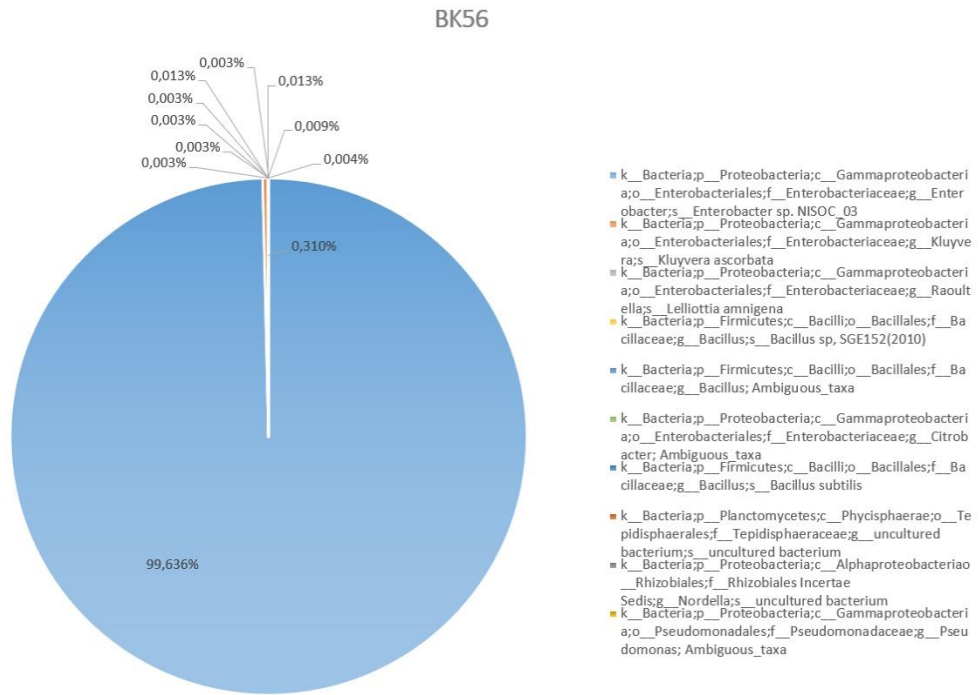
OTU’lar belirlendi ve hepsi için temsilci dizilere taksonomik atama yapıldı. Sonuçlar farklı taksonomik basamaklarda sınıflandırılıp, örneklerin arasındaki mikroorganizma çeşitliliği tespit edildi. Taksonomik analiz sonucunda, 11 örnekte 1 alem, 9 şube, 19 sınıf, 27 takım, 31 familya, 52 cins ve 321 tür tespit edildi. Yapılan karşılaştırmada SILVA Veritabanı (versiyon 99) kullanıldı. Herhangi taksonomik eşleşmenin olmadığı (unassigned) mikroorganizmaların yüzdeleri her örnek için belirlendi.







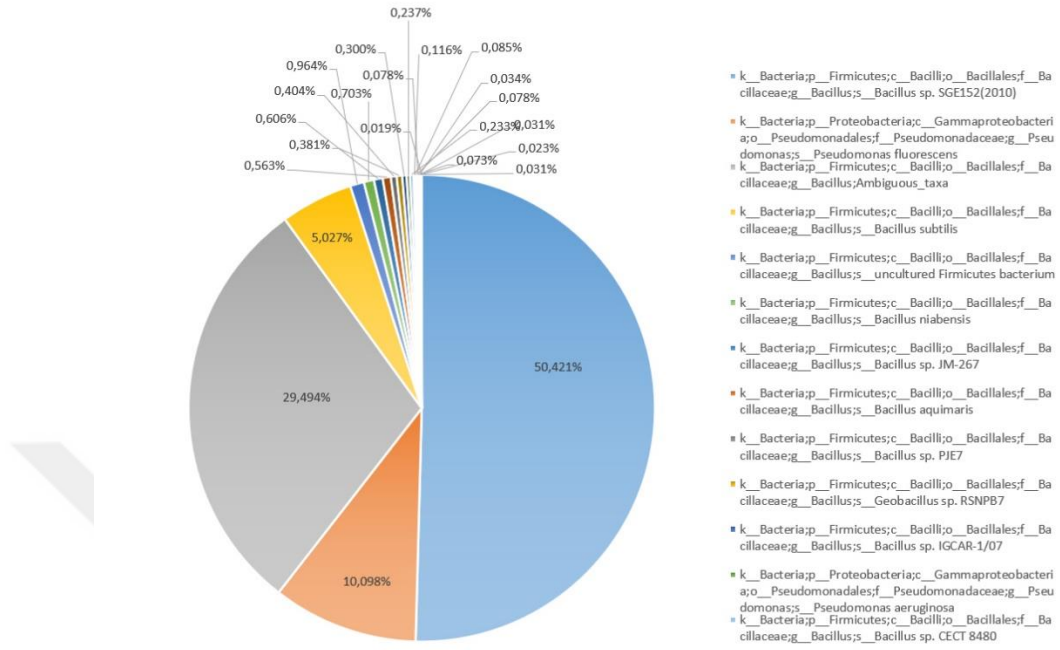
Şekil 4.5: BK85 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.



Şekil 4.6: BK56 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.

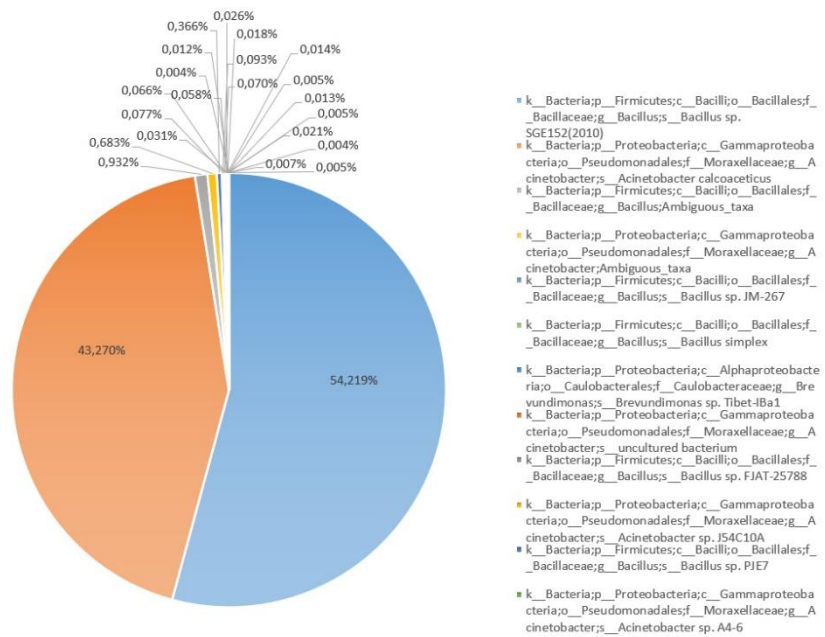


M127



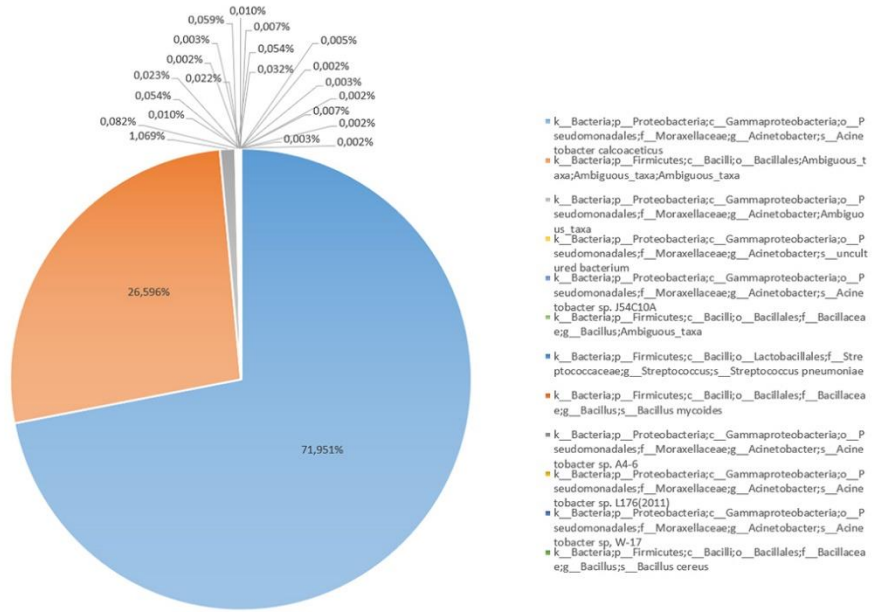
Şekil 4.9: M127 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.

