

**TUZ GÖLÜ VİRAL ÇEŞİTLİLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ece ALBAYRAK

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak-2013

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1208F135**

JURİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ece Albayrak' ın "Tuz Gölü Viral Çeşitliliğın Araştırılması" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 14.12.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. M. Burçin MUTLU
Üye : Prof. Dr. Kıymet GÜVEN
Üye : Doç. Dr. Ahmet ÇABUK
Üye : Yard. Doç. Dr. Gökalp İŞCAN
Üye : Yard. Doç. Dr. İsmail POYRAZ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... Tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TUZ GÖLÜ VİRAL ÇEŞİTLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ece ALBAYRAK

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. M. Burçin MUTLU
2012, 121 sayfa

Virüslerin sucul ortamlarda yüksek oranda bulunduğu ve bu ortamlardaki mikrobiyal biyokütle, populasyon ve genetik çeşitliliği ve dolayısıyla uzun dönemli evrimi etkileyen ana faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir. Bu rollerinden dolayı viral çeşitliliğin belirlenmesi günümüzde birçok araştırmanın ana basamakları arasında yer almaya başlamaktadır.

Bu çalışmada mikroskopi ve moleküler genetik temelli yöntemler ile Tuz Gölü'ndeki viral çeşitlilik belirlenmiş ve kültür-bağımsız yaklaşımlar ile incelenmiştir. Su örneğindeki viral yoğunluk, SYBR Gold boyama sonucu epifluoresan mikroskopi (EFM) kullanımıyla mililitrede yaklaşık 10^9 VLP (virüs benzeri partikül) olarak belirlenmiştir. Su örneğinin filtrasyonu ve konsantrasyonunun ardından gerçekleştirilen atımlı-alan jel elektroforezi (PFGE) ile viral topluluğun genom büyüklüğünün 30-40 kb arasında dominant olduğu görülmüştür. Geçirimli elektron mikroskopi (TEM) ile virüs partiküllerinin oldukça çeşitli morfolojilere sahip olduğu saptanmıştır. Küresel halovirüsler ve iğ şekilli virüsler çeşitliliğin büyük bir kısmını oluştururken, baş ve kuyruk yapıdaki virüslerin çeşitliliğin yaklaşık %4'ünü oluşturduğu belirlenmiştir. Belirlenen filament şekilli ve kın şekilli virüslere günümüze kadar hipersalin ortamlardan yalnızca Büyük Tuz Gölü (Utah) ve İspanya'da solar tuzlada rastlanmıştır. Günümüze kadar hipersalin ortamlarda görülmemiş kurşun-benzeri morfolojiye sahip virüslere ilk defa bu çalışma ile Tuz Gölü'nde rastlanmış ve çeşitliliğin yaklaşık %12'sini oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca total viral DNA ekstrakte edilmiş ve fosmid vektörler kullanımı ile metagenomik kütüphane oluşturulmuştur. Bu tez çalışması ile Tuz Gölü viral çeşitliliği ilk kez ortaya konmuş ve karakterize edilmiştir.

Bu çalışmayı desteklemek amacıyla ortamdaki mikrobiyal çeşitlilik denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) ile belirlenmiş ve *Haloquadratum* ve *Salinibacter* strainlerinin sırasıyla *Archaea* ve *Bacteria* domainlerinde baskın olduğu görülmüştür. Floresan In-situ hibridizasyon (FISH) ile *Archaea* domaini üyelerinin daha baskın olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Tuz Gölü, Halovirüs, Kültür-bağımsız yaklaşımlar.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION of VIRAL DIVERSITY in TUZ LAKE

Ece ALBAYRAK

Anadolu University, Graduate School of Sciences
Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. M. Burçin MUTLU
2012, 121 pages

Viruses exist high levels in the aquatic environments and it is believed that they are the main factors that affect the microbial biomass, population and genetic diversity and also long term evolution. Because of these roles, to determine the viral abundance becomes the main step of many studies.

With this study the viral diversity in Tuz Lake was determined by using microscopy and molecular genetic based methods and examined with culture-independent approaches. Viral abundance was determined as 10^9 VLP/ml with using Epifluorescence Microscopy (EFM) after SYBR Gold staining of water sample. Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) was performed after filtration and concentration of water sample, and dominant bands were found nearly 30-40 kb in viral assemblage. By Transmission Electron Microscopy (TEM) virus particles were detected with different morphologies. Icosahedral viruses and spindle-shaped viruses were constitute high range of viral diversity whereas head and tail viruses were formed nearly 4% of viral diversity. The filamentous and rod-shaped viruses were seen in Tuz Lake, and also until today they only seen in Great Salt Lake (Utah) and solar saltern in Spain. Also, the bullet-shaped virus morphology determined the first time in Tuz Lake with this study and consists nearly 12% of viral diversity. Viral DNA was extracted and cloned in fosmid vectors to generate metagenomic library. This was the first time that viral diversity of Tuz Lake was propounded and characterized.

Microbial diversity was also investigated, by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) *Haloquadratum* and *Salinibacter* were found dominant in *Archaea* and *Bacteria* domains, in respectively. Fluorescence In-situ Hybridization (FISH) the community was detected dominant in *Archaea* domain.

Key Words: Tuz Lake, Haloviruses, Culture-independent approaches.

TEŞEKKÜR

Çalışma konumun seçiminde bana önderlik eden ve araştırmalarım boyunca bana tecrübesi ve bilgileriyle her türlü yardım ve katkılarını esirgmeden yol gösteren ve örnek almaya çalıştığım değerli tez hocam Sayın Doç. Dr. M. Burçin MUTLU'ya teşekkürü borç bilirim.

Erasmus öğrenci değişimi programı ile 1 senelik süre için bulunduğum Alicante Üniversitesi, İspanya'da, çalışmamı gerçekleştirme fırsatını sağlayan ve laboratuvarını bana açan Prof. Dr. Josefa ANTON'a ve oradaki çalışmalarım boyunca bana her türlü yardımı gösteren çalışma arkadaşlarım Fernando Santos, Judith Villamor ve Cristina Lopez'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden manevi desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Seval ÇINAR, Miyesser AYCAN ve Arş. Gör. Dr. Rasime DEMİREL'e teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca gösterdikleri anlayış ve destekleri için sevgili aileme teşekkürü borç bilirim.

Ece ALBAYRAK

Ocak, 2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
1.1.Ekstrem Çevreler	2
1.1.1. Hipersalin Ortamlar	2
1.2. Dünyadaki Hipersalin Ortamlar	3
1.2.1. Ölü Deniz (Dead Sea)	3
1.2.2. Büyük Tuz Gölü (Great Salt Lake).....	3
1.2.3. Wadi Natrun Gölleri.....	4
1.2.4. Alkalin Hipersalin Göller	4
1.3. Türkiye’deki Hipersalin Ortamlar	5
1.3.1. Tuz Gölü	5
1.4. Ekstrem Mikroorganizmalar	7
1.4.1. Halofilik Mikroorganizmalar	7
1.5. Prokaryotik Komünitelerin Kültür Bağımsız Metodlar ile Analizi.....	9
1.5.1. 16S ribozomal RNA (rRNA) geninin önemi.....	9
1.5.2. 16S rRNA genini temel alan kültür bağımsız yaklaşımlar	10

1.5.2.1. Denatüre edici gradient jel elektroforezi [Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)].....	13
1.5.2.2. Floresan in-situ hibridizasyon (FISH)	15
1.6. Virüsler ve Ekstrem Ortamlarda Bulunan Virüsler	16
1.6.1. Hipersalin ortamlarda bulunan virüsler (Halovirüsler)	17
1.7. Halovirüslerin Morfolojik Çeşitliliği.....	22
1.7.1. İğsi halovirüsler (Fusiform virüsler)	22
1.7.2. Baş ve kuyruklu halovirüsler	22
1.7.3. Küresel halovirüsler	23
1.7.4. Pleomorfik halovirüsler	24
1.8. Halovirüslerin Genom Çeşitliliği	26
1.9. Viral Çeşitlilik Analizinde Metagenomik Yaklaşım ve Önemi	26
1.9.1. Fonksiyonel viral metagenomik.....	28
1.10. Faj Filogenisi ve Taksonomisi	30
1.11. Kültür-Bağımsız Yöntemler ile Virüslerin Komünite Ekolojisinin İncelenmesi	32
1.11.1. Epifluoresan mikroskopi (EFM) ile viral yoğunluğunun belirlenmesi	32
1.11.2. Geçirimli elektron mikroskopi (TEM) ile virüs morfolojilerinin belirlenmesi	35
1.11.3. Atımlı-alan jel elektroforezi (PFGE) ile viral çeşitliliğin belirlenmesi	36
1.11.4. Viral DNA izolasyonu ve metagenomik kütüphane oluşturulması ...	37
2. MATERYAL ve METOD	40
2.1. Materyal	40
2.1.1. Çalışmada kullanılan solüsyonlar	40
2.1.1.1. %25 SW (g/L)	40

2.1.1.2. Vivaflow temizleme solüsyonu	40
2.1.1.3. TAE 50X	40
2.1.1.4. TBE 5X	41
2.1.1.5. %80'lik DGGE stok solüsyonu	41
2.1.1.6. %0'lik DGGE stok solüsyonu	41
2.1.1.7. %10 Amonyum persülfat solüsyonu.....	41
2.1.1.8. PBS 10X.....	42
2.1.1.9. In situ hibridizasyon tamponu	42
2.1.1.10. FISH için yıkama tamponu	42
2.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	43
2.1.2.1. Luria Bertani (LB) besiyeri.....	43
2.1.2.2. TB medium.....	43
2.2. METOD	44
2.2.1. Çalışma alanı.....	44
2.2.2. Su örneğinin tuzluluk oranının ölçümü	44
2.2.3. Viral çeşitliliğin incelenmesi	44
2.2.3.1 Su örneğinin epifluoresan mikroskopunda incelenmesi ve viral yoğunluğun belirlenmesi.....	44
2.2.3.2. Su örneğinden kontaminantların uzaklaştırılması	45
2.2.3.3. Filtratın konsantrasyonu.....	45
2.2.3.4. Geçirimli elektron mikroskopi (TEM) ile virüs morfolojisinin belirlenmesi	46
2.2.3.5. Atımlı-alan jel elektroforezi (PFGE) ile viral topluluğun DNA büyüklüğünün belirlenmesi.....	46
2.2.3.6. Kalıplardan agarozun uzaklaştırılması ve toplam viral DNA ekstraksiyonu	48
2.2.3.7. Metagenomik kütüphanenin oluşturulması.....	48

2.2.3.8. Metagenomik kütüphaneden rekombinant fosmid vektörlerin saflaştırılması ve analizi	51
2.2.3.9. Dizi analizi	53
2.2.4. Örneğin mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi	54
2.2.4.1. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve hücre sel yoğunluğ un belirlenmesi	54
2.2.4.2. Su örneğ inden total DNA ekstraksiyonu	55
2.2.4.3. Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE)	56
2.2.4.4. Dizi analizi	60
3. BULGULAR	61
3.1. Su Örneğ inin Tuzluluk Değ erinin Belirlenmesi	61
3.2. Viral Ç eş itlilik ile İlgili Bulgular	61
3.2.1. Su örneğ inin viral yoğunluğ unun belirlenmesi	61
3.2.2. Su örneğ inden kontaminantların uzaklaştırılmasının ardından viral yoğunluğ un belirlenmesi	63
3.2.3. Konsantre edilen filtratın viral yoğunluğ unun belirlenmesi	63
3.2.4. Geçirimli elektron mikroskobi (TEM) ile viral morfolojinin belirlenmesi	65
3.2.5. Atımlı-alan jel elektroforezi (PFGE) ile viral topluluğ un DNA büyüklüğ ünün belirlenmesi	72
3.2.6. Viral DNA ekstraksiyonu	73
3.2.7. Metagenomik kütüphanenin oluşturulması ve oluşturulan kütüphaneden dizi analizi öncesi kontroller	74
3.3. Örneğ in Mikrobiyal Ç eş itliliğ inin Belirlenmesi ile İlgili Bulgular	77
3.3.1. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve hücre sel yoğunluğ un belirlenmesi	77
3.3.2. Su örneğ inden Total DNA ekstraksiyonu	79

3.3.3. Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) ile mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi.....	79
4.TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	85
KAYNAKLAR	110

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Tuz Gölü uydu görüntüsü (Google earth)	6
1.2. 16S rRNA karşılaştırmalarına göre oluşturulan filogenetik ağaç (Oren, 2008).....	8
1.3. Mikrobiyal komünitelerin yapısını ve fonksiyonunu çalışmak için kullanılan farklı yöntemleri yansıtan akış çizelgesi, (Muyzer ve Smalla, 1998)	12
1.4. DGGE prensibi	14
1.5. Baş ve kuyruklu HF2 virüsü ve HF1 virüsü (Tang ve ark., 2004).....	25
1.6. Küresel SH1 virüsü, iğ şekilli His1 virüsü (Dyall-Smith ve ark., 2003) ve iğ şekilli His2 halovirüsü (Bath ve ark., 2006)	25
1.7. İkosahedral SSIP-1 halovirüsünün elektron mikroskopi ile elde edilen görüntüsü (Aalto ve ark., 2012) ve filament şekilli halovirüs (Santos ve ark, 2012).....	25
1.8. Viral metagenomik uygulamaları (Rosaria ve Breitbart, 2011)	29
1.9. Faj genomları ve metagenomik diziler arasındaki benzerlikleri belirlemede kullanılan tüm genom temeline dayalı ‘Phage Proteomic Tree’ (Edwards ve Rohwer, 2005).....	31
1.10. Çeşitli floresan boyalar ile boyanmış çevresel örneklerin görüntüsü (Suttle ve Fuhrman, 2010).....	34
2.1.Örnek alınan bölgenin işaretlediği Tuz Gölü uydu görüntüsü (Google earth).....	44
2.2. Kullanılan pCC2FOS vektörünün haritası (Epicentre)	49
2.3. pCC2FOS vektörü üzerinde spesifik vektör primerlerinin oturduğu bölge bilgisi ve primer dizisi (Epicentre)	53
3.1. Tuz Gölü doğal su örneğinin SYBR Gold boyaması sonucu görüntü alanları	62
3.2. Filtrasyon ardından su örneğinin SYBR Gold boyaması sonucu görüntü alanı	63
3.3. Konsantrasyon sonrası 1 µl filtrat örneğinin SYBR Gold boyaması sonucu görüntü alanı	64

3.4. TEM görüntüsü	66
3.5. TEM görüntüsü	67
3.6. TEM görüntüsü	68
3.7. TEM görüntüsü	69
3.8. TEM görüntüsü	70
3.9. TEM görüntüsü	71
3.10. PFGE jel görüntüsü	72
3.11. Total viral DNA'nın %1 agaroz jel görüntüsü.....	73
3.12. Uçları kesilen viral DNA'nın %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	74
3.13. Klonlardan saflaştırılan vektörlerin %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	75
3.14. Insert büyüklüğünün belirlendiği PFGE jeli.....	76
3.15. DAPI ve Arc 915 probu ile FISH işlemi sonucu mikroskop görüntüsü.....	78
3.16. DAPI ve Eub 338 probu ile FISH işlemi sonucu mikroskop görüntüsü.....	78
3.17. Su örneğinden genomik DNA ekstraksiyonu sonrası jel görüntüsü	79
3.18. <i>Archaea</i> DGGE-PCR amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü ve <i>Bacteria</i> DGGE-PCR amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü	80
3.19. DGGE jeline yüklenecek miktarın hesaplanması için yapılan miktar jeli görüntüsü	80
3.20. <i>Archaea</i> DGGE jel görüntüsü ve <i>Bacteria</i> jel görüntüsü.....	81
4.1. ISI web of knowledge veritabanında denizel ve tatlı su ekosistemlerindeki virüslerle ilgili aramalar sonucu ulaşılan yayınların sayısı (Jacquet ve ark., 2010).....	85
4.2. Sucul virüs komünitelerini analizinde kullanılan genetik parmak izi yöntemlerinin akış çizelgesi (Sandaa ve ark., 2009).....	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Halovirüslerin morfoloji ve taksonomik sınıflandırılması (Pina ve ark., 2011).....	21
2.1. FISH yönteminde kullanılan problemlerin özellikleri ve dizi bilgileri (Anton ve ark., 1999).....	54
2.2. DGGE-PCR işleminde kullanılan primerler ve dizi bilgileri (Muyzer ve ark., 1993).....	56
3.1. TEM sonucunda belirlenen virüs morfolojilerinin sayısı ve örneklerdeki yüzdesi.....	65
3.2. BamHI enzimi ile kesilen vektörlerin ve taşıdıkları insert DNA'nın yaklaşık büyüklükleri.....	77
3.3. Tuz Gölü örneklerindeki toplam hücre, <i>Archaea</i> ve <i>Bacteria</i> hücre sayıları.....	78
3.4. <i>Archaea</i> grubuna ait numaralı örneklerin dizi analizi sonrasında BLAST sonuçları.....	82
3.4 (Devamı). <i>Archaea</i> grubuna ait numaralı örneklerin dizi analizi sonrasında BLAST sonuçları.....	83
3.5. <i>Bacteria</i> grubuna ait numaralı örneklerin dizi analizi sonrasında BLAST sonuçları.....	84

1.GİRİŞ

Sucul ortamlarda yüksek oranda bulunan virüs benzeri partiküllerin keşfi ile bu yapıların mikrobiyal biyokütle, populasyon ve genetik çeşitliliği düzenleyen ana faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir. Bu rollerinden dolayı, viral yoğunluğun belirlenmesi, rutin birçok araştırmanın bir parçası haline gelmiştir. Ayrıca, virüslerin sucul mikrobiyal besin ağının önemli bir bileşeni olduğu bilinmekte, böylece etkilerini anlamak için çevresel ortamlardaki virüs benzeri partiküllerin hızlı ve doğru değerlendireceği yöntemleri kapsayan kültür bağımsız yaklaşımlar tercih edilmektedir. Bu mikroskop ve moleküler temelli yöntemlerin esası, virüs benzeri yapıların yoğunluğunun belirlenmesi ve doğal su örneğindeki virüs benzeri yapıların çeşitliliğini belirlemek amacıyla komünite karakterizasyonudur. Böylece, çevresel viral populasyonların dinamik ve kompozisyonları hakkındaki bilgi elde edilmektedir (Wommack ve Corwell, 2000; Chen ve ark., 2001; Weinbauer, 2004; Wommack ve ark., 2009).

Hipersalin sular da doğal sucul ortamlarda olduğu gibi yüksek oranda virüs benzeri yapılar içermektedir. Tuz gölleri gibi ekstrem tuzlu ortamlarda prokaryot hücrelerin çoğunu *Halobacteriaceae* familyası oluşturmakta ve bu grubu enfekte eden virüs benzeri partiküller yüksek oranda bulunmaktadır (Bath ve ark., 2006).

Tuz Gölü, Türkiye'nin orta kısmında bulunan en büyük tuz gölüdür. Bu hipersalin göl halofilik *Archaea* ve *Bacteria* açısından zengin olan bir kaynaktır. Bu çalışmada ülkemizde tüketilen tuzun büyük oranının kaynağı olan Tuz Gölü'nün viral populasyonu incelenmiştir. Böylece Tuz Gölü'nde bulunan, mikrobiyal populasyonu etkileyen, virüslerin yoğunluğu ve morfolojileri sırasıyla Epifluoresan Mikroskopu [Epifluorescence Microscopy (EFM)] ve Geçirimli Elektron Mikroskopu [Transmission Electron Microscopy (TEM)] ile belirlenmiş ve genom çeşitliliği Atımlı-alan Jel Elektroforezi [Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)] ile saptanmıştır. Çeşitlilik analizlerinin ardından viral DNA ekstrakte edilmiş ve metagenomik kütüphane oluşturulmuştur. Diğer virüs gruplarıyla karşılaştırıldığında halofilik mikroorganizmaları enfekte eden virüsler hakkında sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. Bunun nedeni halovirüsler ile sınırlı

sayıda çalışma yapılmasıdır. Dünyada yapılan çalışmalara bakıldığında çok az sayıda literatüre rastlanmaktadır. Ülkemizde birçok tuzlu su kaynağı bulunmasına rağmen, halovirüslerle ilgili literatürde yayımlanan çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması halovirüsler ile yapılacak olan çalışmalara öncü olacaktır.

1.1.Ekstrem Çevreler

Ekstrem çevreler hem doğal hem de insan aktivitelerinden ortaya çıkan ortamları içerirler. Bu çevreler, jeokimyasal ekstremler olarak; hipersalin, alkalın, asidik çevreler, sıcak, soğuk ve yüksek basınçlı ortamları içine alan fiziksel çevreler şeklinde sınıflandırılırlar. Bu ekstrem yaşam alanları şaşırtıcı derecede çeşitliliğe sahiptir (Van den Burg, 2003).

1.1.1. Hipersalin Ortamlar

Doğal tuzlu sular yerküre üzerinde oldukça geniş bir kısımda dağılım göstermektedir. Bu suların doygunluğa yakın ya da doygun ekstrem tuz konsantrasyonlarından dolayı (%35 w/v), yaşamdan mahrum olduğu beklenir. Ancak, mikroorganizmalar yoğun popülasyonlar halinde bu sularda yaşamlarını sürdürmektedirler. Deniz suyundan daha yüksek konsantrasyonlarda tuz içeren bu hipersalin ortamlara tuz gölleri örnek verilebilir (Kukkaro, 2008).

Deniz suyundan daha yüksek tuz yoğunluğuna sahip tuzlu sular "thalassohaline" ve "athalassohaline" olarak ayrılırlar. Thalassohaline ortamlar, deniz kökenlidir ve iyonik kompozisyonları deniz suyuna benzerdir. Kimyasal olarak iyon bileşenleri, baskın anyon Cl^- (toplam molaritenin %49'u) ve baskın kation Na^+ (toplam molaritenin %42'si) olup diğer önemli iyonlar, Mg^{2+} , SO_4^{2-} , K^+ , Ca^{2+} , Br^- , HCO_3^- ve F^- 'dir (Ventosa ve Arahal, 2009). Thalassohaline su sistemlerine örnek olarak solar tuzlular verilebilir, deniz suyunun doğal olarak buharlaşmasıyla tuz üretiminde kullanılan kristalize havuzlarıdır. Deniz suyundan doygun tuzluluğa kadar farklı tuzluluk oranlarına sahip göl serileri olup bu ortamlarda yaşayan halofilik mikroorganizmaların çalışılmasında oldukça iyi modellerdir. Athalassohaline ortamlar ise, deniz suyundan farklı iyonik bileşime sahip tuzlu sular olup, kompozisyonları mineral birikintilerin ayrışmasından etkilenen sulardır. Dünyada birçok hipersalin athalassohalin göller mevcuttur ve

bunların iyonik kompozisyonları değişiklik göstermektedir. Detaylı olarak çalışılan athalassohaline sulara ise Ölü Deniz (İsrail), Büyük Tuz Gölü (Utah), Antarktika'daki bazı hipersalin ya da alkalın göller, Magadi gölü ya da Wadi Natrun gibi Doğu Afrika gölleri ve Kaliforniya'daki Mono Gölü örnek olarak verilebilir (Ventosa, 2006). Kenya'daki Magadi Gölü ve Mısır'daki Wadi Natrun Gölü alkalın soda gölleri olup, gölde yüksek pH' da düşük çözünürlüklerinden dolayı divalent katyonlardan, magnezyum ve kalsiyum, yoksundur. Bununla birlikte, diğer yüksek tuz konsantrasyonuna sahip Ölü Deniz divalent katyonları içermesi ve bunların tek değerlikli katyonlardan fazla olması ile iyon kompozisyonu bakımından diğerlerinden ayrılmaktadır (Kukkaro, 2008).

1.2. Dünyadaki Hipersalin Ortamlar

1.2.1. Ölü Deniz (Dead Sea)

Ölü Deniz, athalassohalin, oldukça yüksek divalent katyon konsantrasyonları ile birlikte tuza doymuş, Suriye-Afrika çukur vadisi arasında olmak üzere Ürdün ve İsrail sınırları arasında yer alan bir göldür. Su girişinin ana kaynakları Kinneret Gölü'nden su taşıyarak su girişini sağlayan Ürdün Nehridir. Suyun yapısı, dipte kaya tuzları birikimini sağlayacak konsantrasyonda NaCl satürasyonuna sahiptir. Göl suyunun iyonik değerleri, 1.9 M Mg^{2+} , 1.6 M Na^+ , 0.44 M Ca^{2+} , 0.20 M K^+ , 6.35 M Cl^- , 0.07 M Br^- ve 0.005 M SO_4^{2-} şeklinde belirlenmiştir (Oren,1999; Elevi Bardavid ve ark., 2007).

Bu zorlayıcı koşullara rağmen, Ölü Deniz bazı mikroorganizma türlerinin yaşam alanıdır. *Bacteria* domaini, tek hücreli algler, fungi, virüsler ve özellikle *Archaea* domainine ait üyeler içermektedir.

1.2.2. Büyük Tuz Gölü (Great Salt Lake)

Büyük Tuz Gölü, Utah' ta bulunan kuzey Amerika'daki en büyük, suyu dünyadaki en konsantre tuzlu su olan hipersalin bir göldür. Göl kapalı havza sistemi ile meydana gelmiş olup, çözünen madde girişinin drenaj havzasındaki çeşitli kayaların ayrışmasıyla sağlanmaktadır (Jones ve ark., 2008).

Büyük Tuz gölü, buzul döneminde var olan Bonneville Gölü'nün kalıntısı olan hipersalin bir göldür. Eski zamanlarda göl sınırları yaklaşık 89 000 km²'den fazla alana yayıldığı belirlenmiştir. Gölün tuz oranı %5-28 ve yüzey alanı 5490-2470 km² arasında değişmektedir. Gölün en yüksek noktasında, derinliği 13.7 m olarak, en düşük yüzey yüksekliğinde 7.6 m olarak belirlenmiştir. Geniş sınırlara sahip olduğu için Büyük Tuz Gölü, sıg ve hiperötrofik bir göldür (Belovsky ve ark., 2011).