M083



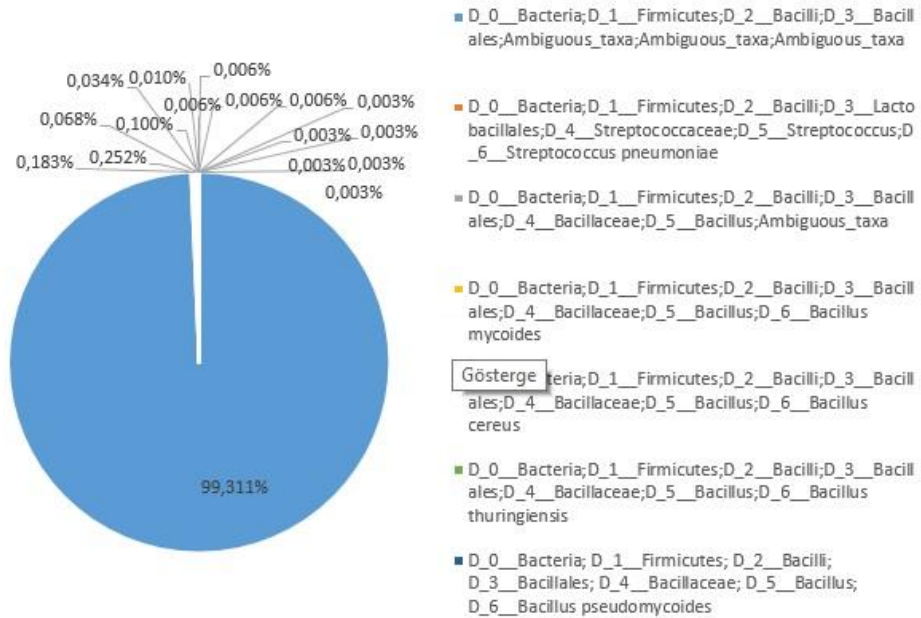
Şekil 4.10: M083 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.

C77



Şekil 4.11: C77 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.

C80



Şekil 4.12: C80 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları grafiği.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez kapsamında kullanılan örnekler, Küçükçekmece Gölü'nden C77 ve C80 noktalarından, Batı Karadeniz'den BK117, BK96, BK93, BK85 ve BK56 noktalarından, Manyas Gölü'nden M107, M126, M127 ve M083 noktalarından İstanbul Üniversitesi Biyoloji TEMA Laboratuvarı çalışanları tarafından alındı. Her izolat bu farklı su kaynaklarının farklı bölgelerinden alınmış olup bir kısmı tanımlanmış, bir kısmı tanımlanmamış bakteri izolatlarıdır. Tanımlanmış örneklerin tür tayini, TEMA Laboratuvarı çalışanları tarafından API 20E test sistemi ile klasik yöntemle belirlenmiş olup Tablo 5.1 'de gösterildiği gibidir. Bu izolatlar Gram boyama yöntemi ile boyanıp, sitokrom oksidaz ve katalaz testleri yapılarak, tür tayini API 20E test sistemi kullanılarak yapılmıştır. (Biomérieux, France)

**Tablo 5.1. :** API 20E test sistemi kullanılarak belirlenen tür tayinleri.

<b>B56</b>	<i>Pseudomonas luteola</i>	Gram (-), oksidaz (+)
<b>B85</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Gram (-), oksidaz (+)
<b>B93</b>	Tanımlama Yapılmamış	-
<b>B96</b>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gram (-), oksidaz (+)
<b>B117</b>	Tanımlama Yapılmamış	-
<b>C77</b>	<i>Escherichia coli</i>	Gram (-), oksidaz (-)
<b>C80</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Gram (-), oksidaz (-)
<b>MO83</b>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Gram (-), oksidaz (+)
<b>MO107</b>	<i>Aeromonas sobria</i>	Gram (-), oksidaz (+)
<b>MO124</b>	<i>Aeromonas</i>	Gram (-), oksidaz (+)
<b>MO126</b>	<i>Aeromonas sobria</i>	Gram (-), oksidaz (+)
<b>MO127</b>	<i>Aeromonas</i>	Gram (-), oksidaz (+)
<b>MO129</b>	<i>Aeromonas sobria</i>	Gram (-), oksidaz (+)

Bu tez çalışmasında 11 farklı örneğin DNA izolasyonu Qiagen firmasının topraktan ve sudan DNA izolasyonu için tasarladığı dneasy powersoil Kiti ile yapıldı. DNA miktarları spektrofotometrik ölçüm ile belirlendi. Ortalama DNA konsantrasyonları 44 ng/µl olarak ölçülmüştür (Tablo 4.1).

PZR sonucunun kalitatif analizi yapıldı ve 11 örneğin tamamının V3-V4 bölgelerinin başarıyla çoğaltıldı (Şekil 4.1). ~460 bç'lik DNA dizileri elde edildi. Garcia ve diğ.,(2019) yaptığı çalışmada, fibromiyalji hastalarından alınan dışkı ve kandan izole edilen DNA'ların 16S rRNA genlerinin V3 ve V4 bölgelerini çoğaltarak metagenomik analizini yapmışlardır. Fibromiyalji hastalarında bakteri çeşitliliğinin ve *Bifidobacterium* ve *Eubacterium* cinslerinin bolluğunun önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Sonuçlar, mikrobiyom analizinin, çalışmada kullanılan diğer tekniklerden daha önemli biyobelirteçler sağladığını göstermektedir.

Metagenomik analiz için Illumina miseq teknolojisi ile fasta ve qual formatıyla diziler çıkarıldı. Metagenomik analiz sonucuna göre 11 örnekte toplam 1 alem, 9 şube, 19 sınıf, 27 takım, 31 familya, 52 cins ve 321 tür tespit edildi. Taksonomik analizde elde edilen veriler ile türler basamağına kadar bu tez kapsamında değerlendirildi (Şekil 4.2-4.12).

Shin ve arkadaşlarının dev papiller konjonktivit ve keratit gibi göz hastalıklarının gelişimi için bir risk faktörü olarak görülen kontakt lensler üzerinde yaptıkları çalışmada, bu hastalıkların oküler mikrobiyotadaki değişikliklerle ilişkili olarak ortaya çıkabileceğini öngörmüşlerdir. Lens kullanan ve kullanmayan deneklerden alınan konjonktiva ve göz altındaki cilt bakteri topluluklarından alınan örnekler, 16S rRNA genlerinin V4 bölgesi çoğaltıp, metagenomik analizini yaparak karşılaştırılmıştır. Illumina miseq ile elde edilen dizilere QIIME ile metagenomik analiz uygulanmıştır. Örnek başına ortalama 21.569 okuma ile 7.010.096 dizi ve 11.750 işletim taksonomik birim (OTU) elde edilmiştir. Sonuçlar, kontakt lens takmanın oküler konjonktivanın mikrobiyal yapısını değiştirdiğini ve bu da onu cilt mikrobiyotasına daha benzer hale getirdiğini göstermektedir. Bu çalışma, lens kullanıcılarının göz mikrobiyotasının, kullanmayanlarınkinden farklı olduğunu ve cildin mikrobiyotasına daha çok benzediğini gösterdi. Aynı zamanda, mikrobiyotanın vücut bölgeleri arasında nakledilmesinin bakteri popülasyon yapısını yalnızca geçici olarak değiştirdiğini de tespit etmişlerdir (Shin ve diğ., 2016).

Taksonomik analiz sonucunda 11 örnekte en yüksek mikroorganizma yoğunluğu Batı Karadeniz'de *Proteobacteria*, Manyas Gölü'nde ve Küçükçekmece Gölü'nde *Firmicutes* şubesinde görüldü. Cins bazında dikkate aldığımızda, Batı Karadeniz'de *Pseudomonas* ve *Enterobacter*, Manyas Gölü'nde *Basillus* ve Küçükçekmece Gölü'nde *Basillus* ve *Acinobacter* cinsinde bakteri yoğunluğu tespit edilmiştir. Tez kapsamında kullanılmak için alınan bakteri izolatlarının, TEMA laboratuvarı çalışanları tarafından belirlenen geleneksel yöntemlerle yapılan tanımlamasına baktığımızda, üç kaynaktan da yüzdesel olarak yoğun bulunan bakteri türlerinin *Proteobacteria* şubesinden olduğunu görüyoruz. Geleneksel kültür yöntemiyle izole edilip API 20E test kiti ile tayin edilen türlerin, metagenomik analiz yöntemiyle belirlenen türlerle uyuşmadığını görmekteyiz.