1959'da göl üzerine demiryolu inşa edilmiş ve göl iki ana hatta ayrılmıştır. Bu zamana kadar ortalama 200 g/L tuzluluğa sahip olan göl suyu bundan sonra güney kısmın tatlı sularla daha çok beslenmesi nedeniyle güney kısımda 120 g/L, kuzey kısımda ise tuzluluğun artması ile 330 g/L tuzluluğa sahip olmuştur (Oren, 2002). Düşük tuz konsantrasyonlarında olan Güney Kolu, daha fazla çeşitlilik içerirken, Kuzey Kolu'nda daha çok halofilik bakteriler, Cyanophytes ve *Dunaliella salina* gibi yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan canlılar bulunmaktadır (Belovsky ve ark., 2011).

1.2.3. Wadi Natrun Gölleri

Wadi Natrun ve iç salin gölleri Kahire'nin 90 km kuzeybatısında yer almaktadır. Ortalama uzunluğu 60 km ve ortalama genişliği 10 km'dir. Dip kısmının deniz seviyesinden 23 m aşağıda ve Nil Nehri'nin kolu olan Rosetta kolunun su seviyesinden 38 m yukarısında olduğu belirlenmiştir.

pH değeri 8.5-9.5 arasında olan bu gölün tuz oranı 283-540g/L şeklindedir. Alkalin tuzlu göller arasında Ca ve Mg'nin düşük olduğu tek tuz gölüdür. Ana iyonik bileşenlerin sülfat, klorid, karbonat ve sodyum olduğu ve aynı zamanda kurşun, bakır, demir metallerini içerdiği belirtilmiştir (Taher, 1999).

1.2.4. Alkalin Hipersalin Göller

Tropik ve subtropik kuşaklarda yer alan alkalin hipersalin göllerin tuzlu suları, genellikle topografi yapısı sayesinde yüzey suyunun kapalı havza sayesinde dışarı akışıyla, jeolojik oluşumun alkalin akıntılara izin vermesi ve iklim koşulları sonucu buharlaşma ile oluşmaktadır. Bu alkalin hipersalin göllere örnek olarak, Kaliforniya'daki Mono Gölü, Kenya'daki Magadi Gölü, Doğu Afrika'daki bazı

göller, Çin ve Hindistan'daki bazı göller örnek olarak verilebilir. İyon kompozisyonlarına bakıldığında, Na^+ , Cl^- , HCO_3^- ve CO_3^{2-} esas bileşenler olup SO_4^{2-} konsantrasyonu düşüktür (Oren, 1999; Oren, 2002).

1.3. Türkiye'deki Hipersalin Ortamlar

1.3.1. Tuz Gölü

Ülkemizde İç Anadolu Bölgesinde yer alan Tuz Gölü dünyadaki önemli tuz göllerinden biridir (Kılıç ve Uyanık, 2001). 1665 km²'lik alanı ile Türkiye'nin ikinci büyük gölü olan Tuz Gölü "karasal tuz tavaları (Salzpfannen)" ile "tuzlu göller (Salz Seen)" arasında mevsimsel bir geçiş tipini canlandıran bir karasal buharlaşma ortamıdır. En büyük uzunluğu 85 km, en büyük genişliği ise 45 km ye varır. Yaklaşık 16.000 km² lik bir beslenme havzasına sahiptir (Uygun ve Şen, 1978). Tuz Gölü çevresinde gölü besleyen akarsular ve derelerin bir kısmı göle ulaşırken; bunların bir kısmı da sularını gölün etrafındaki alanlara bırakmaktadırlar. İnsuyu, Eşmekaya, Ulurmak ve Peçeneközü bunlar arasında bulunmaktadır. Tuz Gölü'ne Konya'nın evsel ve sanayi atıklarını taşıyan Konya Ovası DSİ Drenaj Kanalı Tuz Gölü havzasına dışarıdan su getiren insan yapısı tek kaynaktır (Başbuğ, 1999). Gölün en derin yeri doğuda sürekli su altında bulunan kesimde yer alır, 1,5-2 m dolayındadır. Buna karşılık asıl göl kış-ilkbahar aylarında 60-80 cm derinlik göstermekte, yaz sonunda ise göl çoğunlukla kurumaktadır (Uygun ve Şen, 1978). Tuz gölü bu değerler ile birlikte ülkemizin en sığ göllerinden biridir. Deniz seviyesinden yüksekliği 905 metredir (Kavurmacı ve ark., 2010). Göl, Türkiye'nin en az yağış alan bölgesinde yer almaktadır ve yıllık yağış miktarı yaklaşık 300 mm'dir (Kılıç ve Uyanık, 2001). Günümüze kadar literatürde (Kılıç ve Uyanık, 2001) Tuz Gölü'nün kapalı havza olduğu ifade edilmiştir. Fakat, Kavurmacı ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir çalışma sonucunda, Tuz Gölünden Tuz Gölü Fayı aracılığı ile fay hattı boyunca su akışı olduğu kanaatine varmışlardır.

Tuz Gölü iyon bileşenler başlıca Na^+ , Cl^- , Br^- olmakla birlikte, Na^+ 112.5 g/L, K^+ 1.2 g/L, Ca^{2+} 0.84g/L, Mg^{2+} 3.4 g/L, HCO_3+CO_2 0.1 g/L, Cl^- 180 g/L, SO_4^{2-} 7.9 g/L, Li 60 mg/L, B 45 g/L, Br^- 94 g/L ve Sr^{2+} 13 g/L miktarlarında ölçülmüştür (Uygun ve Şen, 1978).



Şekil 1.1. Tuz Gölü uydu görüntüsü (Google earth)

Tuzlu göl sularından tuz üretimi, suların güneş altında buharlaşması sonucu tuzun kristalleşmesi esasına dayanmaktadır. Tuz Gölü'nde tuz yoğunluğu yüksek olduğundan tuz üretimi kolaylaşmaktadır ve tuz yaz mevsiminde kendiliğinden oluşmaktadır. Nisan ve Mayıs aylarında hava sıcaklıklarının artması nedeniyle suyun içindeki tuz oranı yükselmeye başlar ve Haziran ayından itibaren bu oran % 25'e ulaşır. Bu yükselme ile birlikte yoğunluk artarak, ham tuz çökmeye başlar ve Ağustos ayna kadar çökme devam eder. Bu ayda tuzun çöküp, kalan suların buharlaşmasıyla göl kurur ve 10-15 cm tuz tabakası oluşur. Gölden ham tuz üretimi de bu şekilde gerçekleşir (Mutlu, 2006).

Tuz Gölü'nün mikrobiyolojisi üzerine az sayıda çalışma vardır. Kallı (2000) yaptığı çalışmada Tuz Gölü'nden izole ettiği organizmaların halofilik Archaea grubu organizmalar olabileceğini bildirmiş, fakat daha üst düzey teknikler kullanılarak bu verilerin doğrulanması gerektiğini belirtmiştir. Birbir ve ark. (2003), gölden izole ettikleri mikroorganizmaların biyokimyasal özelliklerine göre karakterizasyonlarını yapmışlardır. Birbir ve ark (2007), kültür çalışmaları ile elde ettikleri 27 izolatın, fenotipik karakteristiklerini ve antibiyotik

duyarlılıklarını araştırmışlardır. Ayrıca, izolatların 16S rRNA analizleri sonucu *Haloarcula*, *Halorubrum* ve *Halobacterium* olarak belirlemişlerdir. Mutlu ve arkadaşları, 2008 yılında yayımlanan çalışmalarında, farklı moleküler teknikler temelinde mikrobiyal komünite analizi uygulamışlar ve *Halorubrum*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Haloquadrata*, *Haloterrigena* ve *Salinibacter* cinslerine ait türler belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra literatürde Tuz Gölü'nde virüsler ile ilgili yayımlanmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

1.4. Ekstrem Mikroorganizmalar

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikrobiyal yaşamın spesifik çevrelerle sınırlı olmadığını, mikrobiyal komünitenin yüksek sıcaklık, yüksek tuz, asidik ve alkali pH, yüksek basınç gibi ortamlarda bulunabileceğini ortaya koymuştur. Bu tür ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar ekstremofiller olarak adlandırılırlar (Van den Burg, 2003).

Ekstremofiller; *Archaea*, *Bacteria* ve *Eucarya* domaininde temsil edilen mikroorganizmalar içermesine rağmen, büyük oranı *Archaea* domainine aittir (Le Romancer ve ark., 2007).

1.4.1. Halofilik Mikroorganizmalar

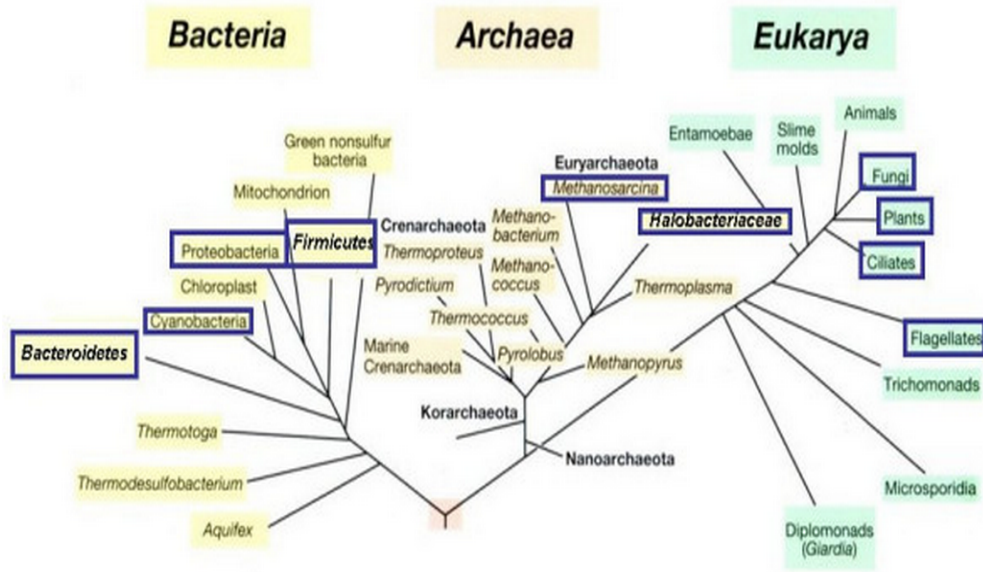
Hipersalin ortamlarda iyonların yüksek konsantrasyonu, mikroorganizmaların su kullanımını sınırlayarak mikrobiyal aktiviteyi etkileyen ana etmenlerden biridir. Bu zorlayıcı koşullarına rağmen bu üretken ekosistemler osmotik strese dirençli organizmalar olan halofilleri geniş oranda kapsamaktadır (Le Romancer ve ark., 2007).

Ekstremofilik mikroorganizmaların farklı tuz konsantrasyonlarında yaşayan üyeleri olan halofiller, küçük alt ünite ribozomal RNA karşılaştırmaları baz alınarak elde edilen yaşam ağacında *Archaea*, *Bacteria*, *Eukarya* domainlerinde (Şekil 1.2) temsil edilmektedir (Oren, 2008).

Kushner ve Kamekura (1988) mikroorganizmaları optimum gelişimlerine göre bazı kategorilere ayırmıştır, 0.2 M NaCl' den az tuzluluktaki ortamlarda gelişenler halofil olmayanlar, 0.2-0.5 M NaCl varlığında en iyi gelişimi

gösterenler zayıf halofiller, 0.5-2.5 M NaCl varlığında en iyi gelişimi gösterenler ılıman halofiller ve 2.5-5.2 M NaCl varlığında en iyi gelişim gösterenler ekstrem halofiller olarak sınıflandırılır. Hipersalin ortamlarda, özellikle 1.5 M' dan (yaklaşık %10) fazla tuzluluktaki ortamlar, baskın olan iki ana mikroorganizma grubu ılımlı halofilik bakteriler ve ekstrem halofilik arke ve bakterilerdir (Ventosa, 2006).

Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda, *Dunaliella* (%10 w/v), *Artemia salina*, *Ephydra* gibi ökaryotik organizmalar yer alırken, %15 (w/v) fazla tuz konsantrasyonunda gelişen *Salinibacter ruber* son yıllarda en ekstrem halofilik bakteri olarak tanımlanmıştır. *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* ve *Haloquadratum* gibi genuslar ise *Archaea* domaininde yer almakta ve tuzun çökme noktasına yakın konsantrasyonlarda yaşamaktadırlar (Burns ve ark., 2004; Yaşa ve ark, 2008; Mutlu ve ark, 2008).



Şekil 1.2. 16S rRNA karşılaştırmalarına göre oluşturulan filogenetik ağaç [Halofilik organizmalar mavi kutularda gösterilmiştir (Oren, 2008)]

Yıllar boyunca halofilik organizmalar ve onların metabolik işlemleri hakkında bilgi artmış olmasına rağmen, halofilleri kültüre edebilmek kısıtlıdır. Bu organizmaların birçoğu laboratuvar ortamında tekrarlanması zor belli büyüme koşullarına sahiptir ve bu da yavaş büyüme oranlarıyla belli halofilik strainlerin izolasyonunu engeller. Kültür bağımlı ve kültür bağımsız yöntemler arasında karşılaştırma yapıldığında uyumsuzluklar görülebilir (Benloch ve ark., 2002; Burns ve ark., 2004). Bu duruma örnek olarak *Haloarcula* ve *Haloquadrata* türleri verilebilir. *Haloarcula* grubu, hızlı gelişen türleri içermekte ve kültür çalışmaları ile rahatça elde edilmesine rağmen, moleküler klon kütüphaneleri ya da mikroskop analizleri ile çok az sayıda elde edilmektedir. Tersine duruma örnek olarak ise, kare şekilli archaeon (*Haloquadra walsbyi*) gibi bazı türler verilebilir, bunlar klon kütüphanelerinde baskın tür olup, mikroskop analizlerinde sıklıkla rastlanır, fakat kültür çalışmalarında güçlüklerle geliştirilmektedir (Oren, 2002).

Günümüzde hızla gelişen moleküler teknikler sayesinde çevresel örneklerinden saf bakteri kültürü elde edilmesine gerek olmadan da DNA izolasyonları kolaylıkla yapılabilmekte ve alınan örneklerdeki mikrobiyal çeşitlilik ortaya çıkarılabilmektedir (Oren, 2002).

Bu çalışmada mikrobiyal çeşitlilik kültür bağımsız yöntemler ile analiz edildiği için ilgili bölümde sadece bu yöntemler hakkında bilgi verilecektir.

1.5. Prokaryotik Komünitelerin Kültür Bağımsız Metodlar ile Analizi

1.5.1. 16S ribozomal RNA (rRNA) geninin önemi

Moleküler dizi analizi tekniklerinin iyileştirilmesinin ardından, organizmaların filogenetik tarihçeleri için, Carl Woese ve arkadaşları evrensel filogenetik bir marker olarak küçük alt ünite rRNA'nın yararlılığını göstermişlerdir. Bu çalışmalar mikroorganizmalar arasındaki doğal akrabalığı ortaya koyabilecek yeni bir prokaryotik sistematığın önerilmesini sağlamıştır. Evrimsel bir kronometre olan ribozomal RNA, bütün organizmalarda bulunmakta ve değişken bölge ve yeterli diziyi içermesiyle organizmalar arasında filogenetik seviyede ayırım yapmayı sağlayan yüksek oranda korunmuş bölgeyi içermektedir. rRNA genleri bu nedenle filogenetik bir marker olarak düşünülmektedir. rRNA

genleri, prokaryotlarda 5S, 16S ve 23S olmak üzere üç adettir ve genomda birçok kopyası bulunan tek bir operon gibi eksprese olan bir gen kümesi içerisinde organize olmuştur. Birçok rRNA gen operonu taşıyan organizmalarda, gen dizileri uyum içerisinde evrimleşmeye eğilimlidir (Pei ve ark., 2010). Böylece küçük alt ünite rRNA dizilimlerinin karşılaştırılması, mikroorganizmaların identifikasyonu ya da doğal akrabalıklarına göre prokaryotik taksonların oluşturulmasında ya da tanımlanmasında güçlü ve standart bir metod haline gelmiştir (Mutlu, 2006).

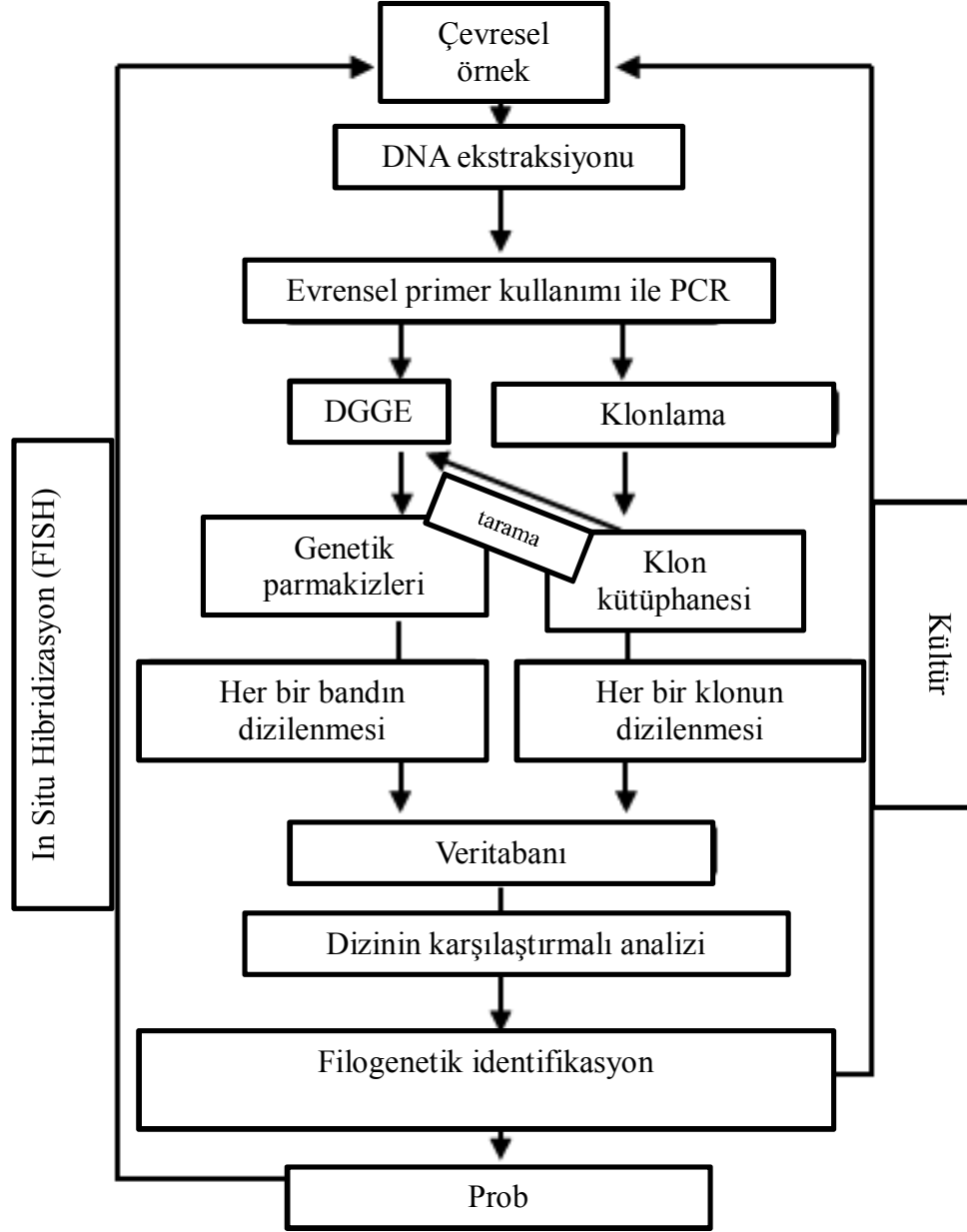
1.5.2. 16S rRNA genini temel alan kültür bağımsız yaklaşımlar

Mikrobiyologlar arasında günümüzde iyi anlaşılan bir durum, mikroorganizmaların sadece çok küçük bir oranının izole edildiği ve karakterize edildiğidir. Farklı habitatlardan kültüre edilebilen mikroorganizmaların yüzdesi ile toplam hücre sayımları arasında karşılaştırılma yapıldığında elde edilen sonuçlar arasında büyük bir fark vardır. Bu farklılığın bir nedeni, bakterilerin kendi doğal ortamlarında hangi gerçek koşullarda en iyi geliştiği bilgisinin yoksunluğudur. Bu yüzden, ekosistemlerin sürdürülmesinde mikrobiyal çeşitliliğin rolü hakkında daha iyi anlaşılması için, geleneksel mikrobiyolojik metodların yanı sıra bazı yaklaşımlar gerekmektedir. Son yıllarda hızla gelişen moleküler teknikler sayesinde mikroorganizmaların tanımlanması ve identifikasyonu, kültür bağımlı metodlar ile karşılaştırıldığında daha kolay bir hale gelmiştir. Prokaryotik mikroorganizmaların analizlerine uygun teknikler, moleküler marker olan 16S rRNA genine dayalı karşılaştırmalı yöntemler olup, bu bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması ve dizilenecek identifiye edilmesini temel almakla birlikte farklı yöntemleri (klonlama ya da genetik parmak izi teknikleri) içermektedir (Şekil 1.3). Bu yaklaşımlar günümüzde, mikrobiyal çeşitliliği keşfetmede ve mikrobiyal komünitelerin yapısını analiz etmede daha sık kullanılmakta ve elde edilen sonuçlar geleneksel kültür bağımlı metodların sınırlılığını kanıtlamaktadır (Muyzer ve Smalla, 1998; Spratt, 2004).

Mikrobiyal çeşitliliği analiz etmede kullanılan en güçlü teknikler klonlama ve 16S rRNA geninin dizilenmesidir. Fakat popülasyon değişimlerini incelemek için klonlama tekniği zaman alıcı ve pahalı olmasıyla pek tercih edilmez. Bunun yanı sıra, genetik parmak izi temelli yöntemler bu amaçla daha çok

kullanılmaktadır. Ayrıca hibridizasyon teknikleri, spesifik oligonükleotid problemler kullanımına dayalı yöntemler olup, ya çok spesifik grupları ya da genel popülasyonları hedef alarak mikrobiyal çeşitliliği inceleme olanağı verir (Muyzer, 1999).

Bu çalışmada bu yaklaşımlardan Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi ve Floresan In-Situ Hibridizasyon yöntemi kullanıldığı için sadece bu yaklaşımlardan bahsedilecektir.



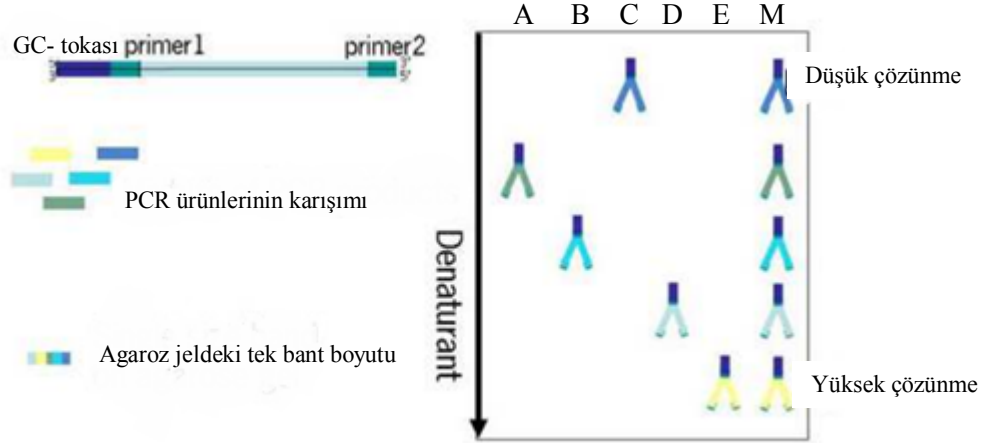
Şekil 1.3. Mikrobiyal komünitelerin yapısını ve fonksiyonunu çalışmak için kullanılan farklı yöntemleri yansıtan akış çizelgesi, (Muyzer ve Smalla, 1998)

1.5.2.1. Denatüre edici gradient jel elektroforezi [Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)]

Genetik parmak izi teknikleri, mikrobiyal komünite içerisindeki genetik çeşitlilik profilini ya da paternini sağlayan yöntemlerdir. Bu parmak izi metodlarından biri olan DGGE, doğal örneklerden ekstrakte edilen DNA' dan ribozomal DNA fragmentlerinin bir kısmının spesifik primerler kullanılarak PCR ile amplifikasyonu ve elde edilen fragmentlerin dizilerininin 'melting (çözünme)' davranışına göre gradient içeren poliakrilamid jel içerisindeki elektroforetik ayırımına dayanmaktadır (Muyzer, 1999).

DGGE yönteminde, aynı uzunlukta fakat farklı dizilerdeki DNA fragmentlerinin ayırımı yapılabilir. Ayrılmanın temeli, doğrusal gradientte DNA denatürantı içeren (üre ve formamid karışımı) poliakrilamid jelde kısmen denatüre olmuş çift iplikli DNA'nın artan elektroforetik hareketine dayanmaktadır. DNA fragmentlerinin ayırımı, 'melting domain' olarak bahsedilen farklılıklara dayanak devam etmektedir, yani benzer denatürasyon derecesinde baz çiftlerinin arasının açılmasındaki farklılıklara dayalı sürmektedir. Baz çiftlerinin açılması ile fragmentlerin ayırımında her domain, denatüre jelde belirli pozisyondaki spesifik denatürasyon derecesine ulaştığında (T_m), helikal yapının kısmen denatüre moleküle değişimi gerçekleşir ve molekülün göçü durur. Domainler arasındaki dizi değişimleri denatürasyon derecesinin farklılığına neden olur ve farklı dizilerdeki moleküllerin göçü jel içerisinde farklı pozisyonlarda durur (Muyzer ve Small, 1998).

Bu yaklaşımın kullanılmasıyla, dizi varyantlarının % 50' si 500 bp kadar olan DNA fragmentlerinde belirlenebilmektedir. Bu oran DNA fragmentinin bir ucuna GC tokası denilen GC zengini dizinin eklenmesiyle %100' e kadar arttırılabilir. PCR primerlerinin birinin 5' ucuna guanin(G) ve sitozin(C) dizisinin eklenerek amplifikasyon gerçekleştirildiğinde DNA fragmentine GC tokası takılmış olur. GC zengini dizi yüksek melting domaine sahip olduğu için iki DNA ipliğinin tek ipliklere tamamen ayrılmasını engeller. GC tokasının uzunluğu 30-50 nükleotid arasında değişmektedir (Muyzer ve Small, 1998).



Şekil 1.4. DGGE prensibi (A, B, C, D, E, birbirinden farklı organizmaları, M ise karışık örneği temsil etmektedir) [http://cdn.intechopen.com/pdfs/34911/InTechGel_electrophoresis_based_genetic_fingerprinting_techniques_on_environmental_ecology.pdf]

DGGE jelindeki DNA profilleri etidyum bromür kullanımı ile görüntülenmektedir. Daha sonraları, SYBR Green I boyası etidyum bromüre alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. SYBR Green I boyasının avantajı boyamada arka plan oluşumunu engellemesi ve böylece az yoğunlukta olan DNA fragmentlerinde görüntülenmesine imkân vermesidir. Daha hassas bir inceleme metodu gümüş boyamadır. Fakat gümüş boyama sırasında aynı zamanda tek zincirli DNA fragmentleride boyanmakta ve boyanmış jeller daha sonra hibridizasyon analizlerinde kullanılamamaktadır (Muyzer ve Small, 1998).

DGGE analizinden önce DNA fragmentlerinin denatürasyon davranışlarını belirlemek gereklidir. Ayrıca, farklı DNA fragmentlerinin ayrımını sağlamak için gradienti ve elektroforez süresini optimize etmek gereklidir (Muyzer ve Small, 1998).

PCR-DGGE yaklaşımı; total komünite DNA'sının örnekten ekstraksiyonu, spesifik oligonükleotidler kullanımı ile kontrollü amplifikasyon (PCR) ve DGGE yöntemi kullanarak ampikonların ayrımı şeklinde üç aşamadan oluşmaktadır. Bu amaçla verimli ve etkili total DNA ekstraksiyon metodu zorunludur ve incelenecek örneğin doğasına bağlı olarak optimize edilmiş olması gerekmektedir.

Sonraki aşama olan PCR aşamasında, birden fazla primer setleri kullanılarak istenilen bölge çoğaltılmaktadır. Evrensel primerlerin kullanımı herhangi bir mikrobiyal komüniteyi analiz etme imkanı verir ve ayrıca fazla çeşitliliğe sahip ekosistemlerde dominant grupların görüntülenmesini sağlamaktadır. Eğer spesifik alt populasyonlar incelenecekse grup spesifik primerler kullanılır. Prokaryotik çeşitlilik çalışmalarındaki PCR-DGGE uygulamalarında 16S rRNA genini hedef alan evrensel ya da spesifik primerler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, tek bir strain içerisinde polimorfik bölgelerin yetersiz sayısı ya da birden fazla rRNA operonlarının bulunması DGGE sonucunda elde edilen veriyi değerlendirmede zorluklar ortaya çıkarabilir. Çeşitliliğin tahminindeki hatalar ya da yanlış DGGE bant pozisyonunu temel alarak identifikasyon, bu sorunlara örnek olarak verilebilir. Ayrıca bazı durumlarda DGGE sonucu elde edilen 500 bp DNA fragmenti hibridizasyon gibi karşılaştırmalı analizler için yeterli olmayabilir. (Muyzer, 1999; Vanhoutte ve ark., 2005).

1.5.2.2. Floresan in-situ hibridizasyon (FISH)

Birçok çalışma analiz için, saf kültürlerden ya da çevresel örneklerden total nükleik asidi ekstraksiyonu ile başlamaktadır. Bununla birlikte, fikse edilen tüm hücrelerin kısa oligonükleotid problemleri geçiriminin kanıtlanması ile bu çalışmalar tek hücre tespitine kadar ilerlemiştir. Son yıllarda rRNA hedefli floresan boya taşıyan oligonükleotid problemler ile floresan in-situ hibridizasyon yöntemi (FISH), mikrobiyal ekolojide oldukça kullanışlı bir yöntem haline gelmiştir. Böylece, floresan mikroskop kullanımı ile tek hücrelerin in situ olarak tespiti mümkün hale gelmekle birlikte, aktivitesi ve biyojeokimyasal etkisi eşzamanlı olarak belirlenmektedir (Amann ve ark., 1990; Fuchs ve ark., 2000; Amann ve ark., 2001; Pernthaler ve Amann, 2004).

Bu yaklaşımın temeli, rRNA bölgelerinin ya da genlerinin ayrı bölgelerini grup, tür ya da spesifik oligonükleotid problemlerle hibridizasyonu şeklindedir. rRNA'ların yakın korunmuş dizilerinin uzunlukları arasında farklılıklar, hedeflenen bölgelerin çok ya da az korunmuş olması prob spesifikliğinin kontrolünün hassas olması gerektiğini göstergesidir. Örnek olarak, alem, cins ya da tür spesifik oligonükleotid problemler çevresel çalışmalarda uygulanmakta ve

dizilerin evrensellik gösteren bölgeleri, çevresel DNA'nın rRNA genlerini tanımlama amacıyla kullanılmaktadır (Amann ve ark., 1990). Bununla birlikte FISH ile bireysel hücrelerin in-situ tanımlanmasında engelleyici durumlarda bulunmaktadır, bunlar hücre duvarının geçirgenliği sınırlaması, hücresel ribozom içeriğinin düşük olması ve prob hedef bölgesinin in-situ erişilebilirliğindeki zorluklar şeklinde sıralanabilir (Fuchs ve ark., 2000).

Bu yöntem bakteriyal tanımlama, bakteriyal komünite yapısı analizleri, ayrı mikrobiyal populasyonların kendi habitatlarında zamansal ve mekansal dinamiklerinin araştırılması gibi amaçlar için kullanılabilir. Teoride, bakteri hücresindeki 5S, 16S ve 23S rRNA'nın birer kopyasını içeren her bir ribozom, hibridizasyon işlemi boyunca bir prob ile boyanır, her hücrede çok sayıda bulunması nedeniyle de doğal sinyal amplifikasyonu sistemi oluşur. Metod temelde bakteriyal küçük alt ünite (16S rRNA) rRNA dizilerinin hızlıca artışına dayanmaktadır (Mutlu, 2006).

1.6. Virüsler ve Ekstrem Ortamlarda Bulunan Virüsler

Virüsler ve virüs benzeri elementler, enfekte edici özelliğe sahip en küçük biyolojik varlıklardır. Replikasyon için konak hücreye ihtiyaç duymaları sebebiyle uzun süredir gerçek bir canlı olmadıkları düşünülmektedir. Elde edilen bir çok kanıt doğrultusunda, basit bir enfeksiyöz etmeninden fazlasına sahip olmadıkları düşünülürken, diğer taraftan erken hücresel evrimde oynadıkları anahtar rollerinden dolayı biyosferin ana bileşenlerinden biri olduğu ve hücresel hayatta derin bir etkiye sahip oldukları düşünülmektedir (Le Romancer ve ark., 2007).

Virüsler hücresel yaşamın var olduğu her yerde bulunmakta ve yaşamın üç domainine ait üyeleri içermektedir. Diğer bütün organizmalarda olduğu gibi, ekstremofillerde viral replikasyon için konak görevi görmektedirler. Fakat viral çeşitlilik ve dağılım hakkında elde edilen bilgiler henüz yolun başındadır. Son zamanlarda biriken bilginin büyük bir kısmı denizsel ortamlardaki virüslerin yoğunluğu hakkında olup, virüslerin dünyada çok sayıda bulunduğu ve biyoçeşitliliğin büyük bir kısmını temsil ettiğini göstermektedir. Özellikle ekstrem ortamlar olmak üzere, yaşamda yeni nişler keşfedildikçe, virüslerin varlıkları

saptanacak ve büyük oranda yeni virüs tipleri keşfedilecektir (Le Romancer ve ark., 2007).

Çevresel ortamlar ele alındığında, sucul ortamlarda virüs yoğunluğunun konak organizma yoğunluğundan fazla olduğu saptanmıştır. Virüs benzeri yapıların biyosferdeki toplam miktarının 10^{31} - 10^{32} olduğu ve deniz sularının yaklaşık 10^{30} 'dan fazla virüs içerdiği tahmin edilmektedir. Sucul ortamlarda virüsler oldukça bol olmakla birlikte aynı zamanda viral çeşitliliğin ve yoğunluğunun toprak ortamında da fazla olduğu tahmin edilmektedir. Virüsler genelde okyanus ve atık sulardan izole edilmesinin yanı sıra, sıcak su kaynakları ve Arktik deniz buzu gibi ekstrem çevrelerden de izole edilmiştir. Bununla birlikte virüsler yeni yeni örneklenmekte ve sürekli yeni morfolojiler keşfedilmektedir (Le Romancer ve ark., 2007; Kukkaro, 2008; Jacquet ve ark., 2010).

Denizsel ortamlarda virüslerin mikrobiyal besin ağında hücre lizisi sayesinde, madde ve enerjinin taşınmasına aracılık etmeleriyle karbon döngüsünde önemli rol oynadıkları ve spesifik konak popülasyonlarının seçici olarak baskılanması ile mikrobiyal çeşitliliği ve komünite dinamiğini etkilediği hakkındaki kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır (Filippini ve Middelboe, 2007).

Son zamanlarda izole edilen arkeal virüsler arasındaki çeşitlilik oldukça fazla olup, bu virüslerin genomları biyosferdeki canlılarda çok az oranda dizi homolojisi göstermektedir (Kukkaro, 2008; Pina ve ark, 2011).

1.6.1. Hipersalin ortamlarda bulunan virüsler (Halovirüsler)

Hipersalin ortamların, mililitrede 10^9 'dan fazla virüs benzeri partikül (VLP) barındırmalarıyla sucul ortamlar arasında en yüksek viral yoğunluğa sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu yoğunluğun nedeni oldukça merak uyandırıcıdır ve bu fenomeni açıklayan iki temel hipotez vardır. Bu yüksek orandaki sayıların öncelikle virüslerin yüksek tuzlu ortamlardaki fiziksel stabilitesinden olabileceği ya da bu sistemlerde yüksek oranda viral üretimin gerçekleştiğidir. Tuzluluk gradienti incelendiğinde (denizsel ortam, tatlı su, ekstrem hipersalin ve tuza doymuş çevreler), virüs sayısının, ortamdaki hücre sayısı ile ilişkili olarak tuz varlığında arttığı belirlenmiştir. Akdeniz kıyısında çok havuzlu solar tuzlalar ve

Senegal’ deki hafif tuzlu ortamlardan doygun tuz konsantrasyonundaki bir seri doğal sistem ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, toplam tuzun %25’ten fazla olduğu çok konsantre sistemler ele alındığında, virüs konsantrasyonunda keskin bir artma olduğu görülmektedir. Bu artmanın belki de bakteri ölümünün olmamasından ya da nanoflagellat predatörlerin az oranda (2×10^5 - 3×10^5 /litre) bulunmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ortamda predatörlerin bulunmaması gibi koşullar virüslerin yoğunluğunun diğer biyolojik güçler tarafından da etkilendiğini göstermektedir. Fakat, bu durum bütün hipersalin ortamlar için genelleştirilemez, Güney Kore’de tuz oranı % 31 olan solar tuzla ile yapılan bir çalışmada, prokaryotları aktif olarak parçalayan heterotrofik ve ekstrem halofillerin yüksek sayılarda bulunduğu (7×10^6 - 28×10^6 /litre) açıklanmıştır. Dolayısıyla, sudaki viral devamlılık büyük olasılıkla tuzlulukla ilişkilidir, doygunluğa yakın sularda, bu oran % 97’nin üzerindedir (Guixa-Boixareu ve ark., 1996; Santos ve ark., 2012).

Virüsler, mikrobiyal komünitelerin kompozisyonlarını ve sayılarını kontrol etmeleriyle ve mikrobiyal populasyonların evriminde önemli rol oynayan lateral gen transferinden sorumlu olmalarıyla bilinmektedirler (Filippini ve Middelboe, 2007). Bu kontrol mekanizmaları %25 ten fazla tuzlulukta bakteri sindirimini saptanmadığı ve bu durumda prokaryotik ölümlerin temel faktörünün virüsler olduğu hipersalin ortamlarda oldukça önemlidir. Buna rağmen, yüksek orandaki sayıları ile ve ekolojik ilişkisine karşın diğer sucul ortamlar ile karşılaştırıldığında hipersalin ortamlardaki virüslerin çeşitliliği hakkındaki bilgi azdır (Santos ve ark., 2010).

İlk haloarkeal virüs Φ H, 1974 yılında Torsvik ve Dundas tarafından tesadüfen keşfedilmiştir. Bu yıllarda halofilik mikroorganizmaların önemi anlaşılmasına rağmen, halovirüs izolatları ile ilgili çok az rapor bulunmaktadır. 1990’lı yıllarda 9 halovirüs keşfedilmiş ve bu virüslerin hepsinin baş ve kuyruklu morfolojiye ve lineer dsDNA genomuna sahip olduğu ve *Halobacterium salinarum* olarak tek bir konağı enfekte ettikleri belirlenmiştir (Dyall-Smith ve ark., 2003). Doğada yüksek oranda bulunmalarına rağmen, günümüze kadar ortalama 26 halovirüs tanımlanmıştır ve bunların genellikle *Halorubrum*,

Haloarcula, *Haloferax*, *Halobacterium*, *Natrialba* cinslerini enfekte eden haloarkeal virüsler olduğu belirtilmiştir (Atanova ve ark., 2012; Santos ve ark., 2012). Halofilik *Archaea* kültürlerinden izole edilen bu halovirüslerden, ekstrem halofilik proteobakteri olan *Salicola marasensis*' i enfekte eden iki virüs dışında, hiç birinin ekstrem halofilik *Bacteria* ve *Eucarya* domainlerinden izole edilmediği belirlenmiştir (Santos ve ark., 2012).

Tanımlanan halovirüslerin büyük kısmını, ΦH , $\Phi Ch1$ ve HF2 gibi, *Myoviridae* ve *Siphoviridae* familyasındaki bakteriyofajlara benzeyen litik ya da lizogenik baş ve kuyruklu virüsler oluşturmaktadır (Atanova ve ark., 2012). Ayrıca tanımlanan baş ve kuyruklu halovirüslerin 7-230 kbp büyüklüğündeki genoma sahip çift-zincirli DNA (dsDNA)'ya sahip olduğu belirtilmiştir (Santos ve ark., 2012).

Hipersalin su örneklerinin elektron mikroskopi incelemeleri, küresel ve iç-şekilli virüs benzeri partiküllerinde bu ortamlarda baskın türler olduğunu göstermektedir (Roine ve Oksanen, 2011). Bu morfotiplere ait olan virüslere, SH1 ikosahedral virüsü (Porter ve ark., 2005), iç-şekilli virüsler olan His1 ve His2 (Bath ve ark., 2006) ve pleomorfik virüsler olan HRPV-1 (Pietila ve ark., 2009) ve HHPV-1 (Roine ve ark., 2010) örnek olarak verilebilir.





Atanova ve arkadaşlarının 2012 yılında yayınlanan çalışmalarında, 9 farklı hipersalin ortamdan ekstrem halofilik mikroorganizaları enfekte eden 49 yeni virüs (4 *Bacteria* ve 45 *Archaea*) izole etmişlerdir. Bu yeni virüslerin birçoğu, baş ve kuyruklu morfolojiye sahipken, ayrıca ikosahedral ve pleomorfik virüsler de gözlenmiştir (Atanova ve ark., 2012).

Arkeal virüslerle karşılaştırıldığında, bakteriyofajlar oldukça yaygın bir şekilde çalışılmış ve günümüze kadar 5000'den fazla faj izolatu tanımlanmıştır. Bilinen bakteriyofajların büyük bir kısmı, üç tip baş ve kuyruklu virüsler, myo-, sipho- ve podovirüsleri içeren *Caudovirales* takımında sınıflandırılmıştır. Buna rağmen, hipersalin ortamlardaki halofilik bakteriyofajlar ile ilgili bilgi oldukça sınırlıdır (Atanova ve ark., 2012). Calvo ve arkadaşlarının 1988 ve 1994 yıllarında yayınlanan çalışmalarında *Halomonas halophila* strainlerinden üç faj

izole edilmiş, karakterize edilmiş ve isometrik baş ve kuyruklu olarak tanımlanmıştır. Kauri ve arkadaşlarının 1991 yılında yayınlanan çalışmalarında ılımlı halofilik bir bakteriye spesifik diğer bir bakteriyofaj tanımlanmıştır (Ventosa, 2006).

Halovirüslerin ortamlarındaki genel özellikleri (şekil ve genom büyüklüğü), saf kültürler kullanılarak izole edilen halovirüslerin gösterdiği genel karakteristik özellikleriyle yansıtamamaktadır (Santos ve ark., 2012). Baxter ve arkadaşlarının Büyük Tuz Gölü viral çeşitliliğini incelemeye yönelik çalışmalarında, viral çeşitliliğin doğru resmedilmesinin birçok metoda bağlı olduğundan ve yeni hipersalin ortamlardan keşfedilmesiyle ortaya çıktığından bahsetmişlerdir. Bu metotların, biyolojik süreçlerin ve fizikokimyasal koşulların ölçülmesi, geçirimli elektron mikroskobu (TEM), metagenom analizi ve *Archaea*, *Bacteria* ve *Eucarya* tarafından temsil edilen ekstrem halofilik organizmaları enfekte eden yeni virüslerin izolasyonu gibi yöntemler olduğu düşünülmektedir (Baxter ve ark., 2011).

Çizelge 1.1 Halovirüslerin morfoloji ve taksonomik sınıflandırılması [HRPV1 dışında hepsi dsDNA genoma sahiptir, + ile gösterilenler lineer genoma – ile gösterilenler halkasal genoma sahiptir. Int yazılı sütun ise integrasyon özelliğini göstermekte, + bu özelliğe sahip, - sahip değildir (Pina ve ark., 2011)]

Virion morfolojisi	Cins	Virüs adı	Konak	Genom			İzole edildiği yer	Kaynaklar
				Büyüklüğü	Lineer	Int		
İğ-şekilli	 <i>Salterprovirus</i>	His1	<i>Haloarcula</i>	14.4	+	-	Avusturalya	Bath & Dyall-Smith (1998)
		His2	<i>Haloarcula</i>	16	+	-	Avusturalya	Bath ve ark. (2006)
Küresel	<i>Sınıflandırılmamış</i> 	SH1	<i>Haloarcula</i> , <i>Haloferax</i> , <i>Halorubrum</i>	30	+	-	Avusturalya	Porter ve ark. (2005)
Pleomorfik	<i>Sınıflandırılmamış</i> 	HHPV1	<i>Haloarcula</i>	8	-	-	İtalya	Roine ve ark. (2010)
		HRPV1	<i>Halorubrum</i>	7	-	-	İtalya	Pietila ve ark. (2009)
Baş ve Kuyruklu 	<i>Myoviridae</i>	HF1	<i>Haloferax</i> , <i>Halorubrum</i>	76	+	-	Avusturalya	Nuttall & Dyall-Smith (1993)
		HF2	<i>Haloferax</i> , <i>Halorubrum</i>	77	+	-	Avusturalya	Nuttall & Dyall-Smith (1993)
		ΦH	<i>Halobacterium</i>	59	+	-	Tesadüfen	Schnabel ve ark. (1982)
		ΦCh1	<i>Natrialba</i>	58.5	+	-	Tesadüfen	Witte ve ark.(1997)
	<i>Siphoviridae</i>	Bj1	<i>Halorubrum</i>	43	-	+	Çin	Pagaling ve ark.(2007)

1.7. Halovirüslerin Morfolojik Çeşitliliği

Elektron Mikroskobu kullanımı ile yapılan çalışmalardan yola çıkarak önemli sayılarda var olduğu bilinen başlıca morfotipler aşağıda açıklanmıştır.

1.7.1. İğsi halovirüsler (Fusiform virüsler)

İğ şekilli virüsler yaygın bir şekilde *Archaea* domaininde, metanojenler, termofiller ve halofilleri içererek yaygın bir şekilde temsil edilmektedir.

Hipersalin ekosistemler ile yapılan çalışmalarda, iğsi virüslerin dominant virüs tipi olduğu görülmüştür. İğsi virüslere iyi bir şekilde karakterize edilmiş olan ve *Haloarcula hispanica*' yı enfekte eden His1 (Şekil 1.6) ve His2 (Şekil 1.6) virüsleri örnek verilebilir. Bu virüsler Salterprovirus cinsinde sınıflandırılmıştır. Limon şeklinde olan bu virüslerin boyutları genelde 44x67-77 nm olmakla birlikte, bazen farklı yapısal proteinlerden oluşan kısa kuyruklara sahip oldukları saptanmıştır. Her iki virüste litik olmakla birlikte, konak genomu içerisine entegrasyonundan sorumlu integras enzimini taşımazlar. Bu iki virüs benzer genom yapısına, terminal proteinler ile birlikte yaklaşık 15 kb lineer dsDNA' ya ve benzer DNA polimeraz genlerine sahip olmalarına rağmen genetik olarak uzaktan ilişkilidirler, bununla birlikte, diğer iğsi cinslerle homoloji göstermezler. His2 virionu dört protein ve kapsid proteinini (MCP) taşıdığı belirtilmiştir (Baxter ve ark., 2011; Pina ve ark., 2011).

1.7.2. Baş ve kuyruklu halovirüsler

Önceleri *Archaea* domaini üyelerinin baskın olduğu ortamlarda, bakteriyel baş ve kuyruklu virüs morfolojisinin nadiren görüldüğü düşünülmüş ve ekstrem ortamlarda rapor edilmemiştir. Fakat, virüs izolasyonunun çeşitli yaklaşımlar uygulanarak çalışılmaya başlanmasıyla baş ve kuyruklu morfolojideki virüslerin, tanımlanan haloarkeal virüs türlerinin önemli bir kısmını oluşturduğu saptanmıştır (Pina ve ark., 2011). Bu geniş kategorinin üyeleri olan halovirüsler ikosahedral baş ve çeşitli kuyruk yapılarıyla karakterize edilirler. Familyalar kuyruk yapılarına göre gruplanmıştır. Buna göre, *Siphoviridae* virüsleri uzun ve kasılmayan kuyruklara, *Myoviridae* virüsleri kasılan kuyruklara ve *Podoviridae* virüsleri çok kısa kuyruklara sahiptir (Jacquet ve ark, 2010). Hipersalin ortamlarda bulunan

virüsler bu morfotipler için iyi modeller oluştururlar, Φ H, Φ Ch1, HF1 ve HF2 virüsleri bu gruba örnek olarak verilebilir. HF1 ve HF2 oldukça iyi tanımlanmıştır (Şekil 1.5), her ikisinde litik fajlar olup *Haloferax*, *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Natrialba* ve *Halorubrum* cinslerini enfekte etmektedir (Baxter ve ark., 2011). HF1 ve HF2 halovirüsleri dizilerinin ilk % 60'lık kısmında %99'a kadar nükleotid benzerliği gösteren genomlara sahiptir. Bununla birlikte, geri kalan kısmında çeşitli nükleotid değişimleri ve insersiyon-delesyon gibi olaylara bağlı olarak, önemli derecede farklılık göstermektedir. Dizi benzerliğindeki bu önemli değişim, bu iki halovirüs ya da diğer HF benzeri halovirüsler arasında rekombinasyon olduğunu akla getirmektedir. Bu rekombinasyon varlığının hipersalin sulardaki virüsler arasında yaygın olduğu düşünülmektedir (Le Romancer ve ark., 2007). Bu virüsler morfolojik benzerlikler ile birlikte genomik seviyede de *Myoviridae* ve *Siphoviridae* familyalarındaki bakteriyal virüslere benzerdir, kapsid ve kuyruk oluşumunda ve virion toplanmasında proteinler yer alır, transkripsiyonel regülatörleri ve genom paketlenme enzimleri benzerdir. Bütün bu benzerlikler ile baş ve kuyruklu bakteriyal ve arkeal virüsleri aynı familyalarda sınıflandırmayı doğrulamaktadır (Le Romancer ve ark., 2007; Pina ve ark., 2011).

1.7.3. Küresel halovirüsler

Kuyruk içermeyen ikosahedral şekilli partiküller halovirüslerde gözlenen diğer bir gruptur. *Haloarcula* ve *Halorubrum* cinslerini enfekte eden litik bir virüs olan SH1, protein örtünün altında internal lipit tabakasına sahip olan küresel bir halovirüstür (Şekil 1.6). Benzer görünüşe sahip olmasına rağmen, SH1 lineer genomunun, *Sulfolobus*' u enfekte eden diğer küresel arkeal virüs olan SSIV ile hiçbir ilişkisi bulunmamaktadır. SH1' in yapısı cryo-EM ile iyi tanımlanmış olup, alışılmadık kapsit proteinleri ve çıkıntılı sivri ucu gibi bazı özgün yapısal özellikleri ortaya çıkarılmıştır (Porter ve ark., 2005). Bu kategorideki virüsleri TEM çalışmaları ile belirlemek zordur, kuyruklarını kaybetmiş baş ve kuyruklu virüsler ya da küresel şekle sahip olduğu varsayılan pleomorfik virüslerin temsilcileri oldukları düşünülebilir (Baxter ve ark., 2011). Bu virüs virion toplanması süresince konak tarafından edinilen bazı lipit parçalar ve 11 yapısal protein taşımaktadır. Transkripsiyonel çalışmalar SH1 genlerinin üç aşamada

transkribe edilen küçük sayıdaki operonlar içerisinde organize olduğunu göstermektedir (Pina ve ark., 2011; Bamford ve ark., 2005).

Günümüze detaylı olarak yeni çalışılmış *Saliseta longa* halofilik bakterisine yakın *Saliseta sp.* SP9-1 strainini enfekte eden “Saliseta icosahedral phage-1” (SSIP-1) virüsünün ikosahedral membran içeren çift zincirli DNA virüsü olduğu belirlenmiştir. Virion kompozisyonunun ve bazı fonksiyonlarının PRD-1 adenovirüs ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Elektron mikroskopi ile belirlenen virion yapısında, kapsidin dış proteinlerinin büyük kısmının kapsomer düzenlenişi belirlenmiştir (Şekil 1.7). Genomunun dizilenmesi ile bazı biyoinformatik analizler ve virion proteinlerinin proteomik analizleri doğrultusunda daha önceden belirlenmemiş genler içerdiği görülmüştür. SSIP-1 virüsünün yaşam döngüsünün litik olduğu, fakat bununla birlikte integras ve bazı represör/antirepresör genlerin varlığı ile ılımlı faza sahip olabileceği de düşünülmektedir (Aalto ve ark., 2012).