BK96 noktasından alınan numunede yüzdesel olarak en çok görülen cins *Pseudomonas* olurken tür cinsi henüz tanımlanamamıştır. Bu örnekte, TEMA Laboratuvarı tarafından klasik yöntemle tespit edilen bakteri türü, *Aeromonas* cinsi, *Aeromonas hydrophila* 'dır. *Pseudomonas* ve *Aeromonas*, *Gamaproteobakter* sınıfının ait farklı cinslerdir. *Aeromonas hydrophila*, monotrik bir flagellum içeren, spor oluşturmeyen, Gram negatif, pleomorfik bir basildir. Tatlı su ve kanalizasyonda sıklıkla bulunan fermentatif, oksidaz pozitif, fakültatif bir anaerobdur (Simmons, 2012). Klasik yöntemle tespit edilen bakteri türü ile, metagenomik yöntemle tespit edilen bakteri türü farklı çıkmıştır.

BK117 örneğinin, TEMA laboratuvarı tarafından klasik yöntemle tanımlanması yapılmamış olup, ilk defa metagenomik yöntemle tür analizi yapılmıştır. BK117 noktasından alınan numunede yüzdesel olarak en çok görülen cins *Pseudomonas* olurken tür henüz tanımlanamamıştır., *Pseudomonadaceae* familyasından olan *Pseudomonas* katalaz pozitif, gram negatif, aerobik, çubuk şeklinde bakteri türüdür. Kolay üreyebildikleri için büyük sorun oluşturmaktadır. *Pseudomonas spp.* genel olarak nemli ortamlarda kolaylıkla çoğalabilen, zorunlu aerob bir bakteri olmakla beraber, bu cins içinde bulunan diğer türlerin aksine *P. Aeruginosa* terminal elektron alıcı olarak nitratı kullanabilme özelliği nedeniyle anaerobik koşullarda da varlığını sürdürebilmektedir (Keskin ve Ekmekçi, 2008).

Duman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile *Pseudomonas* türlerinin Türkiye'deki tatlı su balıkları ve su ürünleri yetiştiriciliği çiftliklerindeki sularda görülme sıklığı 2013-2017 ve 2018 yılının iki sezonunu kapsayan dönemde aylık olarak belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen çiftlikler Türkiye'nin altı farklı bölgesinde yer almaktadır. Sudan, hastalıklı ve sağlıklı balıklardan toplam 90 *Pseudomonas* suşu izole edilmiş ve 20 tür altında sınıflandırılmıştır. Suşların fenotipik karakterizasyonu oksidaz ve katalaz aktiviteleri, hemoliz, sıcaklığa tolerans ve sodyum klorür, floresan pigment üretimi ve antibiyotik direnç spektrumlarına dayanmaktaydı. 90 izolatin filogenetik tanımlaması, 16S Rrna'nın kısmi dizilişine dayalı olarak çok genli (*Gyrb*, *rpob* ve *rpod*) çok odaklı dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir. Bu *P. Lundensis*, *P. Brenneri*, *P. Lactis*, *P. Mandelii*, *P. Meridiana*, *P. Defensor*, *P. Haemolytica*, *P. Lurida*, gibi bazı *Pseudomonas* türlerinin izolasyonuna ilişkin ilk rapordur (Duman ve diğ., 2021).

BK93 ve BK56 noktalarından alınan numunelerde yüzdesel olarak en çok görülen cins *Enterobacter* oldu. Enterobakterler, *Enterobacteriaceae* familyasından yaygın bir Gram negatif, fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde, spor oluşturmayan bir bakteri cinsi olarak tanımlanmaktadır. Enterokoklar genellikle basitçe laktik asit üreten bakteriler olarak tanımlanır. *Enterobacteriaceae*'nin tüm üyeleri glikozu asit üretimi ile fermente eder ve nitratları azaltır. *Enterobacteriaceae* içinde belirli fizyolojik organizma grupları tanımlanabilir. *Enterobacteriaceae*, ısıyla işlenmiş gıdaların hijyen ve işlem sonrası kontaminasyonunun yararlı bir göstergesidir. Bu aile, gıda kalitesinin göstergesi olarak ve ayrıca gıda güvenliği için kullanılmıştır (Halkman, 2014). Bu noktalarda en çok görülen tür yeni tanımlanmış suşlardan olan *Enterobacter sp.* NISOC\_03 oldu. 2016 yılında Papizadeh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Ahvaz petrol sahasından petrolle kirlenmiş toprak örnekleri kullanılarak, farklı dibenzotiyofen bozunma yeteneklerine sahip mikroorganizmaları tespit etmek için fenotip ve genotip analizlerine dayalı olarak NISOC-03 suşu kullanılmıştır. NISOC-03 suşu nitrat azaltıcı, oksidaz negatif, katalaz, sitrat ve üreaz pozitif, gram negatif çubuk olarak petrolün toksik etkilerine karşı oldukça dirençlidir (Papizadeh ve diğ., 2016). BK93 örneği klasik yöntemle tanımlanmamışken, BK56 örneği TEMA laboratuvarı çalışanları tarafından, *Pseudomonas luteola* bakteri türü olarak tayin edilmiştir. *Pseudomonas luteola*, nadir görülen fırsatçı bir patojendir. *Pseudomonas luteola* aerobik, spor oluşturmayan, Gram negatif ve çubuk şeklinde bir bakteridir. Bu bakteri, bir veya daha fazla polar flagellanın varlığı nedeniyle hareketlidir. Optimum büyüme sıcaklığı 30°C'dir

(Yousefi, 2014). Klasik yöntemle tespit edilen bakteri türü ile, metagenomik yöntemle tespit edilen bakteri türü farklı çıkmıştır.

BK85 noktasından alınan numunede yüzdesel olarak en çok görülen tür *Kluyvera ascorbata* oldu. *Kluyvera*, insanlarda nadiren enfeksiyonlara neden olan *Enterobacteriaceae* ailesinin nispeten yeni tanımlanan bir üyesidir. Pediatrik popülasyonda, idrar yolu enfeksiyonlarından multiorgan yetmezliği olan sepsise kadar klinik olarak önemli enfeksiyonlarla ilişkili olarak tanımlanmaktadır. *Kluyvera* gram negatif bir basildir.. *Kluyvera* küçük, çok zengin, hareketli, oksidaz negatif, katalaz pozitif bir basildir ve glikozu fermente eder (Öncel ve diğ., 2015). TEMA laboratuvarı tarafından API 20E test kitiyle belirlenen bakteri türü gram-negatif *Burkholderia cepacia* 'dır. *Burkholderia cepacia*, eski adıyla *Pseudomonas cepacia*'nın bir zamanlar tek bir bakteri türü olduğu düşünülüyordu, ancak yakın ilişkili 24 fırsatçı patojen türü içeren *Burkholderia cepacia* kompleksine (Bcc) genişledi. Bu bakteriler, yaygın bir çevresel dağılıma, olağanüstü bir metabolik çok yönlülüğe, üç kromozomlu karmaşık bir genoma ve yüksek hızlı mutasyon ve adaptasyon kapasitesine sahiptir (Tavares ve diğ., 2020). *B. Cepacia* kompleksi (Bcc) içindeki türlerin tanımlanması, fenotipik olarak çok benzer olduklarından ve çoğu ticari bakteri tanımlama sistemi aralarında güvenilir bir şekilde ayırım yapamadığından, genişletilmiş bir biyokimyasal test paneli ile bile yetersiz kalabilir. Ayrıca, bu türlerin *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Comamonas* ve *Delftia* türleri gibi diğer ilgili taksonlardan güvenilir şekilde ayırt edilmesi zordur. Gelişmekte olan ülkelerdeki çoğu durumda, Bcc, özellikle *Pseudomonas* spp., fermente edici olmayan gram-negatif basiller olarak yanlış tanımlanmıştır (Ragupathi, 2019).

M107 noktasından alınan numunede yüzdesel olarak en çok görülen tür *Pseudomonas fluorescens* oldu. *Pseudomonas fluorescens*, yaygın bir gram-negatif, çubuk şeklindeki bakteridir. *P. fluorescens* birden fazla flagella'ya sahiptir. Son derece çok yönlü bir metabolizmaya sahiptir ve toprakta ve suda bulunabilir. *P. fluorescens*'in büyümesi için optimum sıcaklık 25–30 °C'dir. *P. fluorescens*, insanlarda genellikle bakteriyel bir patojen olarak kabul edilmez; bununla birlikte, çok sayıda kültüre dayalı ve kültürden bağımsız çalışmalar, çeşitli vücut bölgelerinin yerel mikrobiyotasında düşük seviyelerde tespit edilmiştir. *P. Fluorescens*, toprak ve rizosferdeki rolü için en yaygın şekilde çalışılmasına

rağmen ,memeli konakçılarda büyüme ve gelişme kabiliyeti sağlayan bir dizi işlevsel özelliğe sahiptir. *P. Fluorescens* insanlarda akut enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *P. Fluorescens* enfeksiyonunun en yaygın bölgesi kan dolaşımıdır (Scales ve diğ.,2014). API 20E test kiti ile belirlenen tür *Aeromonas sobria*' dır. *Aeromonas* spp. Çevresel dağılım, konukçu aralığı ve büyüme koşulları açısından türler ve alt türler arasında önemli heterojenliğe sahip bir *Gammaproteobacteria* cinsidir. Tatlı su balıkları, amfibiler ve sürüngenlerin fırsatçı bir patojeni olarak görülen bu tür balık ve insanlarda hastalıklara sebep olabilir ( Gauthier ve diğ., 2017).