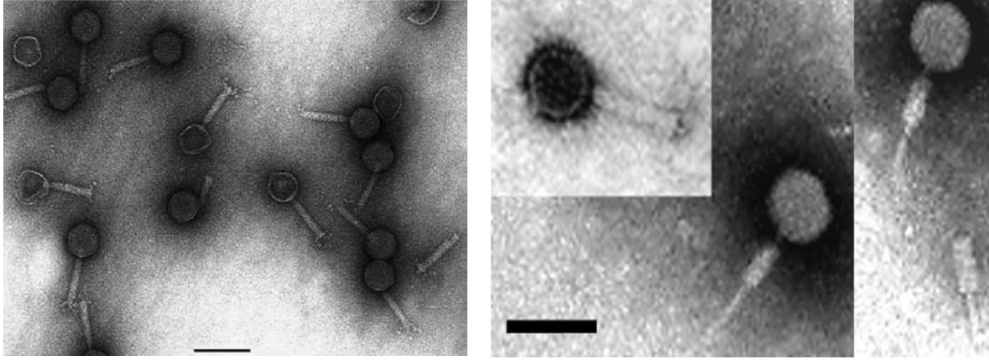
1.7.4. Pleomorfik halovirüsler

Hiperhalofilik *Halorubrum* cinsini enfekte eden “Halorubrum pleomorphic virus 1” (HRPV1), *Archaea* domaini enfekte ettiği bilinen tek ssDNA (tek zincirli DNA) virüsüdür. Pleomorfik şekil gösteren bu virüs, konak kaynaklı lipitleri içeren membran tarafından kaplanmıştır. İki ana membran protein içerir, bu proteinlerden biri dış yüzeyde diğeri de iç yüzeydedir. İnternal nükleoprotein henüz saptanmamıştır (Pina ve ark., 2011).

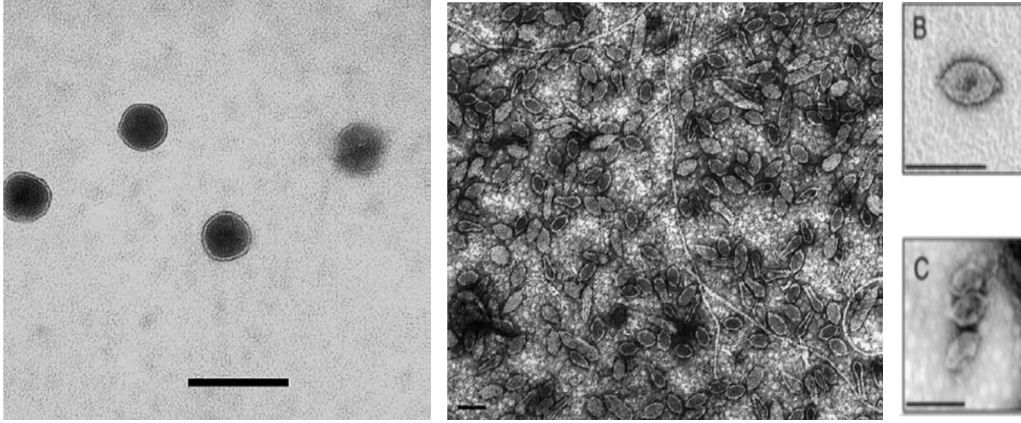
Ekstrem halofilik *Haloarcula hispanica*’ yı enfekte eden diğeri bir pleomorfik dsDNA virüsü olan “Haloarcula hispanica pleomorphic virus 1” (HHPV1)’ in keşfedilmesi ile şaşırtıcı taksonomik sonuçlar ortaya çıkmıştır. Virüsün halkasal genomu, aminoasit dizisi ve tahmini proteinleri HRPV1 virüsüne benzerdir. Bu durum, ssDNA virüsü ile dsDNA virüsü arasında yakın evrimsel bir ilişkiyi açığa vurmaktadır (Roine ve Oksanen, 2011; Pina ve ark., 2011).

Bu morfolojilere ek olarak, Akdeniz’in İspanya kıyılarında solar tuzlalarda yapılan çalışmalarda (Santos ve ark., 2012) ve Büyük Tuz Gölü’nde yapılan

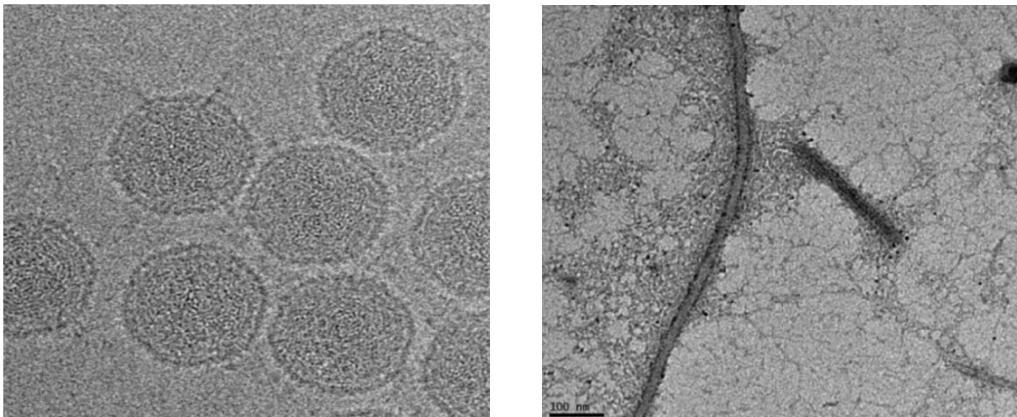
çalışmalarda (Baxter ve ark., 2011) yeni kategori olarak değerlendirilebilecek filament ve ubuk Şekli virüslerin varlığı görölmüştür.



Şekil 1.5. Baş ve kuyruklu HF2 virüsü [Solda, (Dyall-Smith ve ark.,2003)] ve HF1 virüsü [Sağda iki farklı kuyruk yapısında, ölçü çubuğu 100 nm göstermektedir (Tang ve ark., 2004)]



Şekil 1.6. Küresel SH1 virüsü [solda, (Dyall-Smith ve ark.,2003)], ię Şekli His1 virüsü [ortada, (Dyall-Smith ve ark., 2003)] ve ię Şekli His2 halovirüsü [sağda B ve C, (Bath ve ark., 2006)]



Şekil 1.7. İkosahedral SSIP-1 halovirüsünün elektron mikroskopi ile elde edilen görüntüsü [solda, (Aalto ve ark., 2012)] ve filament Şekli halovirüs [sağda, (Santos ve ark.,2012)]

1.8. Halovirüslerin Genom Çeşitliliği

Hipersalin ortamlar ayrıca, 10 kb ile 533 kb arasında değişen genom büyüklükleri ile büyük oranda genomik çeşitlilik gösteren virüslerin önemli bir deposudur. Atımlı-alan jel elektroforezi [Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)] analizleri viral populasyon yapısının tuzluluk gradiyentine göre değiştiğini göstermektedir. %4 ile % 22 oranında tuzluluk içeren ortamlarda, virüslerin genom büyüklüklerinin 32 kb ile 340 kb arasında, %22 tuzluluktan yoğun olan göllerde virüs genomlarının 10 kb ile 189 kb arasında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, %15'ten yüksek tuzluluk içeren solar tuzlarda çeşitliliğin daha az olduğu ve 32-63 kb arasındaki genomların baskın olduğu görülmüştür Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi PFGE ile analiz edilen viral çeşitliliğin denizsel ortamlarla kıyaslandığında tuzlarda daha az olduğu belirlenmiştir. Toplam prokaryotik kommunité yapısının tuzluluğa bağlı olduğu ve böylece viral populasyonların dinamiğinin de konaklarının ekolojisine bağlı olduğunu düşündürmektedir (Diez ve ark., 2000; Sandaa ve ark., 2003; Le Romancer ve ark., 2007; Santos ve ark., 2007, Sandaa ve ark., 2009).

1.9. Viral Çeşitlilik Analizinde Metagenomik Yaklaşım ve Önemi

Doğadaki mikroorganizmaların %0,1-1 oranlarında kültüre edilebilir olması, kültür temelli teknikler ile faj tiplerini elde etmeyi sınırlamaktadır. Doğada kültüre edilmemiş organizmaların genomlarına ulaşmayı sağlayan metagenomik yaklaşım, çevresel populasyon genomlarını çalışmayı temel almaktadır. Benzer olarak, faj metagenomiği, kültüre edilmemiş faj komünite genomunu (metavirom) çalışmayı temel alır (Paul ve Sullivan, 2005). Denizsel ortamlardaki virüs populasyonlarının metagenomik uygulamaları, viral populasyonların metagenomik çalışılmasına derinlemesine bakış açısı kazandırmıştır. Virüslerin metagenomik çalışmaları 2002 yılında kültüre edilmemiş iki denizsel viral komüniteler ile ilgili çalışma yayınlandığında başlamıştır (Breitbart ve ark., 2002). Sucul ortamların doğasında var olan fajların çalışmalarında, önce virüsler fiziksel olarak mikrobiyal hücrelerden ayrılmış ve amplifikasyon teknikleri kullanımından sonra 'shotgun' viral DNA kütüphaneleri oluşturulmuştur. Bu kütüphaneler daha sonra rastgele dizilenmiş ve denizsel

ortamların oldukça fazla viral çeşitlilik gösterdiği doğrulanmıştır. Viral kütüphanelerin incelenmesiyle elde edilen dizilerin %65'inin yeni olduğu ve veri tabanlarında bilinen genlerle önemli bir benzerlik göstermediği görülmüştür. Gen Bankasındaki benzerlik gösterenler ise, DNA ve RNA polimerazlar, helikaz, DNA maturazlar, terminazlar, ekzonükleazlar ve integrazlar ve yapısal proteinler ile ilgili genlerle eşleştiği belirlenmiştir (Paul ve Sullivan, 2005). dsDNA fajları için uygunluğu görülen bu yaklaşımlar daha sonra sediment örneklerine ve RNA virüslerine de uygulanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Farklı yerlerden toplanan denizsel örneklerdeki viral toplulukların kapsamlı karşılaştırmalı analizleri sucül virüs türlerinin küresel yayılıma sahip olduğunu göstermiştir. İlk viral metagenomik analizleri doğada var olan virüslerin genomik çeşitliliğinin keşfi ve yorumlanması için başlangıç noktası olmuştur. Ayrıca, bu çalışmalar sonraki aşamalar olan, mikrobiyal komünite genomu, metagenomik örneklerden toplanan virüslerin ve hücresel konakların bir araya getirilmiş analizleri hakkında temel sağlamaktadır (Paul ve Sullivan, 2005; National Research Council, 2007).

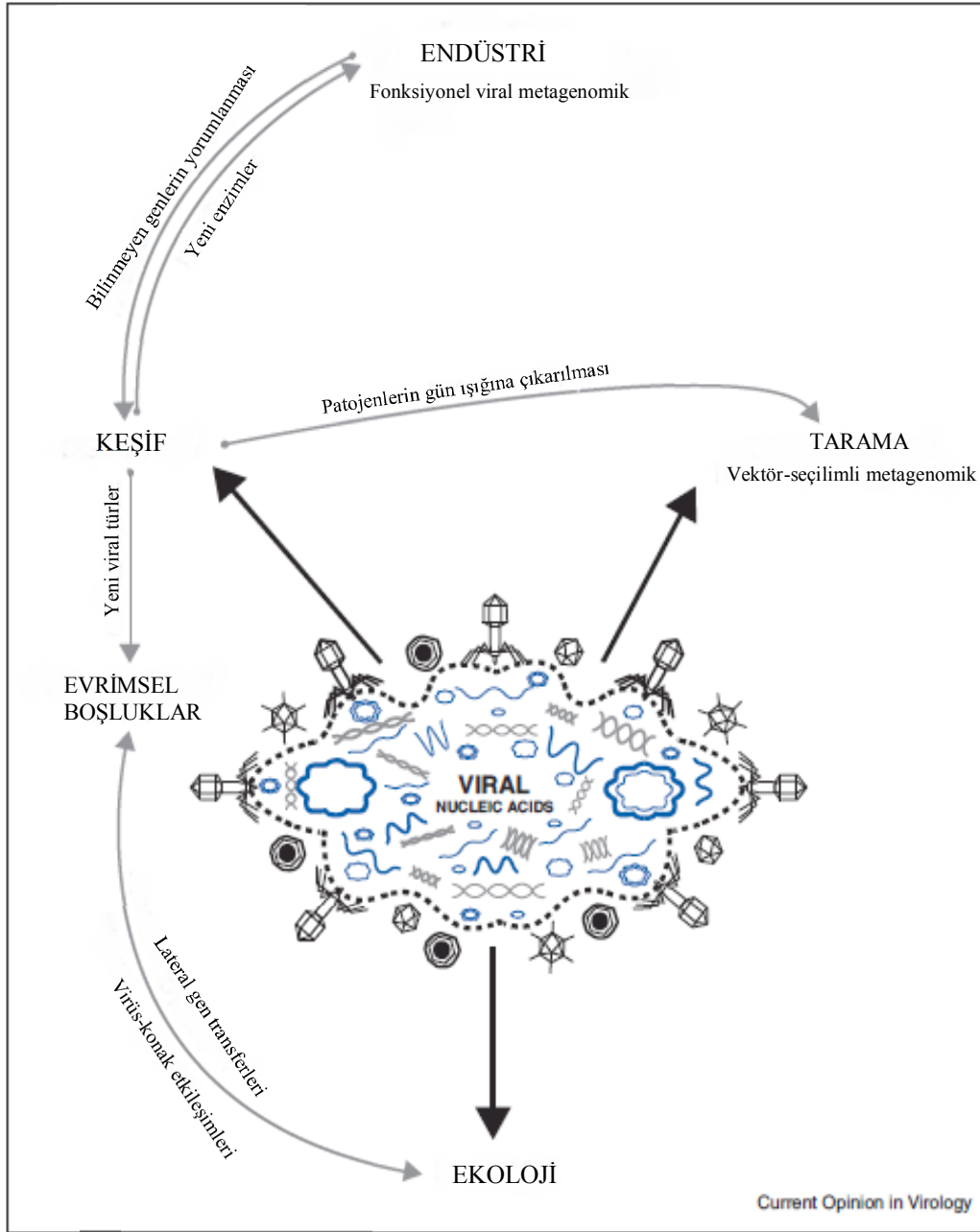
Laboratuvarda kültüre edilemeyen virüslerin moleküler yöntemler ile incelenmesinde kullanılan yaklaşımlardan biri, dizi bilgisi bilinen virüslerden yola çıkarak bilinmeyenlerin tanımlanmasıdır. Bu işlemler mikrodizinler (microarray), hibridizasyon temelli yöntemler ya da genomun çeşitli PCR yöntemleri ile amplifikasyonu gibi yöntemleri kapsamaktadır. Fakat çevresel örneklerde bulunan virüslerin henüz dizi bilgileri yeterli olmadığı için böyle yaklaşımlar henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ayrıca virüslerin moleküler çalışmalarında kullanılan bu yöntemlerin bazı teknik optimizasyonları zaman alıcıdır. Bununla birlikte metagenomik yaklaşımın günümüzde gelişmesiyle tüm bu sorunlar ortadan kalkmakta ve çevresel örnekler (sucül ortamlar, sedimentler, toprak, termal sular) ya da sağlıkla ilişkili olarak insan mikrobiyomu bu yaklaşımla çalışılmış ve bilinmeyen virüsler keşfedilmeye başlanmıştır (Delwart, 2007; Bexfield ve Kellam, 2010).

Günümüzde 'Next Generation Sequencing Technologies' olarak adlandırılan yeni nesil dizileme yöntemleri sayesinde viral metagenomik çalışmalardan elde edilen veri son 5 yılda artış göstermektedir. İlk çevresel viral

metagenom dizilendikten yaklaşık 10 yıl sonra, viral metagenomik yaklaşımlar viral komünite yapısını anlamada ve yeni gen ve virüslerin keşfinde kaçınılmaz araçlar haline gelecektir (Rosario ve Breitbart, 2011).

1.9.1. Fonksiyonel viral metagenomik

Bakteriyofajların ya da diğer virüslerin enzimleri, günümüzde moleküler biyolojinin gelişimiyle oldukça önemli araştırma araçları haline gelmiştir. Bununla birlikte, günümüzde viral enzimler hakkındaki birikim yalnızca bu enzimlerin potansiyeli hakkındaki imalardır. Son 10 yıllarda metagenomik analizlerin artmasıyla virüslerin yoğunluğu ve çeşitliliğinin tahminine rağmen, günümüzde genelde kullanılan enzimler az sayıda kültüre edilmiş olan virüslerden gelmektedir. Virosferde saklı enzim hazinesine ulaşmak ve onları araştırmalar, terapötik ve diagnostik kullanımlarda geliştirmek için, viral genlerin oldukça hızlı ve etkin bir biçimde keşfetmek, eksprese etmek gerekmektedir. Günümüzde viral enzimler genellikle T4, T7, lambda, SP6 ve phi29 fajları ve ayrıca bazı retrovirüslerin sahip olduğu enzimlerdir. Sucul ortamlar ve toprak, 10^7 - 10^8 /ml-gr virüs benzeri partikül içermekte ve her bir örnekte birçok virüs tipi bulunmaktadır. Fakat yeni virüslerin kültür çalışmaları ile çeşitliliğini analiz etme çabaları teknik sorunlar nedeniyle engellenmekte ve çok az viral enzim elde edilmektedir. Kültüre edilmemiş viral toplulukların direkt izolasyonu ve dizi analizi, çevresel viral komünitelerin yapısı ve kompozisyonu hakkında bilgi sağlamakta, bu durumda gelecekte viral enzimlerin daha aktif bir biçimde ortaya konması beklentisini doğurmaktadır (Schoenfeld ve ark., 2010).



Şekil 1.8. Viral metagenomik uygulamaları (Rosaria ve Breitbart, 2011)

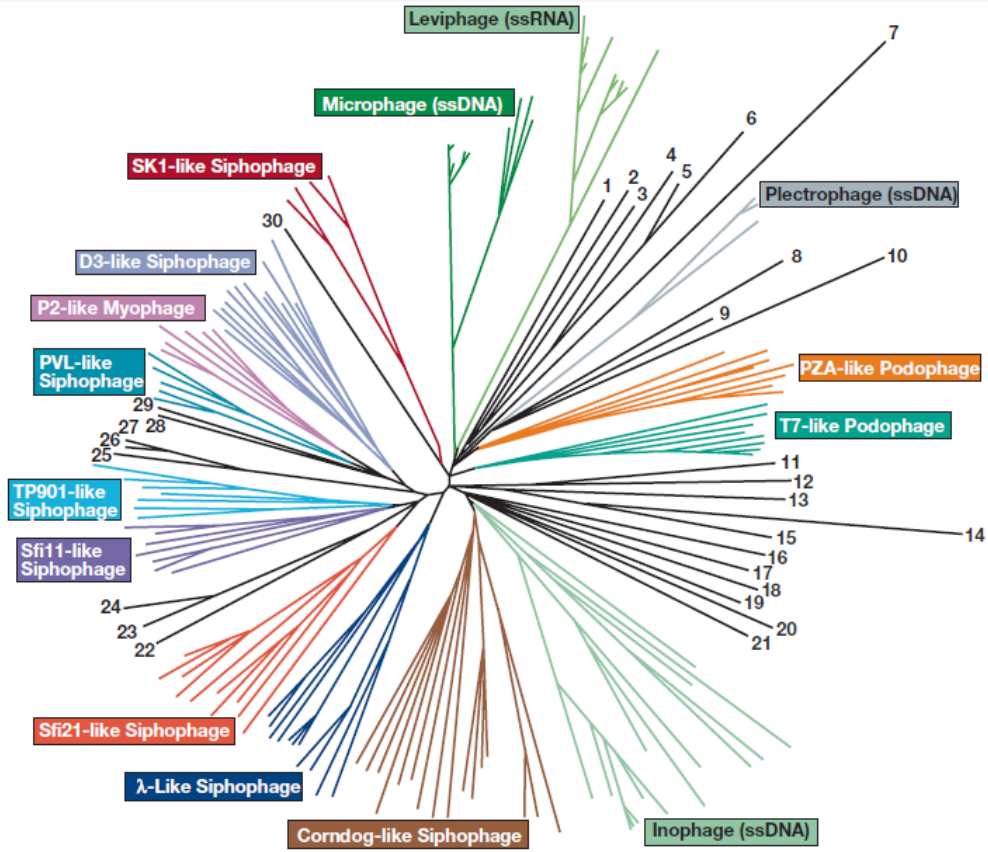
1.10. Faj Filogenisi ve Taksonomisi

Hücrel organizmaların filogeni ve taksonomik ilişkileri ribozomal DNA dizilerinden belirlenirken, bütün viral genomlarda böyle ortak ve korunmuş bir dizi bulunmamasından dolayı virüslerde bu teknik uygulanamaz. Faj karakterizasyonu konaklarına ve kapsit büyüklüğü, şekli, organik çözücülere dirençliliği gibi fiziksel özelliklerine ve genom büyüklüğü ve şekline (tek zincirli RNA/DNA ya da çift zincirli RNA/DNA) göre belirlenmektedir. Bu taksonomik sistem düzenli bir şekilde “International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV)” tarafından onaylanmakta ve güncelleştirilmektedir. ICTV taksonomik sistemi, faj partiküllerinin kapsit morfolojisini belirlemek için elektron mikroskobu kullanarak görüntülenmesine ihtiyaç duymaktadır. Fakat birçok araştırmacı bu prosedürü rutin bir şekilde gerçekleştirememekte ve Gen Bankasında tamamen dizilenen virüslerin ICTV sitemine göre sınıflandırılmadığı için elde ettikleri bilgileri resmetmesinde zorluklar yaşamakta ve bu sistemin yeterli olmadığını düşünmektedir (Rohwer ve Edwards, 2002).

Son zamanlarda, bazı farklı yaklaşımların tasarlanmasıyla viral sınıflandırmanın nükleotid dizisini temel alan sistemlere dayandırılması amaçlanmaktadır. Viral identifikasyon ve taksonomide en genel dizi bazlı yaklaşım, kapsit ya da DNA polimeraz geni gibi tek gen lokusu kullanımıyla spesifik bir viral grubu karakterize etmektir. Bu genlere göre PCR primerleri sonradan tasarlanmış ve çevresel örneklerden direk olarak amplifiye edilen DNA ürünlerinin klonlanması ve dizilenmesine olanak vermiştir. Bu tek-lokus yaklaşımı çevresel örneklerde birçok virüs grubunun kültüre edilmediğini ve virüslerin biyomlar arasında hareket ettiğini göstermektedir. Fakat bu yaklaşım, spesifik virüs gruplarıyla çalışmaktadır ve genomlar arasındaki lateral gen transferi elde edilen verinin yorumlanmasını zorlaştırmaktadır (Edwards ve Rohwer, 2005).

Bu yaklaşımlarla oluşturulan ‘Phage Proteomic Tree’, her faj genomundaki her bir geni kullanarak fajlar arasında ortalama uzaklığı belirleyen taksonomik sistem bazlı bir algoritmadır (Şekil 1.9). Genellikle dahil edilen ilave genomlar ağacın ilk versiyonunda tasarlanan sınıflandırmayı değiştirmemektedir.

Birçok durumda bir grubun diğer gruplara bağlı dal uzunluğu artmakta, ya da her grupta daha fazla üye katılmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda gelecekte grupların aynı şekilde kalacağı görülmektedir. Faj genomlarının yaklaşık % 20'si henüz bir gruba dahil olmamıştır ve bu durum bir çok yeni faj familyasının henüz keşfedilerek karakterize edilmediğini göstermektedir (Edwards ve Rohwer, 2005).



1. *Staphylococcus* spp. ϕ K | 2. *E. coli* ϕ T4 (Myo) | 3. *P. aeruginosa* ϕ KZ (Myo) | 4. *Pseudomonas syringae* ϕ 8 (Cysto) | 5. *P. syringae* ϕ 12 | 6. *P. syringae* ϕ 6 | 7. *Burkholderia thailandensis* ϕ E125 | 8. *Propionibacteria* ϕ B5 | 9. *Pseudoalteromonas espejiana* ϕ PM2 (Cortico) | 10. *P. syringae* ϕ 13 | 11. *Sinorhizobium meliloti* ϕ PBC5 | 12. *E. coli* ϕ P4 (Myo) | 13. *E. coli* ϕ Mu (Myo) | 14. *Acholeplasma* sp. ϕ MV-L1 (Ino) | 15. *Sulfolobus shibitae* ϕ 1 (Fusello) | 16. *Mycobacterium* ϕ Bxz1 | 17. *Halorubrum coriense* ϕ HF2 | 18. *Burkholderia cepacia* Bcep781 | 19. *Natrialba magadii* ϕ Ch1 (Myo) | 20. *Mycoplasma arthritidis* ϕ MAV1 | 21. *B. subtilis* ϕ SPP1 (Sipho) | 22. *Acholeplasma laidlawii* ϕ L2 (Plasma) | 23. *Methanobacterium thermoautotrophicum* ϕ ψ M2 (Sipho) | 24. *Methanothermobacter wolfeii* pro- ϕ M100 | 25. *V. cholerae* ϕ K139 | 26. *Haemophilus influenzae* ϕ HP2 | 27. *H. influenzae* ϕ HP1 (Myo) | 28. *L. casei* ϕ A2 (Sipho) | 29. *B. subtilis* ϕ 105 (Sipho) | 30. *Listeria monocytogenes* ϕ A118 (Sipho)

Şekil 1.9. Faj genomları ve metagenomik diziler arasındaki benzerlikleri belirlemede kullanılan tüm genom temeline dayalı 'Phage Proteomic Tree' [Bu ağaçta 167 faj genomu bulunmaktadır ve siyah dallarla gösterilip numaralandırılan fajlar henüz herhangi bir grupta sınıflandırılmamıştır. Halovirüslerden HF2 ve Φ Ch1 sırasıyla 17 ve 19 numaralı dalları temsil etmektedir (Edwards ve Rohwer, 2005)]

1.11. Kültür-Bağımsız Yöntemler ile Virüslerin Komünite Ekolojisinin İncelenmesi

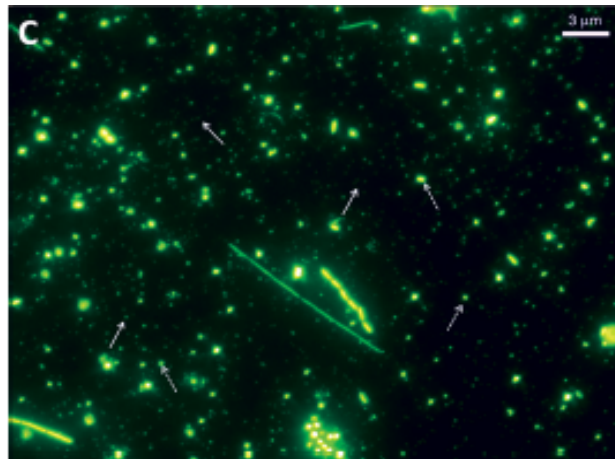
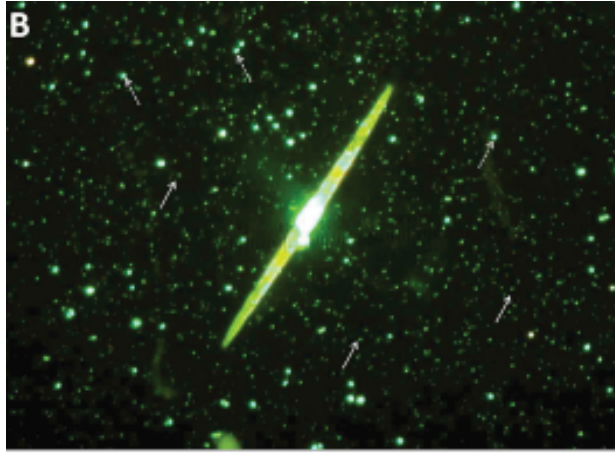
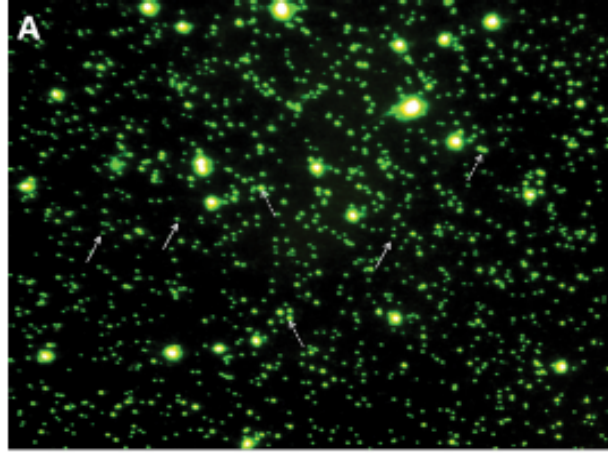
Virüslerin sucul mikrobiyal besin ağının önemli bir bileşeni olduğu bilinmekte, böylece etkilerini anlamak için virüs benzeri partikülleri hızlı ve doğru değerlendirecek protokoller gerekmektedir. Bu yüzden mikroskopi ve moleküler temelli çalışmalar virüslerin mikrobiyal topluluğu etkileyen bileşen olduklarını ispatlamada tercih edilen diğer yöntemlerdir. Bu protokollerin temeli, virüs benzeri yapıların yoğunluğunun belirlenmesi ve doğal su örneğindeki virüs benzeri yapıların çeşitliliğini belirlemek amacıyla komünite karakterizasyonudur (Chen ve ark., 2001; Wommack ve ark., 2009).

1.11.1. Epifluoresan mikroskopi (EFM) ile viral yoğunluğunun belirlenmesi

Virüsler sucul ortamlardaki en yoğun biyolojik varlıklar olup (10^8 - 10^9 VLP/ml) genellikle bakterilerden 10-100 kat fazla miktarda bulunurlar. Virüslerin büyüklüklerinin çok küçük olmasından dolayı (20-200 nm) ışık mikroskobu ile incelenememekte ve bu yüzden alternatif yaklaşımlar geliştirilmektedir. Sucul ortamlarda bulunan virüslerin diğer sucul mikroorganizmalar üzerindeki etkisini anlamak için birçok sucul ortamdaki viral partiküllerin yoğunluğu değerlendirilmektedir. Bu değerlendirmeler için önceleri elektron mikroskobu kullanılmaktaydı. Bu metod ile örnek hazırlanması oldukça uzun ve zahmet alıcı olduğundan, elektron mikroskobunun her araştırma laboratuvarında sağlanamayan bir cihaz olmasından dolayı ve günümüzde iş gücünün daha kolay olduğu yöntemler bulunduğundan viral yoğunluğun tespiti için pek tercih edilmemektedir. Aynı zamanda elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde viral yoğunluğun daha düşük olarak tahmin edildiği sonucuna varılmış ve bu amaçla fluoresan boyaların kullanılmasıyla epifluoresan mikroskobu yönteminin daha tutarlı sonuçlar verdiği belirlenmiştir (Hennes ve Suttle, 1995; Suttle, 2007). Son zamanlarda virüs boyutlarındaki partikülleri sayımına dayalı olan flow sitometri yöntemi viral yoğunluğu belirlemede kullanılan diğer bir yöntemdir (Wen ve ark., 2004). Fakat özel fluoresan boyaların keşfi ile daha doğru ve daha hızlı bir yöntem olan Epifluoresan Mikroskopi (EFM) yöntemi viral yoğunluğun belirlenmesinde en çok tercih edilen yöntemdir (Ortmann ve Suttle, 2009).

EFM bazlı metodlar, filtreler üzerinde tutulan nükleik asitlere bağlanma katsayısı yüksek olan floresan boyalar kullanılarak boyamanın gerçekleştiği ve floresan mikroskobu kullanımı ile tek tek sayımının yapılarak viral yoğunluğun belirlendiği yaklaşımdır. Floresan boyalar olarak, DAPI, YoPro-1, SYBR Green I ve SYBR Gold çevresel örneklerdeki virüs benzeri partiküllerin sayımında kullanılmaktadır. Bu boyaların kendi aralarında avantaj ve dezavantajları çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Kısaca bahsetmek gerekirse, Yo-Pro I floresan boyası oldukça stabil floresan özelliğe sahiptir ve DNA'ya güçlü bir biçimde bağlanmasına rağmen, boyanın örnekle inkübasyon süresi yaklaşık 2 gündür ve bu yüzden fazla tercih edilmemektedir. SYBR Gold ile SYBR Green I boyaları için örnek ile yaklaşık 15 dakika inkübasyon süresi yeterlidir, SYBR Gold daha sonra geliştirilmiş olup, daha uzun süre stabil floresan ışımaya vermekte ve günümüzde çalışmalarda daha fazla tercih edilmektedir. EFM ile elde edilen viral sayımların doğru ve tutarlı sonuçlar verdiği düşünülmekte ve daha kolay bir şekilde yapıldığı için viral yoğunluğu belirlemede bu boyaların kullanımı ile EFM daha çok tercih edilmektedir (Chen, 2001; Hermes ve ark., 1995; Suttle ve ark, 2010; Patel ve ark, 2007; Jacquet ve ark., 2010).

Brum ve Steward (2010) çalışmalarında alkalın bir tuzlu göl olan Mono Gölü'nde virüs popülasyonunu analiz etmişler ve viral yoğunluğu belirlemek amacıyla SYBR Gold boyası ile boyama yaparak EFM kullanarak viral yoğunluğu belirlemişlerdir. Bettarel ve arkadaşları (2011), Senegal'de dört farklı tuz gradientine sahip ortamlardaki virüs ekolojisi ile ilgili yaptıkları çalışmada viral yoğunluğu belirlemek için SYBR Gold boyası kullanmışlar ve EFM ile viral yoğunluğu belirlemişlerdir.



Şekil 1.10. Çeşitli fluoresan boyalar ile boyanmış çevresel örneklerin görüntüsü [A) YoPro I boyası ile B) SYBR Green I boyası C) SYBR Gold boyası ile boyanan örnekler olup, virüs benzeri partiküller (VLP) beyaz oklarla gösterilmiştir (Suttle ve Fuhrman, 2010)]

1.11.2. Geçirimli elektron mikroskopi (TEM) ile virüs morfolojilerinin belirlenmesi

Doğadaki viral çeşitliliği çalışmak için kullanılan yaklaşımlardan biri negatif boyanmış örneklerin Geçirimli Elektron Mikroskopi [Transmission Electron Microscopy (TEM)] kullanımıyla incelenmesidir. Bu yaklaşım viral topluluğun morfolojik karakterizasyonunu sağlamasının yanı sıra ayrıca morfolojik sınıflandırma imkanı vermektedir. Bununla birlikte, bu yaklaşımın virüslere benzeyen partiküllerin ölçümünü yapmak gibi bir avantajı bulunmaktadır (Hennes ve Suttle, 1995; Wommack ve Colwell, 2000; Suttle, 2007).

TEM virüslerin küçük boyutlarına bağlı olarak net görüntüler veren tek tekniktir. Virüs partiküllerinin incelenmesi çalışmalarında negatif boyama geniş ölçüde kullanılmaktadır. Bu boyama yönteminde, karbon kaplı grid üzerine alınan örnek, ağır metal tuzlar (fosfotungstik asit ya da uranil asetat) ile boyanmakta ve böylece örnek içerisindeki virüslerin saptanması mümkün hale gelmektedir. Negatif boyama sayesinde virüs partikülleri ile arka plan arasında belirgin bir kontrast oluşmakta ve böylece virüs partiküllerinin morfolojik yapıları belirlenmektedir (Roingeard, 2008). Bu sayede virüslerin eş zamanlı olarak karşılaştırma, sınıflandırma ve identifikasyonu yapılmaktadır (Ackermann, 2009).

TEM, viral fabrikaların dikkat çekici görüntülerini sağlamasıyla farklı özelliklere sahip olan virionların oluşumunu çalışmada da kullanılan bir yöntemdir. Ayrıca, viral topluluklarda farklı aşamalarda olan virüs partiküllerinin morfolojik özelliklerini, zarf ile örtülü virüslerin lipit membranını belirlemek gibi, karakterize etmekte kullanılmakta ve olgun ve gelişmemiş partiküllerin ayrımı yapmayı sağlamaktadır (Roingeard, 2008).

Hipersalin sularda bulunan virüslerin morfolojisinin ilk sistematik incelenmesinde, İspanya'da kıyı tuzlarında mikrobiyal komüniteleri çalışmada Guixa-Boixareu ve arkadaşları (1996) tarafından TEM kullanılmıştır. Sonrasında Ölü Denizde bulunan virüsler TEM ile gözlemlenmiştir (Oren ve ark., 1997). Sonraki zamanlarda, İspanya'da solar tuzlalarda (Santos ve ark., 2007), Retba Gölü (Senegal) (Sime-Ngando ve ark., 2010), Büyük Tuz Gölü (Utah) (Baxter ve

ark., 2011) ve Mono Gölü'nde (Kalifornia) (Brum ve Steward, 2010) bulunan virüslerin morfolojilerinin incelenmesinde TEM kullanılmıştır.

1.11.3. Atımlı-alan jel elektroforezi (PFGE) ile viral çeşitliliğin belirlenmesi

Mikrobiyal komünite çalışmalarında kültür bazlı çalışmaların sınırlamalarından kaçınmak için genetik parmak izi belirleyen yöntemlerden biri olan Atımlı-alan Jel Elektroforezi [Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)] viral komünitenin zenginlik, çeşitlilik ve dinamiklerini incelemek için kullanılmaktadır. PFGE büyük DNA parçalarının elektroforetik ayırımına dayalı bir yöntem olup, teknik sucul ortamlardaki çift iplikli DNA virüslerinin 10-100 kb (katları) büyüklüğündeki genomlarının ayırımını sağlamaktadır. Sucul ortamlardaki çift iplikli DNA'ya sahip viral çeşitliliği belirlemede PFGE kullanımı, önemli zamansal ve mekansal değişikliklerin genom büyüklüğünde kendini gösterdiğini ve viral komünitelerin canlılığının konak popülasyonunun dinamiği ile yüksek oranda ilişkili olduğunu vurgulamaktadır (Sandaa ve ark., 2009; Jacquet ve ark., 2010).

Viral toplulukların genetik parmak izinin belirlenmesinde kullanılan bu tüm genom parmak izi yaklaşımında, virüsler hücrelerden ayrılır, ultrafiltrasyon ve ultrasantifüj ile bir araya toplanır ve viral DNA ekstrakte edilir. Komüniteye ait viral genomlar agaroz jel üzerinde büyüklüklerine göre ayrılırlar ve jel üzerindeki bantların sayısı viral türlerin genom büyüklüklerini gösteren tahmini sayısı olarak yorumlanır (Weinbauer, 2004; Jacquet ve ark., 2010).

Bununla birlikte, viral genomların araştırılmasında PFGE kullanıldığında, farklı viral türlerin genom büyüklüğü aynı olabileceğinden dolayı elde edilen veriler iyi değerlendirilmeli ve diğer yöntemlerle birlikte desteklenmelidir (Sandaa ve ark., 2009). Wommack ve arkadaşları, viral komüniteleri PFGE yöntemi ile ayırmış ve faj strainlerine ya da benzer genom büyüklüğüne sahip bir virüs grubuna spesifik nükleik asit probolar ile hibridizasyon yöntemi uygulamış ve böylece spesifik viral popülasyonların zamansal ve uzaysal olarak belirlemiştir.

PFGE ve genetik belirleyiciler yeni viral dizileri belirlemede ve bunları diğer biyolojik, kimyasal ve fiziksel parametrelerle ilişkilendirmede oldukça

kullanışlı yöntemlerdir. Bununla birlikte, DNA fajları ya da RNA fajları gibi gruplar arasındaki farklı türleri tahmin etmede yeterli olmayabilir. Fakat PFGE parmakizi yöntemleri arasında en uygunu olup, sonuçları TEM gibi diğer yöntemlerle karşılaştırılabilen bir yöntemdir (Weinbauer, 2004; Jacquet, 2010).

Diez ve arkadaşları (2000), İspanya’da farklı tuzluluktaki havuzlara sahip solar tuzlada, bu farklı tuz konsantrasyonlarına sahip havuzlarda bulunan viral topluluğun genom çeşitliliğini analiz etmek için PFGE yöntemi kullanmışlardır. Jiang ve arkadaşları (2003) Kaliforniya’daki yüksek alkaline özelliğe sahip bir tuz gölü olan Mono Gölü’nün viral çeşitliliği birden fazla yaklaşım kullanımıyla araştırmışlar ve viral topluluğun genom çeşitliliğini belirlemek üzere PFGE yöntemini kullanmışlardır. Sandaa ve arkadaşları (2003), farklı tuzluluk gradientine sahip solar tuzlalardaki viral genomların büyüklüğünü incelemişler ve tuzluluk gradientlerine göre viral genomların farklı büyüklükte olduğunu ve denizsel ortamlara göre daha az çeşitlilikte olduğunu bulmuşlardır. Santos ve arkadaşları (2007), farklı tuzluluk gradientine sahip tuzlalardan viral çeşitliliği incelemişler, yaklaşımlardan biri olan PFGE analizinde farklı gradiente sahip tuzlalarda ortak genom büyüklüğünün yaklaşık 37 kb olduğunu belirlemişlerdir. Bunun gibi yapılan çalışmalarda, toplam prokaryotik komünite yapısındaki değişikliklerin tuzluluğa bağlı olarak meydana geldiği ve böylece viral popülasyonların konaklarının ekolojisine bağlı olarak dinamik olduğunu göstermektedir.

1.11.4. Viral DNA izolasyonu ve metagenomik kütüphane oluşturulması

Viral ekolojide birçok kültür bağımsız yaklaşımın uygulanmasında ana basamak, çevresel örnekten virüslerin yoğun bir şekilde elde edilmesini içermektedir. Viral nükleik asitlerin izolasyonu öncesinde virüs partiküllerinin sayılarının artırılması ve mikrobiyal hücrelerin nükleik asitlerinin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla viral nükleik asit izolasyonu öncesinde uygulanan 2 yaklaşım vardır, bunlar ultrafiltrasyon, ultrasentrifüj işlemleridir. Kültür bağımlı yollarla virüslerin sayıları artırılıp ultrasentrifüj ile saflaştırılabildiği gibi, su örneği ultrafiltrasyon ile konsantre edilerek virüs partikülleri yoğunlaştırılabilir (Delwart, 2007; Wommack ve ark., 2009). Bu

işlemlerin yanısıra DNaz ya da RNaz gibi enzimler kullanımı ile viral olmayan nükleik asitler ortamdan uzaklaştırılabilir (Delwart, 2007). Virüslerin genomik DNA izolasyonu virüslerin konsantrasyonunun ardından genom büyüklüğünün belirlenmesi ve dizi analiziyle nükleik asit dizisinin belirlenmesi için gereken temel basamaktır. Bu şekilde moleküler yönden virüs tiplendirilmesi ve gen bankasına katkıda bulunmak mümkün hale gelmektedir (Bath ve ark., 1998).

Genomik materyalin izolasyonu viral metagenomikte önemli bir aşamadır. Büyük insert taşıyan kütüphane oluşturulmasında yeterli miktarda genomik materyalin izole edilememesi sorun yaratmaktadır. Sucul örneklerde 10^9 VLP/ml gibi yüksek oranlarda viral partikül bulunmasına rağmen, genomik DNA ya da RNA subnanogram kalitesinde elde edilmektedir. Bu duruma, mikrobiyal genomun sebep olduğu düşünülmektedir. Mikrobiyal genom büyüklük olarak yüzlerce viral genoma denk gelmektedir ve çok az mikrobiyal hücre ya da viral olmayan serbest DNA, viral nükleik asit izolasyonunda çok ciddi bir kontaminasyona sebep olmaktadır. Kontaminasyon filtrasyon, santrifüj ve nükleaz muamelesinde meydana gelebilmektedir. Klonlamada kullanılan DNA'nın kalitesi metagenomik kütüphane oluşturulmasında çok önemlidir, çünkü istenmeyen dizilerin varlığı oluşturulan metagenomik kütüphanelerde viral DNA'dan elde edilen sonuçları etkileyecek ve ayrıca devam çalışmalarında bu metagenomik kütüphane kullanıldığından sonuçlar bu kütüphaneye göre oluşturulacaktır (Schoenfeld ve ark., 2010).

Kütüphane oluşturulurken büyük insert parçaları, shotgun kütüphane oluşturulması ile 3 kb' den kısa boyutlarda temsil edilmekte ve bu durum da dizi analizi sonrası hatalı veri yorumlamaya neden olmaktadır. Ayrıca viral genomların zayıf promotor içeren ve yüksek kopya sayısı veren vektörlerin kullanımı ile sapma olmadan klonlanması çok zordur. Bu yüzden genellikle transkripsiyon faktörü içermeyen halkasal ya da lineer vektörler tercih edilmektedir (Schoenfeld ve ark., 2010).

Breitbart ve arkadaşları (2002), iki farklı denizel sistemindeki viral komüniteyi incelemek amacıyla, viral DNA'yı ultrafiltrasyon ardından ekstrakte etmişler ve metagenomik kütüphane oluşturarak analizlerine devam etmişlerdir.

Angly ve arkadaşları (2006), bütün viral komünite genomunu ekstrakte etmişler ve yeni nesil dizileme teknolojileri ile dizi analizini gerçekleştirerek denizel virüslerin çeşitliliği ve dağılımı hakkında kapsamlı çalışma uygulamışlardır. Santos ve arkadaşları (2007; 2010), farklı tuzluluğa sahip tuzlalardaki viral topluluğu metagenomik kütüphane oluşturarak araştırmışlardır.

Bu çalışmada Tuz Gölü'nde bulunan viral komüniteyi doğru resmetmek amacıyla çeşitli kültür bağımsız yaklaşımların bir arada uygulandığı bir yol izlenmiştir. Tuz Gölünde bulunan ve buradaki mikrobiyal biyotayı etkileyen halofilik virüslerin yoğunluğunu belirlemek için direkt su örneğinden floresan boyama sonucu Epifluoresan Mikroskop (EFM) kullanılarak SYBR Gold sayımı gerçekleştirilmiştir. Su örneği filtre edilerek bakteri hücreleri uzaklaştırılmış ve filtrat ultrafiltrasyon yöntemi ile konsantre edilmiştir. Elde edilen konsantreden virüs benzeri yapıların morfolojileri Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Ayrıca ortamdaki halofilik virüslerin popülasyon dinamiğini ve çeşitliliğini belirlemek için Atımlı-alan Jel Elektroforez (PFGE) yöntemi uygulanmıştır. Genomik DNA izolasyonu yapılmış ve viral DNA elde edilmiştir. Son olarak elde edilen viral DNA'dan fosmid vektör kullanımıyla metagenomik kütüphane oluşturulmuştur. Ayrıca, örnekte bulunan mikroorganizmaların çeşitliliği ve aktivitesi 16S rRNA geni analizine dayalı yöntemler olan Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE) ve Floresan In-situ Hibridizasyon (FISH) yöntemleri ile incelenmiştir. DGGE sonrasında dizi analizi gerçekleştirilmiş ve BLAST kullanımı ile elde edilen verilerin Gen Bankasındaki karşılıkları bulunarak mikroorganizmalar belirlenmiştir.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan solüsyonlar

2.1.1.1. %25 SW (g/L)

NaBr.....	0.65
HNaCO ₃	0.167
KCl.....	5.0
CaCl ₂	0.723
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	49.492
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	34.567
NaCl.....	195

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7'ye ayarlanarak 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir ve oda sıcaklığında saklanır (Rodríguez-Valera,1985).

2.1.1.2. Vivaflow temizleme solüsyonu

NaOH.....	10 gr
0.5 M NaOCl.....	0.5 ml

Distile su ile 500 ml'ye tamamlanır. 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

2.1.1.3. TAE 50X

Tris base.....	242 g
Asetik asit.....	57.1 ml
EDTA(0.5 M pH 8).....	100 ml

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.1.4. TBE 5X

Tris base.....54 g

Borik asit.....27.5 g

EDTA(0.5 M pH 8).....20 ml

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.1.5. %80'lik DGGE stok solüsyonu

Üre.....13.45 g

Deiyonize formamid.....12.8 ml

Akrilamid/Bisakrilamid.....8 ml

TAE(20X).....2 ml

mQ su ile 30 ml' ye tamamlanır ve 4°C'de saklanır (Muyzer, 1996).

2.1.1.6. %0'lik DGGE stok solüsyonu

Akrilamid/Bisakrilamid.....8 ml

TAE(20X).....2 ml

mQ su ile 30 ml' ye tamamlanır ve 4°C'de saklanır (Muyzer, 1996).

2.1.1.7. %10 Amonyum persülfat solüsyonu

Amonyum Persülfat.....1 g

Distile su.....10 ml

Hazırlandıktan sonra küçük hacimler halinde epandorflara paylaştırılarak -20°C'de saklanır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.1.8. PBS 10X

NaCl.....80 g

Na₂HPO₄.7H₂O.....11.5 g

KCl.....2 g

KH₂PO₄.....2 g

Distile su ile 1 litreye tamamlanır, pH 7.2 ye ayarlanır. 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve oda sıcaklığında saklanır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.1.9. In situ hibridizasyon tamponu

NaCl (5 M).....360 µl

Tris-HCl.....40 µl

Formamid.....700 µl

mQ su.....900 µl

SDS(%10).....2 µl

Hazırlanıp buz üzerinde korunur (Anton 1999).

2.1.1.10. FISH için yıkama tamponu

Tris-HCl(1M pH 8).....1 ml

NaCl(5M).....700 µl

EDTA(0.5M).....500 µl

Hazırlanıp 48°C’de bekletilir (Anton 1999).

2.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri

2.1.2.1. Luria Bertani (LB) besiyeri

NaCl.....10 g

Yeast Extract.....5 g

Trypton.....10 g

Distile su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7.2' ye ayarlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Katı besiyerinin hazırlanması için %2 agar ilave edilmiştir (Dyall-Smith 2004).

2.1.2.2. TB medium

KH₂PO₄.....1.55 g

K₂HPO₄.....6.27 g

Distile su ile 50 ml'ye tamamlanır ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

Trypton.....6 g

Yeast Extract.....12 g

%99 Gliserol.....1.75 ml

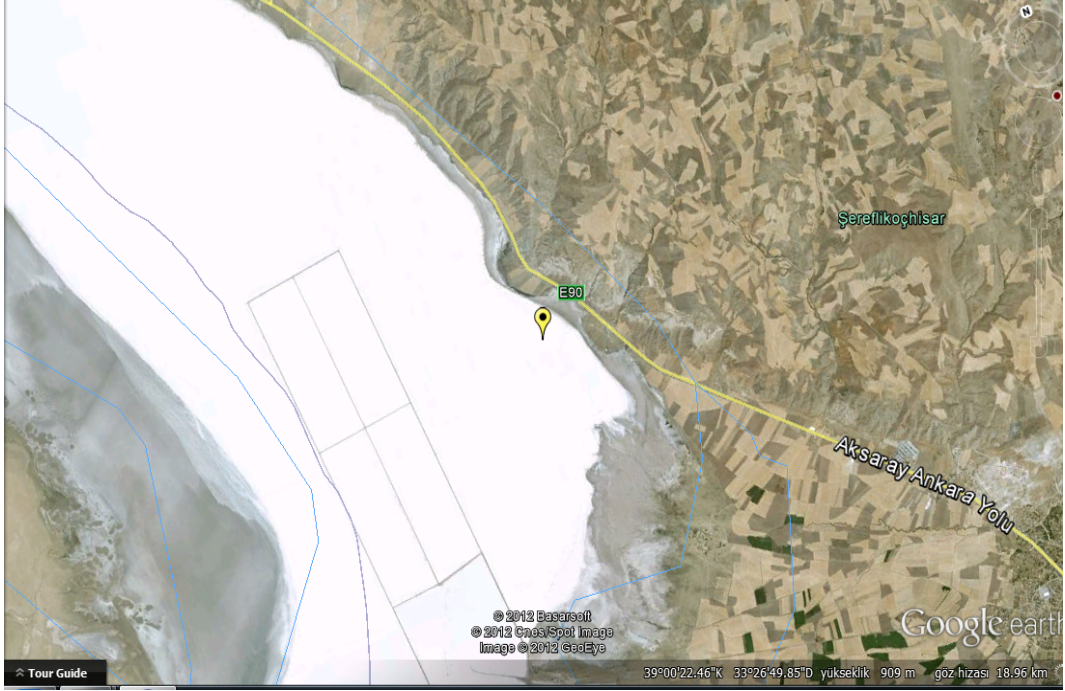
Distile su ile 450 ml'ye tamamlanır ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

Ayrı ayrı sterile edildikten sonra bu iki karışım bir araya getirilir.