M126 noktasından alınan numunenin neredeyse tamamı Firmucutes şubesine ait *Bacillus* cinsi bakterilerin farklı türlerini içermektedir. % 80 oranla en yüksek bulunan bakteri türü henüz tanımlanmamıştır. % 10 oranıyla tespit edilen diğer bakteri türü *B. Subtilis* olmuştur. *Bacillus* cinsine ait *B. Subtilis*, su, toprak, hava ve birçok bitkiden izole edilebilmektedir (Tam ve ark., 2006; Hong ve ark., 2009). *Bacillus* türleri, çubuk şeklinde, endospor oluşturan aerobik veya fakültatif anaerobik, Gram-pozitif bakterilerdir; bazı türlerde kültürler yaşla birlikte Gram negatife dönüşebilir. Cinsin birçok türü, her doğal ortamda yaşamalarına izin veren çok çeşitli fizyolojik yetenekler sergiler (Turnbull., 1996). TEMA laboratuvarı tarafından API 20E test sistemi ile yapılan tür tayinine göre bu örnek *Aeromonas sobria* olarak tanımlanmıştır.

M127 noktasından alınan numunede, % 10 civarında *Proteobacteria* şubesine ait bakteri yoğunluğu bulunurken , % 90 civarında *Firmicutes* şubesinin farklı türlerinde bakteri yoğunluğu tespit edilmiştir. Bu numunede 2 farklı bakteri şusu görülmesi kültürün yeterince saf olmadığını göstermektedir. %10 oranında *P. fluorescens* bakteri türü tespit edilirken, örnekte en yoğun bulunan bakteri türü % 50 oranıyla civarında *Bacillus* cinsi *Bacillus sp. SGE152(2010)* türüdür. *Bacillus* cinsi bakteriler, gram-pozitif, genellikle aerob, çubuk şeklinde ve endospor oluşturma özelliğine sahiptirler (Logan ve Berkeley, 1984; Kaynar ve Beyatlı, 2006; Ikeda ve ark., 2017). TEMA laboratuvarı tarafından yapılan mikroskopik morfolojik tanımlamada M127 örneğinde tek tür, gram pozitif çomak bir bakteri olduğu tespit belirtilmişti. Morfolojik tespitin örnekte en yoğun oranda bulunan tek tür için doğru tanımlandığını görüyoruz. Ancak API 20E test kiti ile tanımlanan bakterinin bir *Aeromonas* olduğunu görüyoruz. *Aeromonas* cinsine ait *Aeromonadaceae* ailesi bakterilerin taksonomisi, fenotipik tanımlama yöntemleri kullanıldığında karmaşıktır, çünkü bu tür yöntemler tüm türleri doğru bir şekilde tanımlamayabilir. Şimdiye

kadar *Aeromonas* cinsinde 36 tür tanımlanmıştır ve bunların en az 19'u insanlarda ortaya çıkan patojenler olarak kabul edilir ve geniş bir enfeksiyon yelpazesine neden olur. Suşların değişken davranışları nedeniyle fenotipik karakterizasyon kullanarak tür düzeyinde tanımlama yapmak zordur, bu da birçok karışıklığa ve hatalı tanımlamalara neden olmaktadır (Fernández-Bravo ve Figueras, 2020).

M083 noktasından alınan numunede, % 55 civarında *Bacillus sp.* SGE152(2010) türüne ait bakteri yoğunluğu bulunurken , % 45 civarında *Acinetobacter calcoaceticus* türüne ait bakteri yoğunluğu tespit edilmiştir. *Acinetobacter* türleri, kokobasiller şekilli gram negatif aerobik bakterilerdir ve genellikle aerobik, laktoz olmayan fermente edici, güç üremeyen, hareketsiz, katalaz pozitif ve oksidaz negatif olarak tanımlanır. Hastane ortamında yayılma gösteren ve buna bağlı hastalıklara yol açan *Acinetobacter calcoaceticus*, ampisilin ve sefalosporinler dahil birçok antibiyotiğe duyarlılık gösterir (Bonomo, 2012). Bu numunede neredeyse aynı yoğunlukta 2 farklı bakteri türlerinin görülmesi kültürün yeterince saf olmadığını göstermektedir. TEMA laboratuvarı tarafından yapılan API 20E test sistemi ile yapılan tür tayininde, M083 örneği *Burkholderia cepacia* olarak tanımlanmış olup, gram-negatif çomak bir bakteri türü olduğu belirtilmiştir. *Bacillus sp.* SGE152(2010) gram-pozitif çomak bir bakteri türü iken *Acinetobacter calcoaceticus*, gram-negatif ve kokobasildir. Morfolojik tespitin *Acinetobacter calcoaceticus* türü için uyşurken metenegonomik analiz yöntemiyle belirlenen tür ile klasik mikrobiyoloji bakteri tayin yöntemlerinden biri olan API 20E test sistemi ile belirlenen türün birbiriyle uyşmadığını görüyoruz.

C77 noktasından alınan numunede, % 72 civarında *Proteobacteria* şubesine ait *Acinetobacter calcoaceticus* bakteri yoğunluğu bulunurken , % 26 civarında *Firmicutes* şubesinin *Bacillales* takımından tanımlanmayan bir bakteri yoğunluğu tespit edilmiştir. Bu numunede 2 farklı bakteri şubesine ait bakteri türlerinin görülmesi kültürün yeterince saf olmadığını göstermektedir. Yüzdesel olarak en çok görülen tür *Acinetobacter calcoaceticus*' dur. *Moraxellaceae* ailesinden olan *Acinetobacter* cinsi bakteriler; oksidaz negatiftir ve üremek için kültür ortamını aerobik tercih ederler (Bartual ve diğ., 2005). TEMA laboratuvarı tarafından yapılan tanımlamada bakteri türü *Escherichia coli* olarak belirtilmiştir.

C80 noktasından alınan numunede yüzdesel olarak en yoğun bulunan tür % 99 gibi yüksek bir oranla *Firmicutes* şubesinin *Bacillales* takımından taksinomik olarak tanımlanmamış bir bakteridir. Bacillales suşlarının çoğu, toprak ve kil, kayalar, toz, su ortamları, bitki örtüsü, yiyecekler gibi çeşitli ortamlarda bulunan Gram-pozitif, aerobik endospor oluşturan ve çubuk şeklindeki bakterilerdir (Nicholson, 2002). TEMA laboratuvarı tarafından yapılan tanımlamada bakteri türü *Enterobacter cloacae* olarak belirtilmiştir. *Enterobacter* cinsi, yaygın patojenleri içerir ve karmaşık bir taksonomiye sahiptir. Hassas taksonomik atama, mikrobiyoloji için bir temel oluşturur. *Enterobacter cloacae* gibi enterobacter türleri, insan enfeksiyonlarının, özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonların yaygın patojenleridir. Bakteriyel izolatların kesin tür ve alttür tayini, bakterilerin epidemiyolojisini, patogenezi ve mikrobiyolojik özelliklerini anlamak için bir temel oluşturur. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları standart biyokimyasal testlerle fenotipe dayalı tür tayini yapar. Ancak fenotipe dayalı testlerin *Enterobacter*'in yanlış tanımlanmasına neden olduğu ve kesin tür tanımlaması için güvenilir olmadığı bilinmektedir (Wu ve diğ., 2020).