2.2. METOD

2.2.1. Çalışma alanı

İç Anadolu Bölgesinde bulunan Tuz Gölü, Şereflikoçhisar kıyısından su örneği 2011 yılı Ağustos ayında alınmıştır



Şekil 2.1. Örnek alınan bölgenin işaretlediği Tuz Gölü uydu görüntüsü [Sarı işaretli bölge yakınlarından su örneği alınmıştır (Google earth)]

2.2.2. Su örneğinin tuzluluk oranının ölçümü

Tuz Gölünden 2011 yılında Ağustos ayında alınan su örneğinin tuzluluk oranı Refraktometre (Eclipse) ile belirlenmiştir.

2.2.3. Viral çeşitliliğin incelenmesi

2.2.3.1 Su örneğinin epifluoresan mikroskopunda incelenmesi ve viral yoğunluğun belirlenmesi

Tuz Gölünde halofilik virüslerin varlığının saptanması ve yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla su örneği SYBR Gold fluorenan boya ile boyanarak epifluoresan mikroskopunda incelenmiştir (Ortmann ve Suttle, 2009; Suttle ve Fuhrman, 2010).

Fiksasyon

Fiksasyon amacıyla 100 µl su örneğine son konsantrasyon % 0.5 olacak şekilde Formaldehit (Sigma) eklenmiş ve +4°C’de yarım saat inkübe edilmiştir

Filtrasyon ve boyama

Fikse edilen örnek (10µl) vakumlu filtrasyon sistemi (Millipore) kullanarak 0,45 µm por çapındaki filtre (Millipore) ile desteklenmiş 0,02 µm por çaplı cam filtreden (Anodisc 25) filtre edilmiştir. Filtre, son konsantrasyonu 25X olacak şekilde SYBR Gold (Invitrogen) fluoresan boyası ile karanlıkta 15 dakika boyanmıştır. Bu süre sonunda havada kurutulan ve fazla fluoresan boyanın alınması için üzerine Citiflor damlatılan cam filtre epifluoresan mikroskobu (Leica, type DM4000B) ile 100X objektifte incelemeye alınmıştır. Rastgele alanlarda sayım yapılarak virüs benzeri partiküllerin yoğunluğu hesaplanmıştır.

2.2.3.2. Su örneğinden kontaminantların uzaklaştırılması

1.2 litre su örneği 30.000 X g, 20°C de 1 saat santrifüj (Beckman, JA-14 rotor) edilmiştir. Elde edilen supernatant vakumlu filtrasyon sistemi kullanımıyla 0,22 µm GV filtreden (Millipore) filtre edilerek ökaryotik ve prokaryotik hücreler uzaklaştırılmış ve sadece virüsleri içeren filtrat elde edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen pelet su örneğinde çözülmüş ve mikrobiyal çeşitlilik analizinde kullanılmak üzere mikroorganizmaların DNA’sını ekstrakte etmek için +4°C’de muhafaza edilmiştir. Elde edilen filtrata SYBR Gold boyama yapılarak virüs benzeri partiküllerin yoğunluğu belirlenmiştir (Diez ve ark., 2000; Santos ve ark., 2010; Garcia-Heredia ve ark., 2012).

2.2.3.3. Filtratın konsantrasyonu

Hücre içermeyen filtrat ultrafiltrasyon yöntemiyle 2 aşamada konsantre edilmiştir. İlk aşamada 30000 MWCO PES membran içeren Vivaflow 200 (Sartorius Stedim Biotech) konsantrasyon sistemi kullanımıyla 1.2 litre su örneği 20 ml’ ye konsantre edilmiştir. Ardından bu 20 ml.’lik filtrat yaklaşık Amicon Ultra-15, Ultracel-100K (Millipore) santrifüj tüpleri kullanımıyla 500 µl’ye kadar konsantre edilmiştir.

İlk aşamada Vivaflow sistemi 40 dakika temizleme solüsyonu (0.5M NaOH, 0.5 mM NaOCl) ile yıkanmıştır. Bu süre sonunda steril mQ su ile temizlenmiştir. Sonrasında, sistem verilecek örnek için uygun bir ortam oluşturması amacıyla %25 SW besiyeri ile yıkanmıştır. Sonrasında sadece virüslerin bulunduğu 1.2 litre filtrat peristaltik pompa (Millipore, Cat No: XX80ELO05) kullanımı ile 20 ml olana kadar konsantre edilmiştir.

Daha sonra elde edilen konsantre örnek, Amicon Ultra-15, Ultracel-100K (Millipore) filtre içeren santrifüj tüpleri ile, 4500 rpm 20 dakika 15°C de son hacim 200-500 µl olana kadar santrifüj edilmiştir. Elde edilen bu son konsantrasyon ürününden SYBR Gold boyama yapılarak virüs benzeri partiküllerin yoğunluğu belirlenmiştir.

2.2.3.4. Geçirimli elektron mikroskopi (TEM) ile virüs morfolojisinin belirlenmesi

Tuz Gölü'nde bulunan halovirüslerin morfolojisinin incelenmesi amacıyla elde edilen son konsantrasyon ürününden alınan 5µl, 1 ml' ye kadar steril mQ su ile tamamlanmış ve 186 000 g X 2 saat, 20°C'de ultrasantrifüj (Beckman Coulter Optima Max-xp Ultracentrifuge, rotor TLA-55) işlemi gerçekleştirilmiştir. Ultrasantrifüj sonrası elde edilen pellet 15 µl steril mQ su ile çözülmüş ve 300 square mesh formvar kaplı bakır grid (Electron Microscopy Sciences) üzerine alınmıştır. Beş dakika kurutulan grid yaklaşık 45 saniye %2 uranil asetat boyası ile boyanmış ve mQ su ile yıkanarak Geçirimli Elektron Mikroskopunda (Jeol, JEM-2010) 100kV altında incelenmiştir (Brum ve Steward, 2010; Ackermann, 2009).

2.2.3.5. Atımlı-alan jel elektroforezi (PFGE) ile viral topluluğun DNA büyüklüğünün belirlenmesi

Viral DNA içeren kalıpların hazırlanması

Elde edilen viral filtrat %1.6 Low Melting Agarose ile birebir hacimde karıştırılarak PFGE için gerekli olan kalıplar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kalıplardan kontamine DNA'nın uzaklaştırılması amacıyla kalıplar Turbo DNase

(Ambion) enzimiyle muamele edilmiş ve daha sonra enzim inaktive edilmiştir. Bu işlemden sonra hazırlanan kalıplar viral kapsidin parçalanması için ESP (0.5 M EDTA pH 9, %1 N-laurilsarcosine, Proteinaz K (0.5 mg/ml)) solüsyonu içerisine alınarak 50°C 'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır (Santos ve ark., 2007).

Elektroforez

İnkübasyon sonrasında viral topluluğun DNA büyüklüğünün belirlenmesi amacıyla yapılan Atımlı-alan Jel Elektroforezinde Biorad-CHEF-DRIII sistemi kullanılmıştır. Elektroforez için 0.5X TBE tamponu içeren %1 lik agaroz jel hazırlanmıştır. Yürütme süresince kullanılan 0.5X TBE tamponunun sıcaklığı soğutucu pompa (Biorad cooling module) kullanımı ile 14°C'de tutulmuştur. Jele incelenecek örneğe uygun marker ve yarım kalıp örnek kuyucuklara yüklenmiştir. Kuyucukların üzeri %1 agaroz jel ile kapatılmıştır. Uygulanan elektroforez koşulları, 120° açı ile 1-25 sn. akım, 6 V/ cm², 14°C'de 24 saat olacak şekilde ayarlanmıştır (Santos ve ark., 2007).

Yürüme işlemi bittikten sonra DNA' nın görülür hale getirilmesi için jel etidyum bromür ile boyanmış ve saf su ile yıkanarak transilluminatörde UV ışığı ile görüntülenmiştir.

Kalıpların yıkanması

Kalıpların yıkanması sırasında ESP kalıntılarını uzaklaştırmak üzere Pefablock maddesi ve TE tamponu kullanılmıştır.

TE Pefablock tamponu (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA) ve 3 mM Pefablock olacak şekilde hazırlanan solüsyon içerisine kalıplar alınarak 4-5 saat 37°C su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu süre sonrasında kalıplar TE tamponuna alınarak 1 gece oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır (Diez ve ark., 2000; Santos ve ark., 2010).

2.2.3.6. Kalıplardan agarozun uzaklaştırılması ve toplam viral DNA ekstraksiyonu

Agarozun uzaklaştırılacağı kalıp sayısına göre belirlenen 10X β -agarase I Reaction Buffer, steril mQ su ile 1X konsantrasyonuna seyreltilmiştir. Bu solüsyon içerisine kalıplar ilave edilerek 70°C de 15 dakika inkübe edilerek agaroz eritilmiştir. Bu süre sonrasında karışım 42°C de 5 dakika bekletilerek enzimin uygun çalışma sıcaklığına getirilmiştir. Sonrasında kalıp sayısına göre belirlenen miktarda β -agarase I enzimi bu solüsyona eklenerek 1 saat 42°C su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır.

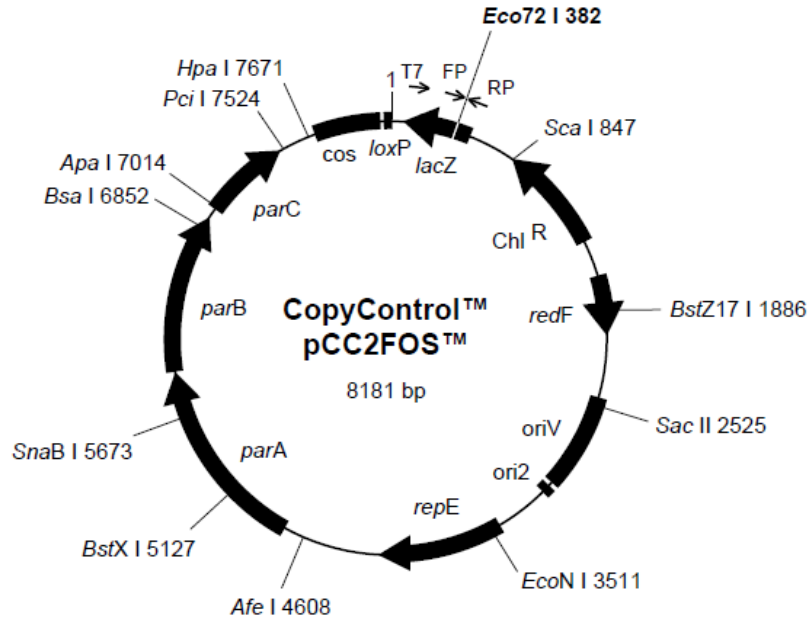
β -agarase I enzimi ile uzaklaştırılan agaroz ve polisakkarit gibi kontaminant kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla elde edilen solüsyon Amicon Ultra, 0.5 ml-100K (Millipore) filtreleri içeren santrifüj tüpleri kullanımı ile sırasıyla 1X TE tamponu, 0.5X TE tamponu ve Steril MQ su ile yıkanarak elde edilen viral DNA kirlilikten arındırılmıştır.

Viral DNA ve uygun büyüklükteki marker %1 agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme sonrası jel etidyum bromür ile boyanmış ve saf su ile yıkanarak transilluminatörde UV ışığı ile görüntülenmiştir. Böylece DNA'nın kırılıp kırılmadığı kontrol edilmiş ve miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen viral DNA metagenomik kütüphane oluşturulana kadar -80°C' de muhafaza edilmiştir (Santos ve ark., 2010).

2.2.3.7. Metagenomik kütüphanenin oluşturulması

Elde edilen viral DNA, bu büyüklükte DNA'yı klonlamak için uygun büyüklükte vektör olan fosmid vektör aracılığıyla klonlanarak kütüphanesi oluşturulmuştur. Fosmid kütüphane oluşturulurken CopyControl HTP Fosmid Library Production Kit (Epicentre) kit prosedürü doğrultusunda kullanılmıştır. Bu kit klonlama vektörü olarak yaklaşık 8.2 kb büyüklüğünde olan küt uçlu pCC2FOS vektörü içermektedir. Lineer pCC2FOS vektörü Kloramfenikol antibiyotikine direnç geni taşımaktadır. Ayrıca bu vektör hem tek kopya orjini hem de çoklu kopya orjini taşımaktadır. Transformasyon işlemi gerçekleştirilirken tek kopya orjini aktif olup, her konak hücre tek kopya rekombinat vektöre

sahipken, kütüphane oluşturulurken çoklu kopya orjini indüklenmekte ve böylece yüksek sayıda rekombinant vektör üretilmektedir. Şekil 2.2' de vektör haritası gösterilmiştir. Klonlanacak DNA, vektörden çıkarılmış *Eco*72 I 382 bölgesinden vektörle birleşmekte ve böylece rekombinant vektör halkasal forma dönüşmektedir. Ligasyon işleminden sonra vektörlerin transforme hücrelere aktarımı için gerekli paketleme işleminde MaxPlax Lambda Packaging Extract kullanılmıştır. Transfeksiyon işleminden sonra faj partikülleri hücre içerisinde plazmid gibi çoğalmaktadır. Transfeksiyon işlemi *Escherichia coli* EPI300-T1^R ırkı kullanımı ile gerçekleştirilmiştir (Park ve ark., 2008).



Şekil 2.2. Kullanılan pCC2FOS vektörünün haritası (Epicentre)

End-Repair reaksiyonu

Bu işlem klonlanacak DNA'nın yapışkan uçlarının kesilerek küt uçlu vektöre uygun hale getirilmesi amacıyla yapılmıştır.

Bu reaksiyon için, 8 µl 2.5 mM dNTP mix, 8 µl 10 mM ATP, 8 µl 10X End-Repair Buffer, insert DNA (0.5 ug/ul konsantrasyonunda) ve 4 µl End-Repair enzim karışımı 80 µl'ye kadar Steril MQ su ile tamamlanmıştır. Karışım 90

dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda enzim karışımı 70°C de 10 dakika bekletilerek inaktive edilmiştir.

Elde edilen küt uçlu DNA, Amicon Ultra, 0.5 ml-100K (Millipore) santrifüj filtreleri kullanımı ile sırasıyla 1X TE tamponu, 0.5X TE tamponu ve Steril MQ su ile yıkanmış ve konsantre edilmiştir.

Ligasyon öncesinde kullanılacak DNA miktarını belirlemek ve DNA'nın kırılmadığını kontrol etmek için konsantre edilen küt uçlu DNA, uygun markerlar ile birlikte %1 agaroz jelde yürütülmüştür. Yürütme sonrası jel ile boyanmış ve saf su ile yıkanarak transilluminatörde UV ışığı ile görüntülenmiştir.

Ligasyon işlemi

Ligasyon işlemi için gerekli DNA miktarı hesaplanmış ve 10 µl olarak belirlenmiştir. Buna göre, 2 µl ATP 10mM(10X), 1 µl pCC2FOS vektörü(500ng/µl), 1 µl Fast link DNA ligase, 2 µl Fast-link ligation buffer(10X), 10 µl DNA toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde Steril MQ su ile tamamlanmıştır. Karışım ligasyon için 16°C de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.

Paketleme işlemi

Paketleme işlemi fosmid vektörlerin EPI300-T1^R *E.coli* hücrelerine transformasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla yapılmıştır.

Ligasyon işlemi bitiminde, Fast-link DNA ligase enzimi 70°C' de 10 dakika bekletilerek inaktive edilmiştir. Sonrasında ligasyon karışımı 25 µl MaxPlax Lambda Packaging Extract ile karıştırılarak 2 saat 30°C de inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra transformasyon aşamasına geçilmiştir.

Transformasyon işlemi

Paketleme ürünü üzerine, 500 µl Phage Dilution Buffer, 20 µl Kloroform (Sigma) eklenmiş ve epandorf tüpü ters düz edilerek karıştırılmıştır. Tüpler 10 saniye kadar santrifüj edilmiştir. 100 µl supernatant ile bir gece öncesinden kültüre edilen ve OD₆₀₀ değeri 0.839 olan EPI300-T1^R *E.coli* kültüründen 1 ml

karıştırılarak transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olmak üzere paketlenme ürünü ile enfekte edilmeyen EPI300-T1^R *E.coli* kültürü kullanılmıştır. Transforme hücreler ve pozitif kontrol 1 saat 37°C de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, 1000g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve 100 ul supernatantta çözülen pelet, Kloramfenikol (12.5 µg/ml) içeren LB besiyerine yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. Petriler 1 gece 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır.

Bu protokole göre, fosmid vektörü içerisine alan *E.coli* hücreleri Kloramfenikol varlığına direnç göstererek gelişecek, pozitif kontrol olarak kullanılan *E.coli* içeren petride üreme olmayacaktır. Gelişen her bir koloni tek DNA kopyalarını taşıyan fosmid vektöre sahip olacaktır.

Kolonilerden metagenomik kütüphane oluşturulması

Fosmid kütüphane oluşturmak için elde edilen her bir koloni, %0.2 Maltoz, 10mM MgSO₄, Kloramfenikol (12.5 µg/ml) ve %9 gliserol içeren sıvı LB besiyeri içerisine transfer edilerek 1 gece 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kolonilere sahip 96 kuyucuklu mikrotiter plate -80°C'de dizi analizi yapılana kadar muhafaza edilmiştir (Park ve ark., 2008).

2.2.3.8. Metagenomik kütüphaneden rekombinant fosmid vektörlerin saflaştırılması ve analizi

Oluşturulan metavirom kütüphanede elde edilen klonların rekombinant fosmid vektörleri taşıyıp taşımadığı kontrol edilmiş ve vektörler uygun restriksiyon enzimi ile kesilerek insert DNA'nın büyüklüğü belirlenmiştir (Garcia-Heredia ve ark., 2012).

Fosmid vektörlerin kontrolü

Oluşturulan metagenomik kütüphanenin dizi analizinden önce, klonların rekombinant fosmid vektörleri taşıyıp taşımadığı kontrol edilmiştir.

Rastgele seçilen 15 klon, Kloramfenikol (12.5 µg/ml) ,%0.2 Maltoz ve İndüktör içeren TB besiyerinde 1 gece 37°C çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak klon içermeyen besiyeri kullanılmıştır.

Gelişen klonları saflaştırmak için QIAPrep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) kullanılmıştır. Kit içerisindeki protokole göre saflaştırılan klonlar, uygun markerlar ile birlikte %1 agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir (Garcia-Heredia ve ark., 2012). Yürütme sonrası jel etidyum bromür ile boyanmış ve saf su ile yıkanarak transilluminatörde UV ışığı ile görüntülenmiştir.

Insert büyüklüğünün belirlenmesi

Enzim ile kesim

Vektör taşıdığı belirlenen klonlar seçilerek içerdiği DNA'nın büyüklüğünün belirlenmesi için restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve PFGE gerçekleştirilmiştir. Kullanılan BamHI enzimi, vektörü insert bölgeye yakın olan bölgeler (353-407) olmak üzere iki bölgeden kesmektedir.

Bu amaçla saflaştırılan her bir vektörden 15 µl, 2 µl 10X NE3 buffer (NEB), 1 µl BamHI enzimi (NEB), 0.2 µl BSA, 1.8 µl steril MQ su karışımı içerisine alınarak ayrı ayrı kesim reaksiyonları oluşturulmuş ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

Elektroforez

Kesim sonrasında vektörlerin taşıdığı DNA büyüklüğünün belirlenmesi amacıyla yapılan Atımlı-alan Jel Elektroforezinde Biorad-CHEF-DRIII sistemi kullanılmıştır. Elektroforez için 0.5X TBE tamponu içeren %1 lik agaroz jel hazırlanmıştır. Yürütme süresince kullanılan 0.5X TBE tamponunun sıcaklığı soğutucu pompa (Biorad Cooling Module) ile 14°C'de tutulmuştur. Her bir kesim reaksiyonundan 2 µl, Steril mQ ile 10 µl ye tamamlanmış ve loading buffer ile karıştırılarak uygun markerlar ile birlikte jele yüklenmiştir. Uygulanan elektroforez koşulları; 120° açıda 2.0-2.0 sn de akım., 6V/cm², 14°C'de 20 saat şeklindedir.

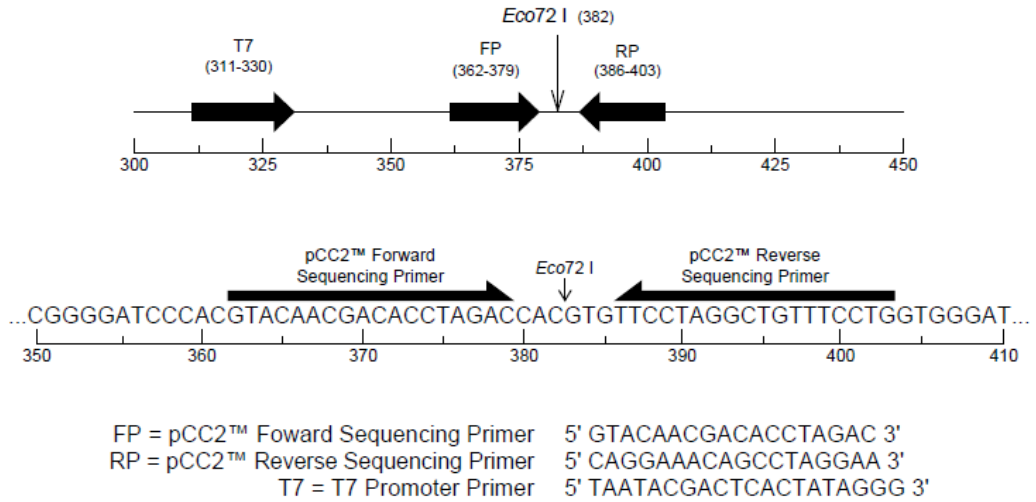
Yürüme işlemi bittikten sonra DNA' nın görülür hale getirilmesi için jel etidyum bromür ile boyanmış ve saf su ile yıkanarak transilluminatörde UV ışığı ile görüntülenmiştir Daha sonra vektörlerin taşıdığı DNA büyüklüğü hesaplanmıştır.

2.2.3.9. Dizi analizi

Oluşturulan fosmid kütüphane dizi analizi için GATC Biotech (Almanya) firmasına gönderilmiştir.

Rastgele seçilen bazı klonlardan DNA büyüklüğü hesaplandıktan sonra, stok kütüphaneden paralel olacak şekilde klon örnekler, %0.2 Maltoz, 10 mM MgSO₄ ve Kloramfenikol (12.5 µg/ml) içeren katı LB besiyeri içeren mikrotitre plate çekilmiş ve 24 saat 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin geliştiği gözlenen plate dizi analizi amacıyla GATC Biotech' e gönderilmiştir.

Fosmid ekstraksiyonu yapıldıktan sonra, fosmid uç kısımlarından insert DNA'ya doğru dizilenmeyi sağlayan spesifik primerler olan pCC2TM Forward Sequencing Primer ve pCC2TM Reverse Sequencing Primerler kullanılmıştır.



Şekil 2.3. pCC2FOS vektörü üzerinde spesifik vektör primerlerinin oturduğu bölge bilgisi ve primer dizisi (Epicentre)

2.2.4. Örneğin mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi

2.2.4.1. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve hücresel yoğunluğun belirlenmesi

Tuz Gölü örneğinden Archaea, Bacteria spesifik problarla FISH gerçekleştirilmiştir. Böylece total hücresel yoğunluk ve spesifik domain yoğunluğu belirlenerek aktif grup saptanmıştır (Amann ve ark., 1995; Anton ve ark., 1999). Kullanılan problar ile ilgili bilgi Çizelge 2.1' de verilmiştir.

Fiksasyon

1 ml su örneği 220 µl Formaldehit (Sigma) eklenerek bir gece +4°C de fikse edilmiştir. Ertesi gün, fiksasyonu durdurmak için karışıma 10 ml ye tamamlanacak miktarda 1X PBS solüsyonu eklenmiştir. Karışım vakumlu filtrasyon sistemi kullanımı ile 0,2 µm por çaplı GTTP (Millipore) filtreden geçirilmiş ve ardından filtre 1X PBS geçirilerek yıkanmıştır. Filtreler hibridizasyon işlemine kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Hibridizasyon

Hibridizasyon işlemi için parçalara ayrılan filtreler *Archaea* ve *Bacteria* domainlerine spesifik problarla muamele edilmiştir, Archaea için Arc 915 (10 µg), Bacteria için Eub 338 (10 µg) probu kullanılmıştır. 18 µl hibridizasyon tamponu ve 2 µl spesifik prob ile karıştırılmış ve filtre üzerine pipetlenmiştir. Prob ile muamele edilen her bir filtre parçası yatay olacak şekilde 46°C hibridizasyon fırınında 2 saat inkübe edilmiştir. Bu sıra sonrasında, filtreler yıkama tamponuna alınarak 48°C de 15 dakika bekletilmiş ve havada kurumaya bırakılmıştır.

Çizelge 2.1. FISH yönteminde kullanılan probların özellikleri ve dizi bilgileri (Anton ve ark., 1999)

Prob Adı	Spesifik Olduğu Grup	Prob Dizisi(5'/Cy3/3')
Arc915	<i>Archaea</i>	TGCTCCCCCGCCAATTCCT
Eub 338	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT

DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur) ile boyama

Kurutulan filtrelere toplam hücre sayısını belirlemek için DAPI boyaması yapılmıştır. DAPI (1 µg/ml) ile boyanan filtreler daha sonra sırasıyla etanol ve steril MQ sudan geçirilmiştir. Havada kurutulan filtrelerin preparasyonu hazırlanarak floresan mikroskopta (Leica, type DM4000B), 100X lik objektifte incelenmiş ve rastgele alanlardan sayım yapılarak toplam hücresel yoğunluk ve domain spesifik yoğunluk hesaplanmıştır.

2.2.4.2. Su örneğinden total DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için 50 ml su örneği 0.2 µm por çaplı membran filtreden (Milipore) vakumlu filtrasyon sistemi kullanılarak filtre edilmiş ve ekstraksiyon işlemine kadar -80°C de muhafaza edilmiştir.

DNA ekstraksiyonunda filtrelerin yanı sıra, su örneğinin santrifüjü sırasında elde edilen ve su örneğinde tekrardan çözülen 5 ml pelet, 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet üzerine 600 µl ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve devamında filtre ile aynı protokol uygulanmıştır.

Filtre makasla küçük parçalar halinde kesilerek RNase içermeyen özel ependorf tüplere konduktan sonra bunların üzerine 600 µl ekstraksiyon tamponu eklenmiştir. Kısa bir santrifüjle parçaların dibe toplanmaları sağlanıp, 6 µl (3mg/ml) lizozim eklendikten sonra 15 dakika 37° C'de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Üzerine 9 µl proteinaz K (150 µg/ml) ve 60 µl %10 Sodyum dodesilsülfat (SDS) eklenip, 37° C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.. 120 µl 5 M NaCl eklenerek tüp ters düz edilerek karıştırılmış ve 90 µl CTAB (%10 CTAB (Cetil Trimetil Ammonyum Bromid), 0.7 M NaCl) eklenip tekrar karıştırılmıştır. 10 dakika 65° C su banyosunda inkübe edilmiş, inkübasyon sonrası sıvı azot içinde 1-2 dakika bekletilerek dondurulmuş ve tekrar 65° C'ye konulmuştur. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra, 900 µl Fenol:Kloroform:İsoamilalkol (25:24:1) eklenip karıştırılmış ve 5 dakika 4° C'de 13.000 rpm de santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı faz alındıktan sonra üzerine 1 hacim Fenol:Kloroform:İsoamilalkol eklenmiştir. Bu işleme protein ara fazı indirgeninceye kadar devam edilmiştir. 80 µl sodyum asetat (3M, pH 4.8) ve 480 µl isopropanol, 8 µl MgCl₂ (1M)

eklendikten sonra, 30 dakika 13.000 rpm' de 4° C'de santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine %70'lik alkol konmuş ve tekrar 15 dakika 13.000 rpm'de 4° C'de santrifüj edilmiştir. Alkol pipetle uzaklaştırıldıktan sonra, pelet oda sıcaklığında kurutulmuş ve 50 µl dietilpirokarbonat (DEPC)'li su ile resüspanse edilmiştir. İzole edilen DNA, uygun markerlar ile birlikte %0.8' lik agaroz jele 2 µl yüklenerek kontrol edilmiştir. DNA ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20° C'de muhafaza edilmiştir (Nogales ve ark.,1999; Cifuentes ve ark., 2000).

2.2.4.3. Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE)

16S rRNA geninin DGGE analizi için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonu

DGGE analizi için 16S rRNA geninin amplifikasyonu için 5' uçlarında "GC tokası" olarak adlandırılan yaklaşık 40 nükleotidlik bir dizi içeren özel primerler kullanılmıştır. *Archaea* domainine ait 16S rRNA genine ait bölgeden amplifikasyonu için kurulan reaksiyonlarda 344F-GC ve 907R primerleri kullanılırken, *Bacteria* domaini için 341F-GC ve 907R primerleri kullanılmıştır (Muyzer ve ark., 1993). Primerler ile ilgili ayrıntılı bilgi Çizelge 2.2' de verilmiştir. Her bir reaksiyonda kalıp DNA olarak pelet ve filtreden izole edilen DNA kullanılmıştır.

Çizelge 2.2. DGGE-PCR işleminde kullanılan primerler ve dizi bilgileri (Muyzer ve ark., 1993)

Primerler	Baz Dizilimi (5'-3')	Spesifitesi
341F-GC	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGC CCCCGCCCGCCTACGGGAGGCAGCAG	<i>Bacteria</i>
344F-GC	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGC CCCCGCCCGACGGGGCGCAGCAGGCGCGA	<i>Archaea</i>
907R	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Universal

Tüm reaksiyonlar 50 µl hacimde son konsantrasyonları 1X PCR buffer, 200 µM deoksinükleotidtrifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 uM primerler, 2 ünite Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde Steril MQ su ile tamamlanarak kurulmuştur. Kalıp DNA her bir reaksiyona 50 ng olacak miktarda ilave edilmiştir. Her reaksiyon seti ile birlikte hem pozitif hem de negatif kontrol reaksiyonları kullanılmıştır. *Bacteria* domaini için kurulan PCR reaksiyonlarında *Salinibacter* pozitif kontrol olarak kullanılırken, *Archaea* domaini için *Haloarcula hispanica* kullanılmıştır. Negatif kontrol reaksiyonları ise DNA içermeyen reaksiyon bileşimlerinden kurulmuştur. Reaksiyonlar için PTC-100 Programable Thermal Controller (Peltier-Effect Cycling) kullanılmıştır.

PCR reaksiyonlarında *Archaea* 16S rRNA'sı için aşağıdaki şartlar uygulanmıştır (Mutlu, 2006).

Döngü(X kez)	Sıcaklık	Süre
İlk Döngü(X1)	94°C	5 dakika
İkinci Döngü(X30)	94°C	30 saniye
	56°C	45 saniye
	72°C	2 dakika
Üçüncü Döngü(X1)	72°C	7 dakika
	4°C	Süresiz

PCR reaksiyonlarında *Bacteria* 16S rRNA'sı için aşağıdaki şartlar uygulanmıştır (Mutlu, 2006).

Döngü(X kez)	Sıcaklık	Süre
İlk Döngü(X1)	94°C	5 dakika
	65°C	1 dakika
	72°C	3 dakika
İkinci Döngü(X9) (Her döngüde primer bağlanma sıcaklığı 1°C azaltılacak)	94°C	1 dakika
	64°C(63,62,61,.....55°C'ye kadar)	1 dakika
	72°C	3 dakika
Üçüncü Döngü(X20)	94°C	1 dakika
	55°C	1 dakika
	72°C	3 dakika
Dördüncü Döngü(X1)	94°C	1 dakika
	55°C	10 dakika
	72°C	10 dakika
	4°C	Süresiz

Elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jellerde uygun markerler varlığında yürütüldükten sonra etidyum bromür ile boyanmış ve transilluminatörde UV ışığı ile gözlenmiştir. Pozitif sonuç veren PCR ürünleri, GeneJET PCR Purification Kit (Fermantas) kullanımı ile saflaştırılmış ve DGGE jeline yüklenmesi gereken miktarın belirlenmesi amacıyla uygun markerlar ile birlikte %1' lik agaroz jelle

yüklenmiştir. Yürütme sonrası jel etidyum bromür ile boyanmış ve saf su ile yıkanarak transilluminatörde UV ışığı ile görüntülenmiştir.

Amplifiye edilmiş *Archaea* ve *Bacteria* 16S rRNA ürünleri için DGGE

Su örneğinden ekstrakte edilen total çevresel DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı birbirinden bağımsız olarak spesifik primerler ile gerçekleştirilen amplifikasyon reaksiyonlarıyla elde edilen ürünlerin analizi için denatüre edici gradient jel elektroforezi uygulanmıştır. Denatüre edici gradient jel elektroforezi için D-Code Universal Mutation Detection System (Biorad) kullanılmıştır.

Elektroforez sistemi 1 mm poliakrilamid jel oluşumuna uygun bir şekilde hazırlanmıştır. Sonrasında %0'lık ve %80'lik DGGE stok solüsyonları hazırlanmıştır. *Archaea* ve *Bacteria* grubu örneklerinin denatüre edici gradient jellerinde denatürant konsantrasyonu %40 tan %70'e artacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca jelin artan konsantrasyonda üre ve formamid konsantrasyonuna sahip olması sağlanmıştır. Uygun miktarlarda polimerize edici ajanlar (%10 APS, TEMED) eklendikten sonra Gradient oluşturucu düzenek (Gradient Former 485, Biorad) kullanımı ile solüsyonların gradient jeli oluşturacak şekilde karıştırarak sisteme yüklenmesi sağlanmıştır. Bu jel üzerine denatürant içermeyen yükleme jeli dökülmüş ve çukur oluşumunu sağlayan tarak bu jel içerisine yerleştirilerek polimerizasyon için 2 saat bekletilmiştir.

Polimerizasyon sonrasında elektroforez tankı 1X TAE ile doldurulmuş ve sıcaklığı 60°C'ye ayarlanmıştır. Jel donduktan sonra sistem tank içerisine alınmıştır. Her bir örnek 300 ng miktarda olacak şekilde 5 µl yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Sisteme 60V akım 24 saat boyunca uygulanmıştır. Elektroforez bittikten sonra jeller SYBR Gold (1X) ile yarım saat boyandıktan sonra 30 dakika distile su içerisinde yıkanmış ve Typhoon 9410 (Amersham Biosciences) jel analiz ve görüntüleme sistemi ile kaydedilmiştir.

Jellerde farklı konumlardaki bantlar UV ışığı altında steril bisturi yardımıyla jelden kesilerek steril ependorf tüpleri içine alınmışlardır. Bunların üzerine 20 µl mQ su eklenerek 1 gece 4°C'de inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrası elüt edilmiş olan DNA, DGGE primerleri ile tekrar amplifiye edilmesi için kalıp

olarak kullanılmıştır. Buradan elde edilen ürünler de tekrar aynı özelliklerdeki DGGE jeline yüklenerek doğru bölgenin çoğaldığı kontrol edilmiş ve sonrasında ürünler saflaştırılarak dizi analizleri yapılmıştır (Muyzer ve ark., 1996).

2.2.4.4. Dizi analizi

Doğru bölgenin çoğaldığı saptanan örneklerin amplifikasyon ürünleri GeneJET PCR Purification Kit (Fermantas) kullanımı ile kit protokolüne göre saflaştırılmıştır. Saflaştırılan DNA miktarı nanodropta ölçülerek ve %1 agaroz jelde uygun markerlar ile birlikte yürütülerek belirlenmiştir. 50 ng/µl olacak şekilde dizi analizine alınmıştır. Dizi analizi için 907R primeri kullanılmıştır.

Dizi analizi sonrası elde edilen verilerin gen analizleri için NCBI ‘ National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)’ veritabanında bulunan BLAST arayüzü kullanılmıştır. Böylece dizi analizi ile elde edilen dizilerin filogenetik benzerlikleri ortaya koyulmuş ve mikrobiyal çeşitlilik hakkında bilgi edinilmiştir.

3. BULGULAR

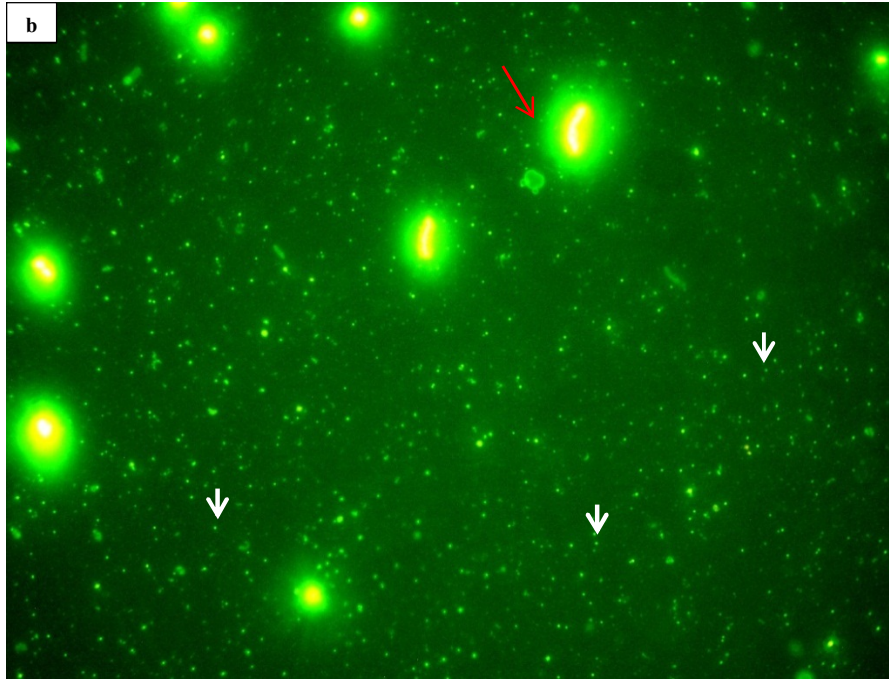
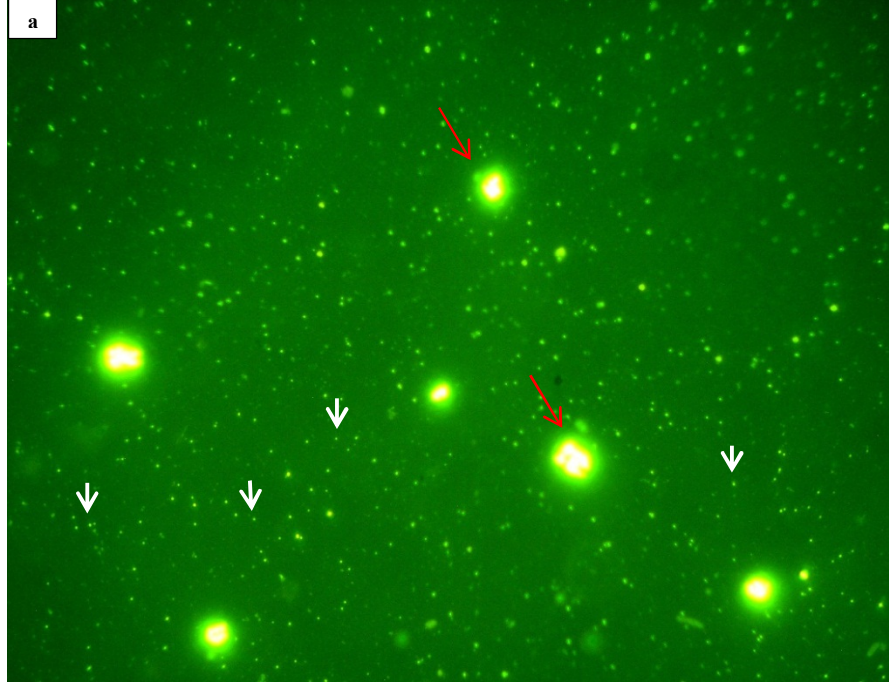
3.1. Su Örneğinin Tuzluluk Değerinin Belirlenmesi

Su örneğinin tuzluluk oranı Refraktometre (Eclipse) ile %31.6 olarak ölçülmüştür.

3.2. Viral Çeşitlilik ile İlgili Bulgular

3.2.1. Su örneğinin viral yoğunluğunun belirlenmesi

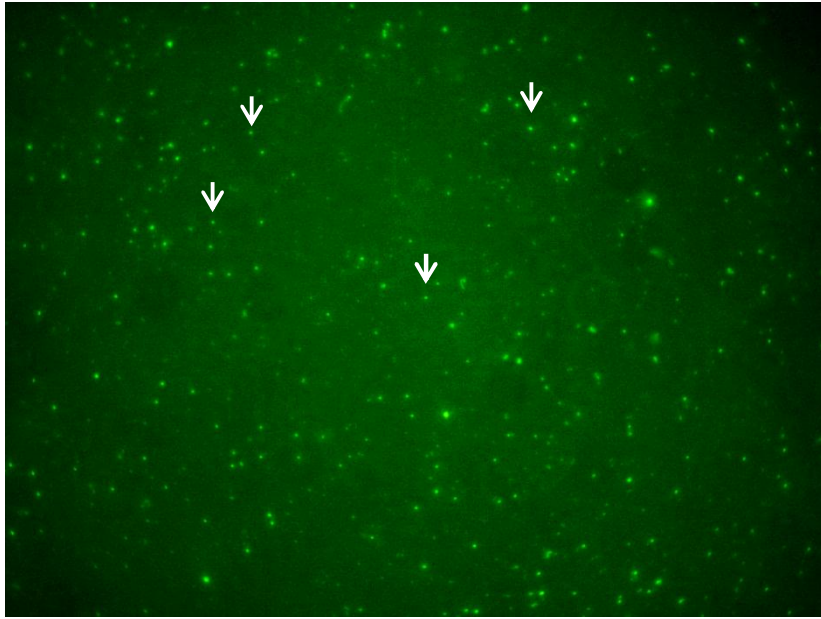
SYBR Gold floresan boyası ile yapılan inceleme sonucu su örneğinde virüs benzeri partiküller saptanmış, rastgele alanlarda çoklu sayımlar yapılmış ve kullanılan filtre yüzeyi ve filtre edilen hacim göz önüne alınarak su örneğinin viral yoğunluğu hesaplanarak $(1.04 \pm 0.106) \times 10^9$ VLP/ml olarak belirlenmiştir. 10 µl fikse edilmiş su örneğine ait görüntüleme alanları Şekil 3.1 (a ve b)'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Tuz Gölü doğal su örneğinin SYBR Gold boyaması sonucu görüntü alanları (Virüs benzeri partiküllerin bazıları beyaz ok ile, mikrobiyal hücreler kırmızı ok ile gösterilmiştir)

3.2.2. Su örneğinden kontaminantların uzaklaştırılmasının ardından viral yoğunluğun belirlenmesi

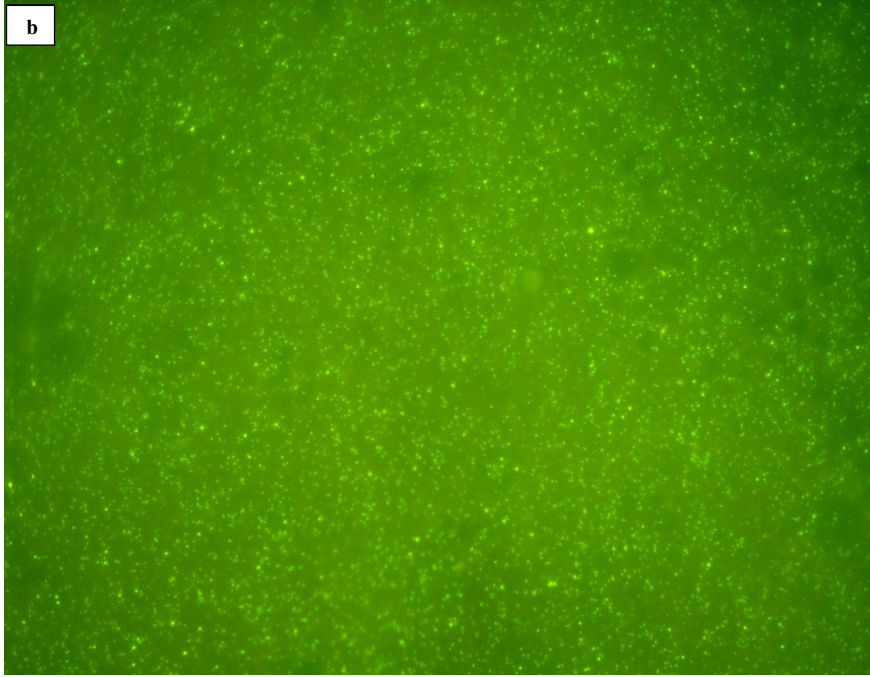
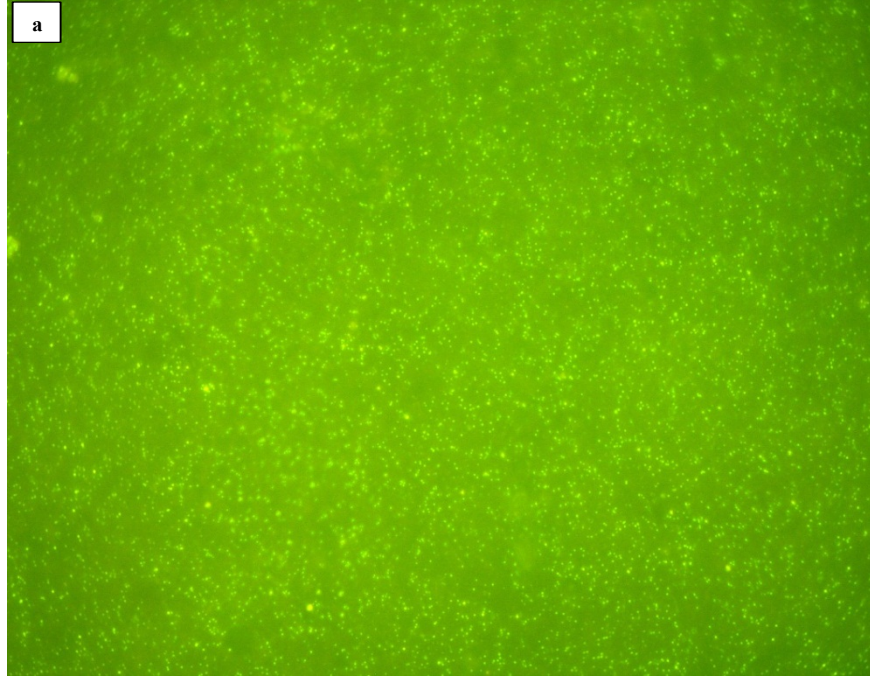
1.2 litre su örneğinin santrifüj ve 0.2 µm por çaplı filtreden filtrasyonunun ardından elde edilen filtratın SYBR Gold boyaması sonucu gözlenen virüs benzeri partiküller rastgele alanlarda sayılmış ve kullanılan filtre yüzeyi ile filtre edilen hacim göz önüne alınarak elde viral yoğunluk $(4.05 \pm 0.2) \times 10^8$ VLP/ml olarak hesaplanmıştır. Şekil 3. 2' de 10 µl su örneğinde belirlenen görüntü alanlarından biri verilmiştir.



Şekil 3.2. Filtrasyon ardından su örneğinin SYBR Gold boyaması sonucu görüntü alanı (Virüs benzeri partiküllerin bazıları ok ile gösterilmiştir)

3.2.3. Konsantre edilen filtratın viral yoğunluğunun belirlenmesi

1.2 litre filtratın Vivaflow 200 ve ardından Amicon Ultra 100000 MWCO santrifüj filtreleri ile 500 µl hacmine kadar konsantre edilmesinden sonra SYBR Gold boyaması sonucu virüs benzeri partiküller, kullanılan filtre yüzeyi ve filtre edilen hacim göz önüne alınarak rastgele alanlarda sayılmış ve viral yoğunluğu hesaplanarak $(5.98 \pm 0.19) \times 10^{10}$ VLP/ml olarak belirlenmiştir. Elde edilen mikroskop görüntülerine örnek olarak verilen Şekil 3.3 (a ve b)' te virüs benzeri partiküller görülmektedir.