Bazı örneklerde birden fazla bakteri türünün tespit edilmesi elde edilen kültürlerin veya DNA'nın yeterince saf elde edilmediğini göstermektedir. Kültürleme aşamasında yapılan hatalardan kaynaklı bir kontaminasyon oluşmuş olabilir. Aynı anda birden fazla bakteri türü ile çalışılmasından kaynaklı bir kontaminasyon kültürün saflığını olumsuz etkilemiş olabilir. Elde edilen taksonomik sonuçlarda, bazı örneklerin çeşitli taksonomik basamaklarda tespit edilen mikroorganizmaların, kullanılan veri tabanında (SILVA) kayıtlı mikroorganizmalardan herhangi biriyle eşleşmediği görüldü. BK117 ve BK96 örneklerinde en yüksek yoğunlukta tespit edilen *Pseudomonas* cinsi bakterinin türü tanımlanmamıştır (Şekil 4.2- 4.12). M126 örneğinde en yüksek yoğunlukta tespit edilen M126 örneğinde en yüksek yoğunlukta *Basillus* cinsi bakteri türü henüz tanımlanmamıştır (Şekil 4.8). C80 örneğinde en yüksek yoğunlukta tespit edilen *Bacillales* takımından olan bakteri türü henüz tanımlanmamıştır (Şekil 4.12). Gün geçtikçe artan metagenomik çalışmalarla mevcut veriler artmakta ve veri tabanları genişletmektedir. Yapılacak yeni çalışmalar sonucunda keşfedilen mikroorganizmalarla veri tabanlarında tanımlanamayan mikroorganizmaların oranlarını azaltılması beklenmektedir.

Bakteriyel patojenlerin klinik izolatlarının tanımlanması ve karakterizasyonu için geleneksel yöntemler, bazen bu tür izolatlar olağandışı fenotipik profiller sergilediğinde

yetersiz kalmaktadır. DNA dizileme teknolojisindeki son gelişmeler, mikrobiyoloğun bir bakteri izolatının kimliğini belirleme yeteneğini büyük ölçüde artırmıştır. DNA sekans bilgisinin göreceli nesneliliği ve sekans bilgisi veri tabanlarının artan mevcudiyeti göz önüne alındığında, klinik patojenlerin tanımlanması için moleküler metotların kullanılması için şu anda önemli bir hareket yaşanmaktadır (Kolbert, 1999).

Klasik yöntemlerle elde edilen bilgiler, metagenomik analiz sonuçlarıyla karşılaştırılmış ve detaylı mikrobiyal çeşitlilik tespit edilmiştir. Fenotipe dayalı bakteri tür tayininin metagenomik analize oranla yetersiz kaldığı görülmektedir. 1980'lerden beri, ribozomal RNA geni filogenetik çalışmalar için kullanılmıştır ve ribozomal RNA temelli yaklaşımlar, özellikle 16S rRNA kullanılarak bakteri sınıflandırması ve tanımlamasına giderek daha fazla uygulanmaktadır. 16S rRNA geni, işlevsel olarak sabit olduğu, korunmuş ve değişken bölgelere sahip bir yapı mozaiği gösterdiği ve tüm organizmalarda mevcut olduğu için genellikle tanımlama için kullanılacak en iyi moleküler dizilim olarak kabul edilir; ve uzunluğu kolayca sıralanır. Bu özellikler, onu sistematik uygulamalar için benzersiz bir şekilde uygun hale getirir.

KY Yuen ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı bir çalışmada, *Ishalli* bir kemik iliği nakli alıcısının dışkılarından izole edilen bir *Enterobacteriaceae* suşunun klinik kişiliğini belirlemeyi amaçlamışlardır. İzolat, geleneksel fenotipik yöntemlerle cins düzeyinde tanımlanamamıştır ve tam tanımlama için 16S rRNA gen dizilimi kullanılmıştır. İzolat, geleneksel biyokimyasal testler ve ticari olarak mevcut iki sistem, Vitek (GNI+) ve API (20E) sistemleri kullanılarak standart biyokimyasal yöntemlerle fenotipik olarak araştırılırken, genotipik olarak, 16S bakteriyel rRNA genine dayalı çok dizi hizalama ile karşılaştırıldı. Çalışmanın sonucunda 16S rRNA dizilimi, bakteri tanımlaması için altın standart olmaya devam edeceği görülmüştür. Ek testlerin yardımıyla, Vitek GNI+ ve API 20E sistemleri *Enterobacteriaceae* ve yaygın glikoz fermente etmeyen Gram negatif basillerin sırasıyla yalnızca %80,1–94,4 ve %95,6–98,6'sını tanımlayabildi. Ek olarak; Modern teknolojiler, bakterilerin 16S rRNA dizisini temsil eden oligonükleotitlere sahip bir çip üzerinde yüksek yoğunlukta oligonükleotit dizileri oluşturmayı mümkün kılmıştır. Böyle bir tasarım, tavlama işleminin otomasyonunu ve 16S rRNA amplifikasyonunun PCR ürünlerinin saptanmasını kolaylaştıracaktır, dolayısıyla klinik izolatların tanımlanmasını mümkün kılar. Rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında

16S rRNA dizilemesinin kullanılmasının maliyet etkisi değerlendirilmeye devam etse de, mevcut örnek, bir klinik izolatin ilişkisini saptamak için 16S rRNA dizilemesinin yararlılığını göstermiştir ( KY Yuen ve diğ., 2000 ).

Bu tez kapsamında İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı (TEMA) Laboratuvarı tarafından Küçükçekmece Gölü, Manyas Gölü ve Batı Karadeniz gibi farklı kaynaklardan alınarak oluşturulmuş bakteri izolatlarının metagenomik analizi yapılmıştır. TEMA Laboratuvarı tarafından geleneksel biyokimyasal testler ve ticari olarak mevcut API 20E test sistemi ile kullanılarak standart biyokimyasal yöntemlerle fenotipik olarak tanımlanan izolatlar, genotipik olarak, 16S bakteriyel rna geni, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edildi ve sekanslandı. PCR ürününün dizisi, SILVA ( Version 99) veri tabanındaki bilinen 16S rRNA gen dizileri ile çoklu dizi hizalaması ile karşılaştırıldı. Bu çalışma klasik mikrobiyolojinin bittiği yerde moleküler tekniklerin ve özellikle NGS'in başladığını göstermesi açısından öncü olacaktır. API 20E test sistemleri gibi sadece sınırlı sayıdaki mikroorganizma yelpazesini tespit eden yöntemlere kıyasla metagenomik yöntemlerle çok sayıda mikroorganizmayı tek seferde analiz edebilmek gelecekte bizlere büyük avantajlar sağlayacaktır. Bu çalışma, klasik yöntemler kullanılarak yapılan fenotipik tanımlamaların hatalara yol açabileceğini ve dolayısıyla daha güvenilir, ucuz ve hızlı tanımlama yöntemlerinden olan Metagenomik analizlerin önemini gösteren örnek bir çalışma olarak değerlendirilebilir.

## KAYNAKLAR

Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri, Bakteriler, Hafta 3, [https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/97917/mod\\_resource/content/0/4.%20HAFTA\\_BAKTER%20GENEL%20ZELL%20KLE%20R%29.pdf#:~:text=3.1.,ve%20bitkisel%20organizmalarda%20hastal%20yaparlar](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/97917/mod_resource/content/0/4.%20HAFTA_BAKTER%20GENEL%20ZELL%20KLE%20R%29.pdf#:~:text=3.1.,ve%20bitkisel%20organizmalarda%20hastal%20yaparlar), [Ziyaret Tarihi: 24 Ocak 2020].

Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri, Mikroorganizmaların izolasyon ve identifikasyonu, Hafta 13, [https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/97486/mod\\_resource/content/0/13.hafta\\_Mikroorganizmalar%20izolasyon%20ve%20identifikasyonu.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/97486/mod_resource/content/0/13.hafta_Mikroorganizmalar%20izolasyon%20ve%20identifikasyonu.pdf), [Ziyaret Tarihi: 24 Ocak 2020].

Alves, L.F., Westmann, C.A., Lovate, G.L., Siqueira, G.M.V., Borelli, T.C. and Guazzaroni, M.E., 2018, Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science, *International Journal of Genomics*, 2312987.

Aras, Z., 2011, Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri, *Türkiye Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68 (2), 97-104.

Arda, M., 2000, *Temel Mikrobiyoloji*, İkinci Baskı (Genişletilmiş), Medisan Yayın Serisi, 46, 548.

Arusha, B., 2016, Ribosomal RNA in Microbial Taxonomy: Cells, <https://www.biologydiscussion.com/cell/ribosomal-rna-in-microbial-taxonomy-cells/71548>, [Ziyaret Tarihi: 24 Ocak 2020].

Aswathi, P., 2016, Taxonomy: Definition, Objectives and Characteristics, <https://www.biologydiscussion.com/bacteria/taxonomy-definition-objectives-and-characteristics/49718>, [Ziyaret Tarihi: 24 Ocak 2020].

Aşan A., 1991, Bakterilerin Sınıflandırılması, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 25, 388.

Bartual, S.G., Seifert H., Hippler C., Luzon, M.A.D., Wisplinghoff, H., Rodríguez-Valera F., 2005, Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *acinetobacter baumannii*, *Journal Clinic Microbiology*, 43 (9), 4382-90.

Bharagava, R.N., Purchase, D., Saxena, G., Mulla, S.I., 2019, Applications of metagenomics in microbial bioremediation of pollutants: from genomics to environmental cleanup, *Microbial Diversity in the Genomic Era*, In: Das, S., and Dash, H.R., (ed.), Chapter 26, Academic Press, Elsevier Limited, United States, 459-477.

Black, J.G., 2012, *Microbiology Principles and Explorations*, 8<sup>nd</sup> ed., New Jersey, ISBN-13: 978-1118285954.

Bonomo, R., 2012, Diseases caused by *acinetobacter* and *stenotrophomonas* species, *Goldman's Cecil Medicine*, 24<sup>nd</sup> ed., In: Goldman, L., Schafer, A.I., (ed.), Elsevier Limited, Philadelphia, 1881-1884.

Biomerieuxdirect.com, API Reference Guide, 2019, <https://www.biomerieux-usa.com/clinical/api>, [Ziyaret Tarihi: 24 Ocak 2020].

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D., 2007, A detailed analysis of 16s ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria, *Journal Microbiology Methods*, 69 (2), 330-9.

Chauhan, T., 2020, What is Metagenomics?-Definition, Steps, Process and Applications, Geneticeeducation.co, <https://geneticeeducation.co.in/what-is-metagenomics-definition-steps-process-and-applications/>, [Ziyaret Tarihi: 24 Ocak 2020].

Clos-Garcia, M., Andrés-Marin, N., Fernández-Eulate, G., Abecia, L., Lavín, J.L., Liempd, S.V., Cabrera, D., Royo, F., Valero, A., Errazquin, N., Vega, M.C.G., Leila Govillard, L., Michael R. Tackett, M.R., Tejada, G., González, E., Anguita, J., Bujanda, L., Orcasitas, A.M.C., Aransay, A.M., Maíz, O., Munain, A.L., Falcón-Pérez, J.M., 2019, Gut microbiome and serum metabolome analyses identify molecular biomarkers and altered glutamate metabolism in fibromyalgia, *Elsevier BioMedicine*, 46, 499-511.

- Cseke, L.J., Kaufman, P.B., Podila, G.K., Chung-Jui, 2004, *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, CRC Press, New York, eBook ISBN: 9780429125928, 1-24.
- Culligan, E.P., Sleator, R.D., Marchesi J.R., and Hill C., 2014, Metagenomics and Novel Gene Discovery, *Virulence*, 5 (3).
- Çetin, C., 2015, *Bakterilerin Genel Özellikleri*, Temel Veteriner Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, In: Carlı, K.T. (ed.), Chapter 1, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını, Eskişehir, ISBN 978-975-06-1012-7, 2338 (4), 3-4.
- Çökmüş C., 2010, *Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Palme Yayınları, Ankara, 532.
- Dash, H.R., Das, S., 2018, Molecular methods for studying microorganisms from atypical environments, *methods in microbiology*, In: Gurtler, V., Trevors, J.T. (ed.), Chapter 4, Elsevier Ltd., ISBN: 978-0-12-814604-0, 45, 89.
- Duman, M., Mulet, M., Altun, S., Saticioglu, I.B., Ozdemir, B., Lalucat, J., Ajmi, N., García-Valdés, E., 2021, The diversity of pseudomonas species isolated from fish farms in Turkey, *Aquaculture*, 535, 736369.
- Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozano, E.E., Raggi, L., Segovia, L., Merino, E., Gutiérrez-Rios, R.M., Juarez, K., Licea-Navarro, A.F., Pardo-Lopez, L., Florez, A.S., Sanchez-Flores, A., 2018, Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics, *Science Report*, 8 (1), 12034.
- Fernández-Bravo, A., Figueras, M.J., 2020, An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity, *Microorganisms*, 8 (1), 129.
- Garg, M., 2016, Bacterial Taxonomy: Meaning, Importance and Levels, <https://www.biologydiscussion.com/bacteria/bacterial-taxonomy/bacterial-taxonomy-meaning-importance-and-levels/54679>, [Ziyaret Tarihi: 24 Ocak 2020].
- Gauthier, J., Vincent, A.T., Charette, S.J., Derome, N., 2017, Strong genomic and phenotypic heterogeneity in the *aeromonas sobria* species complex, *Frontiers in Microbiology*, 8, 2434.

- Ghosh A., Mehta A., Khan A.M., 2019, *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 3, 184-193.
- Halkman, H.B.D., Halkman A.K., 2014, Indicator Organisms, *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2<sup>nd</sup> ed., Reference Module in Food Science, In: Batt, C., and Patel, P., (ed.), Elsevier Ltd., USA, ISBN: 978-0-12-384733-1, 358-363.
- Handelsman, J., 2004, Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (4), 669-685.
- Hong, H. A., Khaneja, R., Tam, N. M., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M., Brisson, A., Gasbarrini, A., Barnes, I., Cutting, S. M., 2009, *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract, *Research in Microbiology*, 160, 134-143.
- Ikeda, A., Kim, D., Hashidoko, Y., 2017, Identification of diacetonamine from soybean curd residue as a sporulation inducing factor toward *Bacillus spp.*, *AMB Express*, 7, 101.
- Jongman, M., Carmichael, P.C., Bill, M., 2020, Technological advances in phytopathogen detection and metagenome profiling techniques, *Current Microbiology*, 77, 675-681.
- Kaynar, P., Beyatlı, Y., 2006, Balıklardan izole edilen bacillus cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4 (3), 1-30.
- Keskin, D., Ekmekçi, S., 2018, *Pseudomonas aeruginosa*'nın dirençli olduğu dezenfektanların saptanması, *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5 (1), 27-32.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. and Glöckner, F.O., 2013, Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and nextgeneration sequencing-based diversity studies, *Nucleic acids Research*, 41 (1).

- Kolbert, C. and Persing, D., 1999, Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens, *Current Opinion in Microbiology*, 2, 299-305.
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W.A., González, A., Caporaso, G. J. and Knight, R., 2011, Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities, *Current Protocols in Bioinformatics*, 10, 7.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace N.R., 1985, Filogenetik analizler için 16S ribozomal RNA dizilerinin hızlı belirlenmesi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82 (20), 6955-9.
- Letunic, I., Bork, P., 2007, Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation, *Bioinformatics*, 23 (1), 127-8.
- Logan, N.A., Berkeley, R.C.W., 1984, Identification of Bacillus strains using the API system, *Microbiology*, 130 (7), 1871-1882.
- Martin, E., Lina, G., Dumitrescu, O., 2014, *Staphylococcus aureus*, Encyclopedia of Food Microbiology, 2<sup>nd</sup> ed., In: Batt, C., and Patel, P., (ed.), Elsevier Ltd., USA, ISBN: 978-0-12-384733-1, 501-507.
- Matlock, B., 2015, Assessment of nucleic acid purity, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA.
- McMurray D.N., 1996 *Medical Microbiology. 4th edition*, In: Baron, S.(ed.), University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas, ISBN-10: 0-9631172-1-1, 33.
- Nair, H.P., Bhat, S.G., 2020, Metagenomic data on bacterial diversity profiling of Arabian sea sediment by amplicon sequencing, 11 (28), 104791.
- Nguyen, N.P., Warnow, T., Pop, M. and White, B., 2016, A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity, *npj Biofilms and Microbiomes*, 2, 16004.
- Nicholson, W.L., 2002, Roles of *Bacillus* endospores in the environment, *Cellular and molecular life sciences*, 59, 410-6.

- Oral, M., 2018, Biyoteknolojinin güncel uygulamalarının su ürünleri genetik alanında kullanılması: yeni nesil dizileme teknolojileri, *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 4 (3), 192-204.
- Oulas, A., Pavludi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G.A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C. and Iliopoulos, I., 2015, Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies, *Libertas academica*, 9, 75-88.
- Öncel, E.K., Özsürekci, Y., Akyön, Y., Gür, D., Cengiz, A.B., Kara, A., 2015, Kluyvera ascorbata infections in children: a case series, *Turkish Pediatric Association*, 50 (2), 123-128.
- Papizadeh, M., Roayaei Ardakani, M. and Motamedi, H., 2017, Growth-phase dependent biodesulfurization of dibenzothiophene by enterobacter sp. strain NISOC-03, *Pollution*, 3 (1), 101-111.
- Parente, E., Ricciardi, A., Zotta, T., 2020, The microbiota of dairy milk: A review, *International Dairy Journal*, 107, 104714.
- Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A. and Versalovic, J., 2009, Metagenomic pyrosequencing and microbial identification, *Clinical Chemistry*, 55 (5), 856-66.
- Pichler, M., Coskun, Ö.K., Ortega-Arbulú, A.S., Conci, N., Wörheide, G., Vargas, S. and Orsi, W.D., 2018, A 16S rRNA gene sequencing and analysis protocol for the Illumina MiniSeq platform, *Microbiology Open*, 7 (6).
- Prieto, B., Menéndez, F.V.A., 2014, *Advances in Clinical Chemistry*, 65, 43-67.
- Ragupathi, N.K.D. and Veeraraghavan, B., 2019, Accurate identification and epidemiological characterization of Burkholderia cepacia complex: an update, *Annals of Clinic Microbiology and Antimicrobiology*, 18, 7.

- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467.
- Scales, B.S., Dickson, R.P., LiPuma, J.J., and Huffnagle G.B., 2014, Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans, *American Society for Microbiology, Clinic Microbiology Review*, 27 (4), 927–948.
- Schloss, P.D. and Handelsman, J., 2003, Biotechnological prospects from metagenomics, *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (3), 303-10.
- Shin, H., Price, K., Albert, L., Dodick, J., Park, L., Dominguez-Bello, M.G., 2016, Changes in the Eye Microbiota Associated with Contact Lens Wearing, Washington, D.C., *American Society for Microbiology*, 7 (2), e00198-16.
- Simmons, J., Gibson, S., 2012, Nonhuman Primates in Biomedical Research, 2<sup>nd</sup> ed., Diseases, *American College of Laboratory Animal Medicine*, 105-172.
- Tam, N.K.M., Uyen, N.Q., Hong, H.A., Duc, L.H., Hoa, T.T., Serra, C.R., Henriques, A.O., Cutting, S.M., 2006, The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives, *Journal of Bacteriology*, 188, 2692-2700.
- Tavares, M., Kozak, M., Balola, A., Sá-Correia, I., 2020, Burkholderia cepacia complex bacteria: a feared contamination risk in water-based pharmaceutical products, *Clinic Microbiology Review*, 33 (3), e00139-19.
- T.C. MEB Yayıncılık Hayvan Sağlığı Mikroorganizmaların Özellikleri, 2015, Ankara, 29-34,  
[http://megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller\\_pdf/Mikroorganizmalar%C4%B1n%20%C3%96zellikleri.pdf](http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Mikroorganizmalar%C4%B1n%20%C3%96zellikleri.pdf), [Ziyaret Tarihi: 24 Ocak 2020].
- Thaochan, N., Drew, R.A.I., Hughes, J.M., Vijayasegaran, S., Chinajariyawong, A., 2010, alimentary tract bacteria isolated and identified with API-20E and molecular cloning techniques from Australian tropical fruit flies, *Bactrocera cacuminata* and *B. tryoni*, *Journal of Insect Science*, 10, 131.

- Thenmozhi, S., Moorthy, K., Sureshkumar, B. T., Suresh, M., 2014, Antibiotic resistance mechanism of esbl producing enterobacteriaceae in clinical field: A Review, *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 2 (3), 207-226.
- Tringe, S.G., Hugenholtz, P., 2008, *A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene*, Current Opinion in Microbiology, In: Fernandes, P., Pizza, M., Brinkman, F., Parkhill, J. (ed.), 11 (5), 442-446.
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F., 2015, *A 123 of Metagenomics*. In: Nelson, K.E. (ed.) Encyclopedia of Metagenomics, Springer, Boston, ISBN: 978-1-4899-7477-8.
- Turan, M.K., Günay, Ö.C., Kayış, S.A., Çörtük, M., 2018, Mikrobiyotada 16s rRNA ve basit biyoinformatik analizler, *Journal Biotechnol and Strategic Health*, 2 (1), 23-34.
- Turnbull, P.C.B., 1996, *Bacillus. Medical Microbiology*, 4<sup>nd</sup> ed., In: Baron, S., (ed.), Chapter 15, Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas.
- Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S., Çakiris, A., 2011, Yeni Nesil Dizileme, İstanbul Üniversitesi Genetik Anabilim Dalı, *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1 (1), 11-18.
- Yang, B., Wang, Y. and Qian, P.E., 2016, Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis, *Biomed Central Bioinformatics*, 17 (135).
- Yousefi, F., Shoja, S., Honarvar, N., 2014, Empyema Caused by *Pseudomonas luteola*: A Case Report, *Jundishapur University of Medical Sciences*, 7 (7), e10923.
- Wang, X., Jordan, I.K., Mayer, L.W., 2015, A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology, *Molecular Medical Microbiology*, 2<sup>nd</sup> ed., In: Tang, Y., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., Schwartzman, J., (ed.), *Academic Press*, London, USA, ISBN: 978-0-12-397169-2, 517-536.
- Woo, P.C.Y., Leung, P.K.L., Leung, K.W., Yuen, K.Y., 2000, Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of an Enterobacteriaceae species from a bone marrow transplant recipient, *Journal of Clinical Pathology*, 53 (4), 211-215.

Wu, W., Feng, Y., Zong, Z., 2020, Precise Species Identification For Enterobacter: A Genome Sequence-Based Study With Reporting Of Two Novel Species, Enterobacter Quasiroggkampii sp. nov. and Enterobacter Quasimori sp., *Microbial Systems*, 5 (4), e00527-20.



**EKLER**

Her bir örnek için ‘Taksonomik Analiz Sonuçları’ dosyasında, tür basamağında yer alan mikroorganizma oranları EK 1- 11 ‘te verilmiştir.



**EK 1:** BK117 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları.

<b>Alem-Tür Adı</b>	<b>Mikroorganizma Oranı (%)</b>
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas;Ambiguous_taxa	98,937
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas;s__Pseudomonas resinovorans	0,977
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f Pseudomonadaceae;g Pseudomonas;s Pseudomonas pseudoalcaligenes	0,038
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales; f__Pseudomonadaceae; g__Pseudomonas;s__Pseudomonas fragi	0,010
k Bacteria;p Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Ruminococcaceae;g__Ruminococcus 1;s__uncultured bacterium	0,004
k Bacteria;p Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Lachnospiraceae;g__Roseburia;s__uncultured bacterium	0,004
k Bacteria;p Proteobacteria;c Betaproteobacteria;o Burkholderiales;f Comamonadaceae;g__uncultured; Ambiguous_taxa	0,002
k Bacteria;p Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Lachnospiraceae;g__ [Ruminococcus] gauvreauii group;s__uncultured bacterium	0,002
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Rahnella;s__Rahnella sp, LR113	0,002
k Bacteria;p Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Ruminococcaceae;g__Faecalibacterium;s__uncultured bacterium	0,002
k Bacteria;p Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Clostridiaceae 1;g__Clostridium sensu stricto 1;s__uncultured bacterium	0,002
k Bacteria;p Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Lachnospiraceae;g__Lachnospiraceae NK4A136 group;s__uncultured bacterium	0,002
k Bacteria;p Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Lachnospiraceae;g__Lachnoclostridium;s__uncultured bacterium	0,002

**EK 2:** BK96 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları

<b>Alem-Tür Adı</b>	<b>Mikroorganizma Oranı (%)</b>
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;Ambiguous_taxa	86,487
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas fragi	12,839
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudoalteromonas sp. AB_79	0,474
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_uncultured bacterium	0,044
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas sp. E7	0,098
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_uncultured Pseudomonas sp.	0,023
k Bacteria;p Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Lachnospiraceae;g_[Eubacterium] rectale group;s_uncultured bacterium	0,004
k Bacteria;p Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Ruminococcaceae;g_Faecalibacterium;s_uncultured bacterium	0,006
k Bacteria;p Actinobacteria;c Actinobacteria;o Bifidobacteriales;f Bifidobacteriaceae;g_Bifidobacterium;s_uncultured bacterium	0,004
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas putida	0,008
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas sp, AB_46	0,001
k Bacteria;p Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Lachnospiraceae;g_Fusicatenibacter;s_uncultured bacterium	0,004
k Bacteria;p Firmicutes;c Clostridia;o Clostridiales;f Lachnospiraceae;g_Roseburia;s_uncultured bacterium	0,006
k Bacteria;p Bacteroidetes;c Bacteroidia;o Bacteroidales;f Bacteroidaceae;g_Bacteroides; Ambiguous_taxa	0,001

**EK 3:** BK93 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları

<b>Alem-Tür Adı</b>	<b>Mikroorganizma Oranı (%)</b>
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Enterobacter;s__Enterobacter sp. NISOC_03	81,710
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Kluyvera;s__Kluyvera ascorbata	17,751
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Enterobacter;s__uncultured bacterium	0,221
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;s;d Enterobacteriaceae;g Enterobacter;s Enterobacter sp. enrichment culture clone HSL19	0,087
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Erwinia;s__Erwinia billingiae	0,072
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;Ambiguous taxa;Ambiguous_taxa;Ambiguous_taxa	0,036
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Klebsiella;s__Klebsiella oxytoca	0,034
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Raoultella;s__Lelliottia amnigena	0,021
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Enterobacter;Ambiguous_taxa	0,016
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f Enterobacteriaceae;g Enterobacter;s Enterobacter sp. enrichment culture clone HSL94	0,013
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f Enterobacteriaceae;g Enterobacter;s Enterobacter sp, enrichment culture clone HSL94	0,012
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae; Ambiguous_taxa;s__uncultured bacterium	0,004

**EK 4:** BK85 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları

<b>Alem-Tür Adı</b>	<b>Mikroorganizma Oranı (%)</b>
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Kluyvera;s_Kluyvera ascorbata	87,811
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Enterobacter;s_Enterobacter sp. NISOC_03	10,527
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Klebsiella;Ambiguous_taxa	0,955
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Klebsiella;s_Klebsiella sp. B12	0,308
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Erwinia;s_Erwinia billingiae	0,277
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Moraxellaceae;g_Acinetobacter;s_Acinetobacter calcoaceticus	0,048
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Klebsiella;s_uncultured Klebsiella sp.	0,031
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Klebsiella;s_uncultured organism	0,007
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Klebsiella;s_Klebsiella sp, 8,1T	0,007
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Klebsiella;s_uncultured bacterium	0,005
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Klebsiella;s_Klebsiella pneumoniae	0,005
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;Ambiguous_taxa;Ambiguous_taxa	0,005
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Klebsiella;s_Klebsiella oxytoca	0,005
k Bacteria;p Actinobacteria;c Acidimicrobiai;o Acidimicrobiales;f uncultured; Ambiguous_taxa; Ambiguous_taxa	0,003

**EK 5:** BK56 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları

<b>Alem-Tür Adı</b>	<b>Mikroorganizma Oranı (%)</b>
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Enterobacter;s__Enterobacter sp. NISOC_03	99,636
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Kluyvera;s__Kluyvera ascorbata	0,310
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Raoultella;s__Lelliottia amnigena	0,013
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp, SGE152(2010)	0,013
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus; Ambiguous_taxa	0,009
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Citrobacter; Ambiguous_taxa	0,004
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus subtilis	0,003
k Bacteria;p Planctomycetes;c Phycisphaerae;o Tepidisphaerales;f Tepidisphaeraceae;g__uncultured bacterium;s__uncultured bacterium	0,003
k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhizobiales;f Rhizobiales Incertae Sedis;g__Nordella;s__uncultured bacterium	0,003
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas; Ambiguous_taxa	0,003
k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Rhodospirillales;f__Rhodospirillaceae;g__Skermanella;s__uncultured soil bacterium	0,003

**EK 6:** M107 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları

<b>Alem-Tür Adı</b>	<b>Mikroorganizma Oranı (%)</b>
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas fluorescens	96,786
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas aeruginosa	1,859
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_uncultured bacterium	0,806
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas putida	0,113
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;Ambiguous_taxa	0,091
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas sp. ZZ-11	0,080
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas sp. T5(2015)	0,063
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas sp. E5(2010)	0,047
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas sp. ST17	0,036
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_uncultured gamma proteobacterium	0,030
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas sp. SD-09	0,025
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas sp. PRI5	0,025
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_Pseudomonas sp, PRI5	0,009
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadale s;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas;s_uncultured Pseudomonas sp,	0,004

**EK 7:** M126 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları

<b>Alem-Tür Adı</b>	<b>Mikroorganizma Oranı (%)</b>
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;Ambiguous_taxa	81,160
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus subtilis	18,093
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus pumilus	0,450
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp. DU183(2010)	0,123
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus mojavensis	0,041
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__uncultured Bacillus sp.	0,031
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__uncultured bacterium	0,021
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus safensis	0,014
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Enterobacter;s__Enterobacter sp, NISOC_03	0,014
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g__Bacillus;s__Bacillus sp, STG-83	0,014
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__Kluyvera;s__Kluyvera ascorbata	0,013
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas; Ambiguous_taxa	0,013
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp, PK-2013-B3	0,013

**EK 8:** M127 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları

<b>Alem-Tür Adı</b>	<b>Mikroorganizma Oranı (%)</b>
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp. SGE152(2010)	50,336
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas;s__Pseudomonas fluorescens	10,081
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;Ambiguous_taxa	29,444
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus subtilis	5,019
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__uncultured Firmicutes bacterium	0,962
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus niabensis	0,702
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp. JM-267	0,605
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus aquimaris	0,562
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp. PJE7	0,403
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Geobacillus sp. RSNPB7	0,380
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp. IGCAR-1/07	0,299
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas;s__Pseudomonas aeruginosa	0,237
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp. CECT 8480	0,233
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas;s__uncultured bacterium	0,116

EK 9: M083 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları

Alem-Tür Adı	Mikroorganizma Oranı (%)
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp. SGE152(2010)	54,210
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;g__Acinetobacter;s__Acinetobacter calcoaceticus	43,263
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;Ambiguous_taxa	0,932
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;g__Acinetobacter;Ambiguous_taxa	0,683
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp. JM-267	0,366
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus simplex	0,093
k Bacteria;p Proteobacteria;c Alphaproteobacteria;o Caulobacterales;f__Caulobacteraceae;g__Brevundimonas;s__Brevundimonas sp. Tibet-IBa1	0,077
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;g__Acinetobacter;s__uncultured bacterium	0,070
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp. FJAT-25788	0,066
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;g__Acinetobacter;s__Acinetobacter sp. J54C10A	0,058
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__Bacillus sp. PJE7	0,031
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;g__Acinetobacter;s__Acinetobacter sp. A4-6	0,026
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;g__Acinetobacter;s__Acinetobacter sp. L176(2011)	0,021
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s__bacterium 8-gw3-4	0,018

**EK 10:** C77 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları

<b>Alem-Tür Adı</b>	<b>Mikroorganizma Oranı (%)</b>
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Moraxellaceae;g_Acinetobacter;s_Acinetobacter calcoaceticus	71,947
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;Ambiguous taxa;Ambiguous_taxa	26,594
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Moraxellaceae;g_Acinetobacter;Ambiguous_taxa	1,069
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Moraxellaceae;g_Acinetobacter;s_uncultured bacterium	0,082
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Moraxellaceae;g_Acinetobacter;s_Acinetobacter sp. J54C10A	0,059
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;Ambiguous_taxa	0,054
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Lactobacillales;f Streptococcaceae;g_Streptococcus;s_Streptococcus pneumoniae	0,054
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s_Bacillus mycoides	0,032
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Moraxellaceae;g_Acinetobacter;s_Acinetobacter sp. A4-6	0,023
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Moraxellaceae;g_Acinetobacter;s_Acinetobacter sp. L176(2011)	0,022
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f_Moraxellaceae;g_Acinetobacter;s_Acinetobacter sp, W-17	0,010
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s_Bacillus cereus	0,010
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s_Bacillus thuringiensis	0,007
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_Enterobacter;s_Enterobacter sp, NISOC_03	0,007

**EK 11:** C80 örneğinin tür bazında mikroorganizma oranları

<b>Alem-Tür Adı</b>	<b>Mikroorganizma Oranı (%)</b>
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;Ambiguous taxa;Ambiguous_taxa;Ambiguous_taxa	99,311
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Lactobacillales;f Streptococcaceae;g Streptococcus;s Streptococcus pneumoniae	0,252
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;Ambiguous_taxa	0,183
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s Bacillus mycoides	0,100
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s Bacillus cereus	0,068
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s Bacillus thuringiensis	0,034
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s Bacillus pseudomycoides	0,010
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s Bacillus sp, A-BT-221	0,006
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Pseudomonadales;f Moraxellaceae;g Acinetobacter;s Acinetobacter calcoaceticus	0,006
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s Bacillus sp, CF-S21	0,006
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s Bacillus weihenstephanensis	0,006
k Bacteria;p Firmicutes;c Bacilli;o Bacillales;f Bacillaceae;g Bacillus;s Paenibacillus larvae	0,003
k Bacteria;p Proteobacteria;c Gammaproteobacteria;o Enterobacteriales;f Enterobacteriaceae;g Enterobacter;s Enterobacter sp, NISOC_03	0,003

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Merve AÇIL
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İnönü Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	06.07.2017

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	