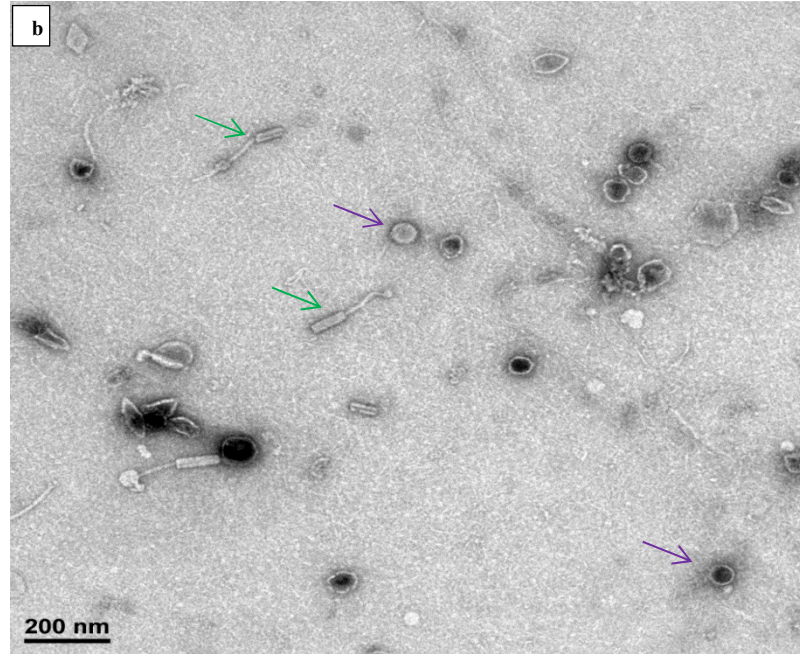
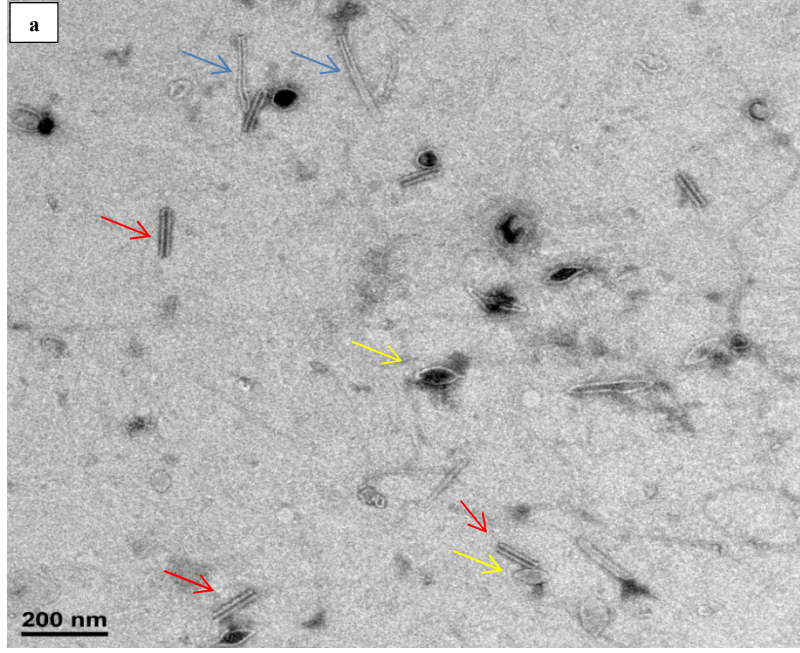
Şekil 3.3. Konsantrasyon sonrası 1 µl filtrat örneğinin SYBR Gold boyaması sonucu görüntü alanı

3.2.4. Geçirimli elektron mikroskopi (TEM) ile viral morfolojinin belirlenmesi

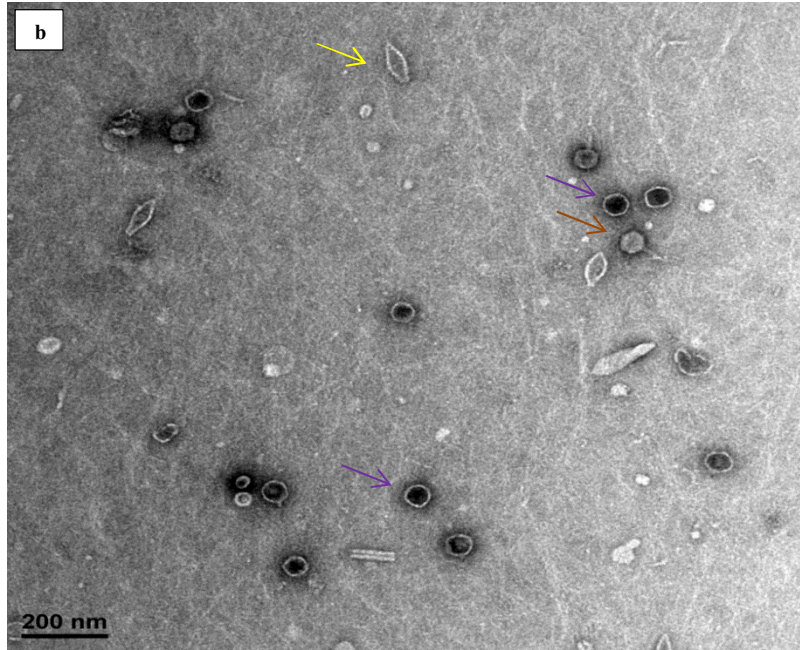
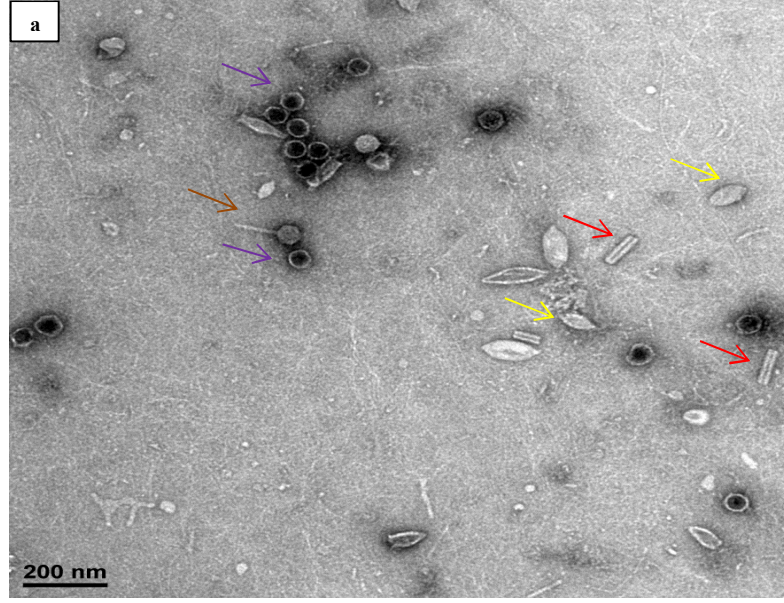
Konsantre edilen viral filtratın bakır grid üzerine alınıp % 1 uranil asetat ile boyanarak TEM ile incelenmesinde değişik morfolojilerde virüsler saptanmıştır. Elde edilen yaklaşık 60 farklı görüntüleme alanından sayımlar yapılarak bu morfolojilerin örnekteki yaklaşık yoğunlukları hesaplanmıştır. Kullanılan 5 µl örnekte toplam 1048 virüs sayılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1’ de verilmiştir. Şekil 3.4 ve 3.9 arasında verilen görüntülerde TEM sonucu belirlenen morfolojiler gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. TEM sonucunda belirlenen virüs morfolojilerinin sayısı ve örnekteki yüzdesi

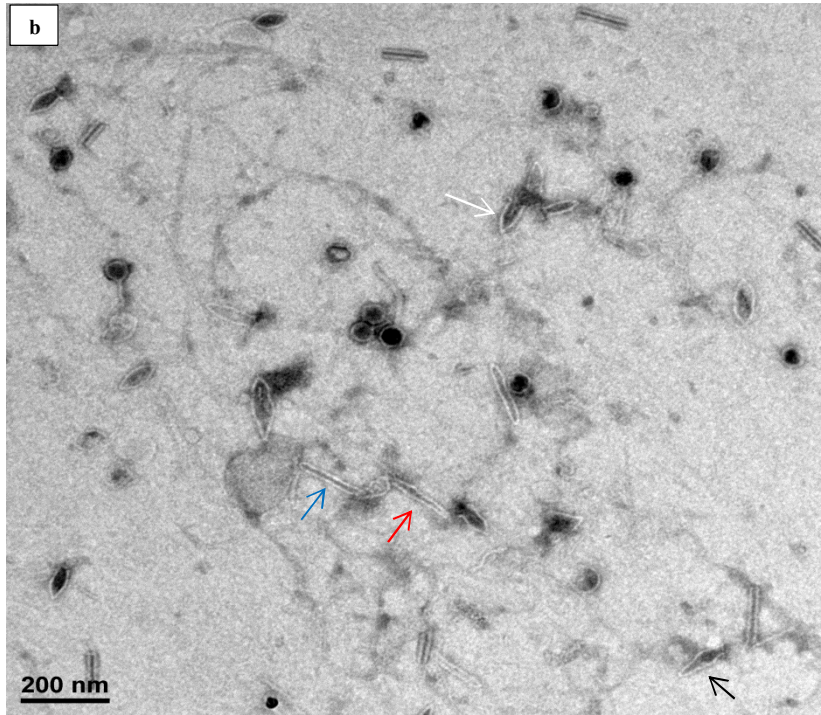
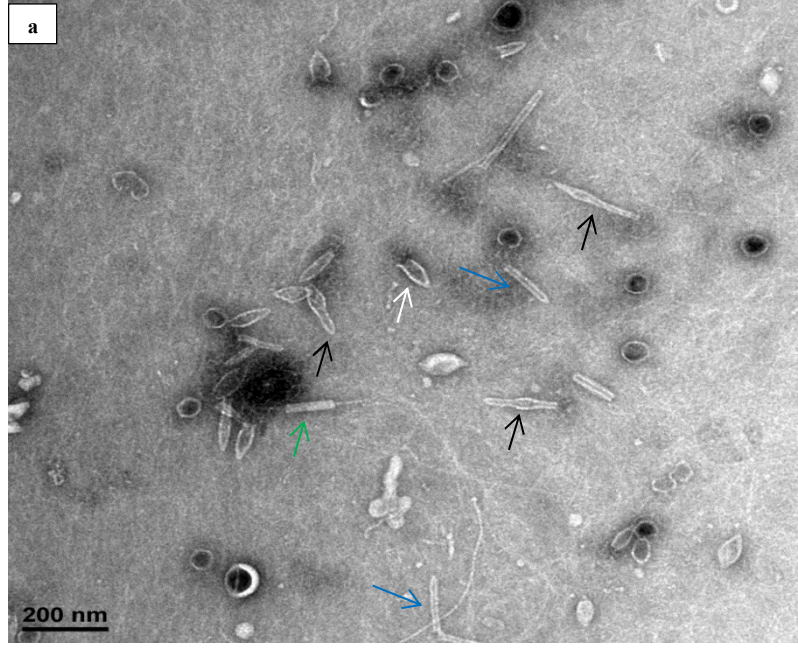
Morfoloji	Sayılan	% Değeri
Küresel	448	43
Baş- uzun kuyruklu	24	2
Baş- kısa kuyruklu	19	2
Limon şekilli	201	19
Filamentli	119	11
Filament- kuyruklu	16	2
Çubuk benzeri	16	2
İğ şekilli- kuyruklu	26	2
Kurşun-benzeri	128	12
Kın şekilli	51	5



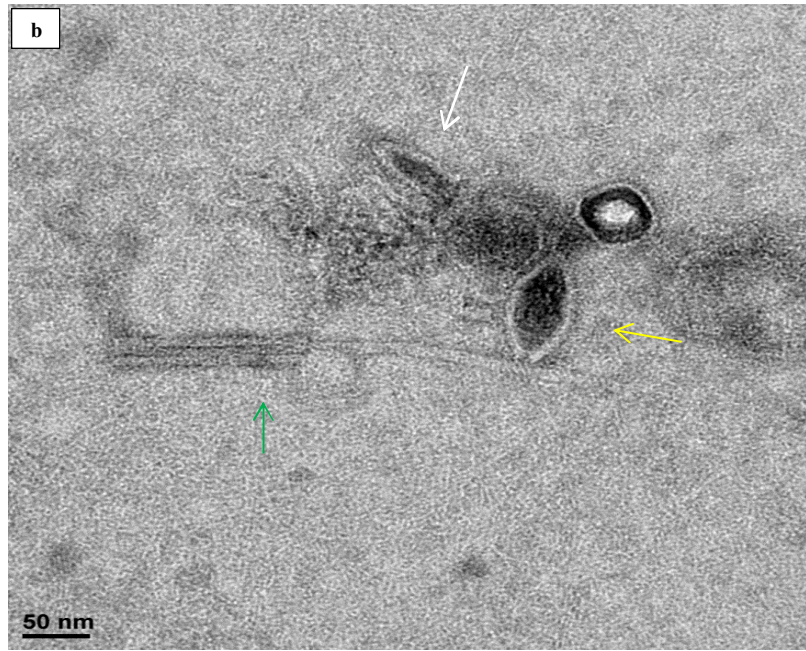
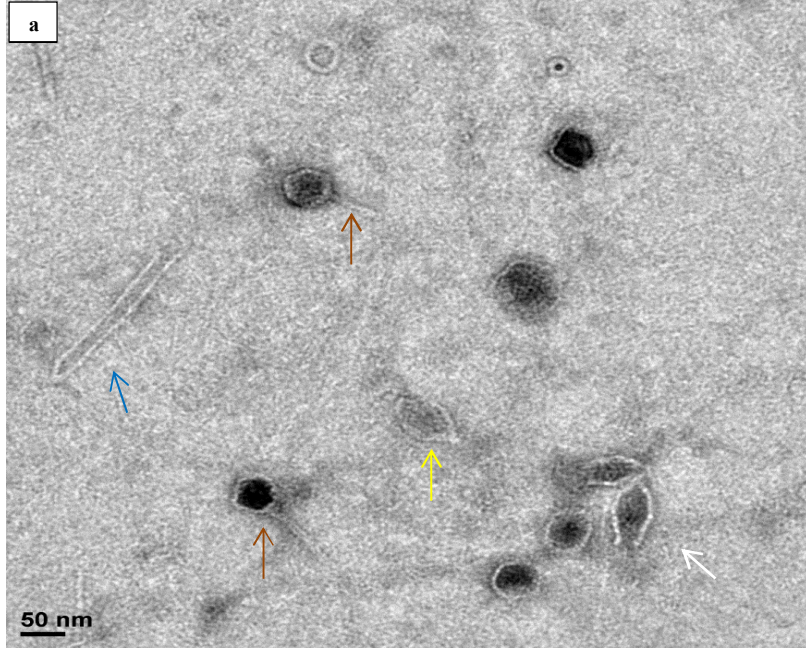
Şekil 3.4. TEM görüntüsü [(a) kırmızı oklar filament şekilli, mavi oklar kın şekilli, sarı oklar limon şekilli virüsler (b) mor oklar küresel şekilli, yeşil oklar filament-kuyruk morfolojideki virüsleri göstermektedir]



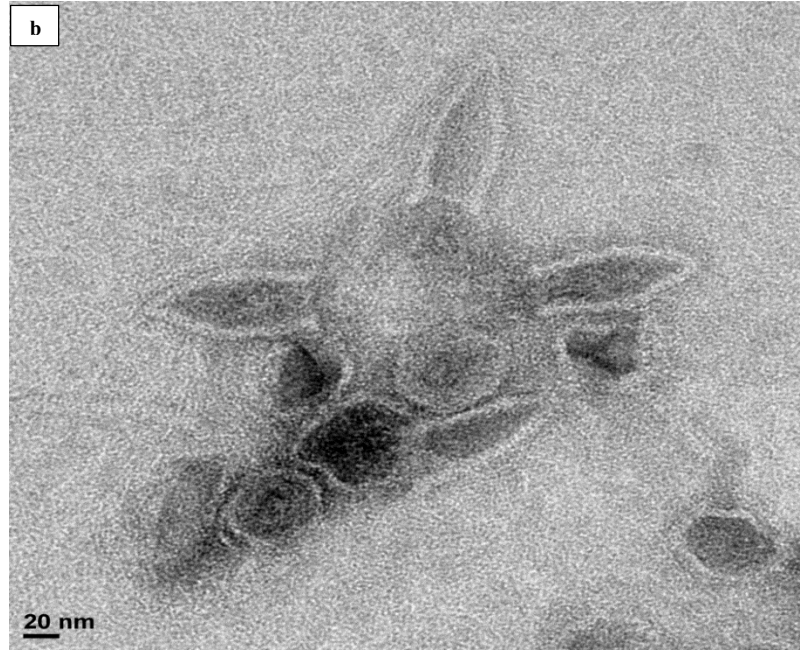
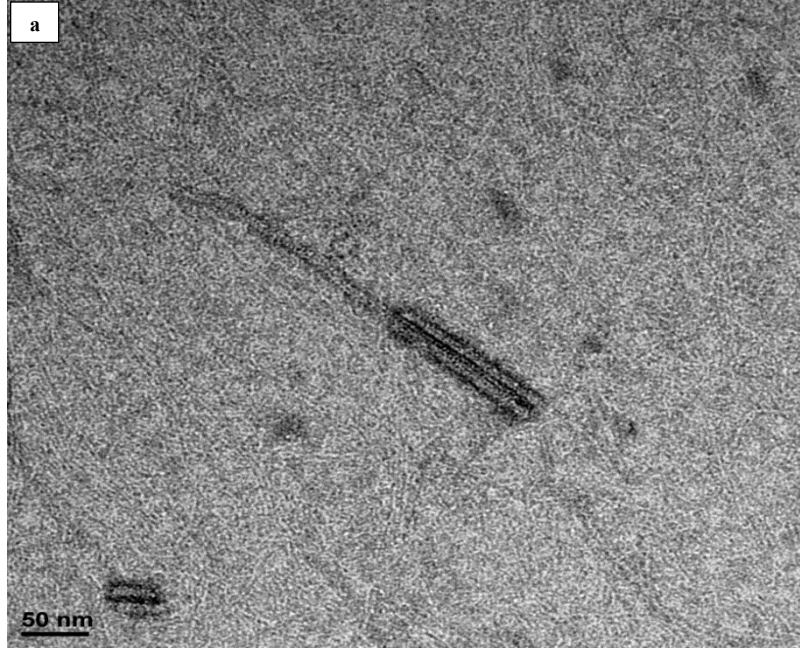
Şekil 3.5. TEM görüntüsü [(a) mor oklar küresel şekilli, turuncu ok baş ve kuyruklu, sarı oklar limon şekilli, kırmızı oklar filament şeklindeki virüsleri; (b) sarı ok limon şekilli, turuncu ok baş-kuyruk şeklindeki, mor ok küresel virüsleri göstermektedir]



Şekil 3.6. TEM görüntüsü. [(a) mavi ok kın şekilli virüsleri, yeşil ok filament-kuyruk şekilli, siyah ok iğ-kuyruk şekilli, beyaz ok kurşun- benzeri virüsleri; (b) mavi ok kın şekilli virüsleri, kırmızı ok çubuk şekilli, siyah ok iğ-kuyruk şekilli, beyaz ok kurşun- benzeri virüsleri göstermektedir]



Şekil 3.7. TEM görüntüsü [(a) Mavi ok kım şekilli virüsleri, turuncu ok baş-kuyruk şekilli, sarı ok limon şekilli, beyaz ok kurşun-benzeri virüsleri; (b) yeşil ok filament-kuyruklu virüsleri, sarı ok limon şekilli, beyaz ok kurşun- benzeri virüsleri göstermektedir]



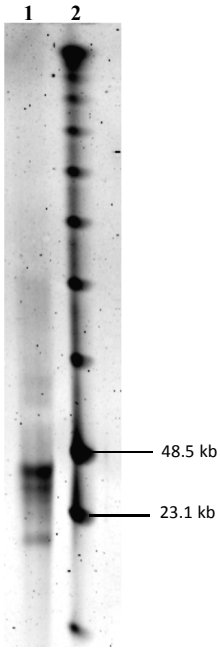
Şekil 3.8. TEM görüntüsü [(a) filament ve kuyruklu morfolojiye sahip virüs partikülü (b) kurşunbenzeri morfolojiye sahip virüsler görülmektedir]



Şekil 3.9. TEM görüntüsü [(a) kurşun- benzeri morfolojide ve kın şeklindeki morfolojiye sahip virüsler; (b) çubuk benzeri morfolojiye sahip virüs partikülü görülmektedir]

3.2.5. Atımlı-alan jel elektroforezi (PFGE) ile viral topluluğun DNA büyüklüğünün belirlenmesi

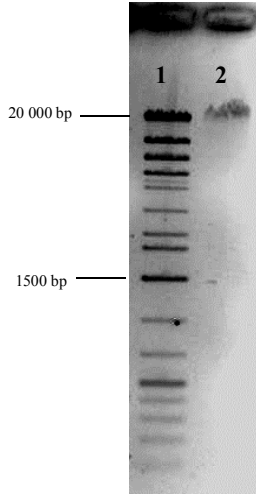
Konsantre edilen örneği içeren agaroz kalıplarının 1-25 saniyelerde 120° açılarda uygulanan 6 V akım altında 24 saat yürütülmesiyle gerçekleştirilen PFGE sonucu viral topluluğun değişik büyüklüklerde DNA içerdiği saptanmıştır. Halovirüslerin genomik DNA'sının görüntülediği jel Şekil 3.10' da gösterilmiştir. Elektroforezde kullanılan PFG Low Range Marker (Invitrogen) göre dominant bantlar 30 ve 40 kb arasında belirlenmiştir.



Şekil 3.10. PFGE jel görüntüsü (1 numaralı kuyucuk total viral DNA, 2 numaralı kuyucuk PFG Low Range Marker)

3.2.6. Viral DNA ekstraksiyonu

Total DNA' yı içeren agaroz kalıplarındaki agaroz, β -agarase I enzimi ile uzaklaştırılmış ve Amicon Ultra 0.5 ml-100K (Millipore) santrifüj filtreleri kullanımı ile viral DNA elde edilmiştir. %1' lik agaroz jele 2 μ l DNA yüklenerek DNA'nın kırılmadığı kontrol edilmiştir. Şekil 3.11' de jel görüntüsü verilmiştir. Ayrıca nanodrop ile DNA miktarı ölçülmüş ve viral topluluğun ekstrakte edilen DNA yoğunluğu 34 ng/ μ l olarak belirlenmiştir.

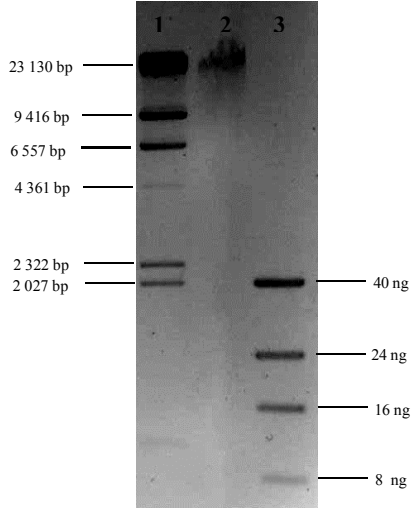


Şekil 3.11. Total viral DNA'nın %1 agaroz jel görüntüsü (1 numaralı kuyucuk 1 kb plus DNA marker, 2 numaralı kuyucuk 2 μ l viral DNA)

3.2.7. Metagenomik kütüphanenin oluşturulması ve oluşturulan kütüphaneden dizi analizi öncesi kontroller

End-Repair reaksiyonu

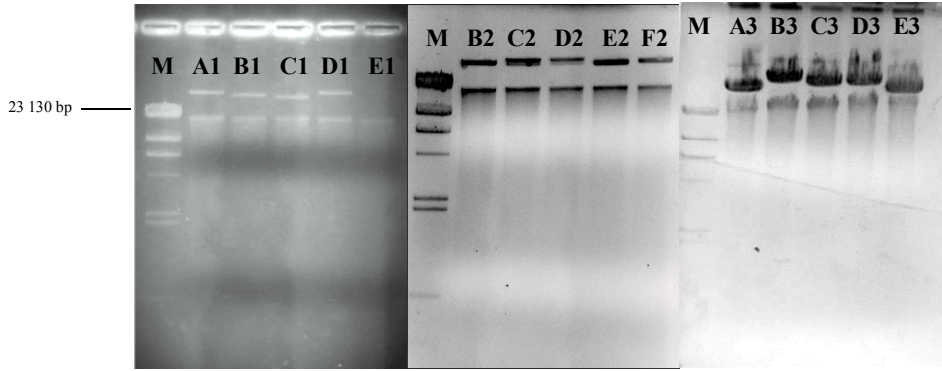
Elde edilen viral DNA'nın küt uçlu pCC2FOS vektörü ile bir araya getirilmesi için uçlarının kesilmesi reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı, reaksiyon bileşenlerini uzaklaştırarak saf DNA elde etmek için Amicon Ultra-100K (Millipore) santrifüj filtreleri kullanımı ile sırasıyla 1X TAE, 0.5X TAE ve steril mQ su ile yıkanmıştır. Uygun markerlar ile birlikte %1' lik agaroz jele yüklenen DNA'nın kırılıp kırılmadığı kontrol edilmiştir. Ayrıca toplam viral DNA miktarı jel elektroforezinde kullanılan Low Mass DNA ladder ile karşılaştırmalar sonucu hemde Nanodrop ölçümü ile miktarı 25 ng/μl olarak belirlenmiştir. Şekil 3.12' de jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.12. Uçları kesilen viral DNA'nın %1'lik agaroz jel görüntüsü [1 numaralı kuyucuk λ Hind III, 2 numaralı kuyucuk viral DNA, 3 numaralı kuyucuk Low Mass DNA Ladder (Bu markerda işaretlenen bantların içerdiği DNA miktarları ng olarak belirtilmiştir)]

Kütüphaneden klonların saflaştırılması ile fosmid vektörlerin kontrolü

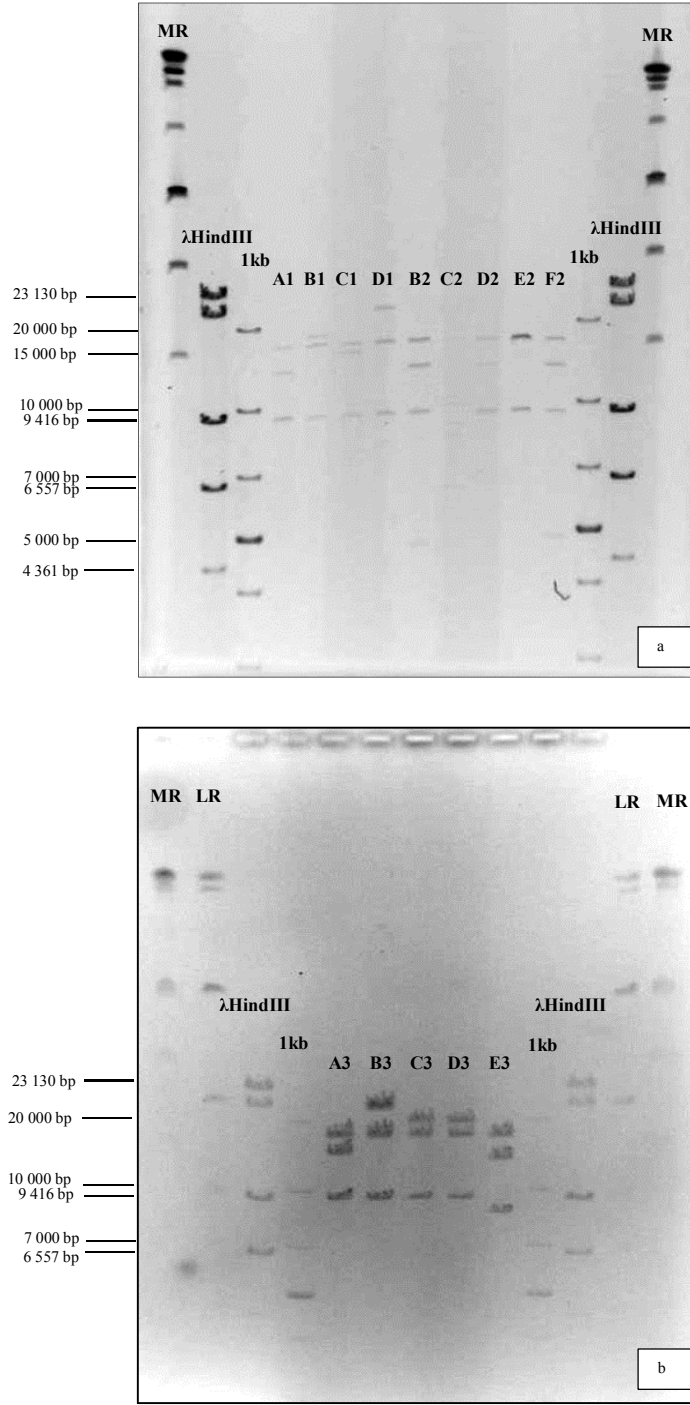
Metagenomik kütüphane oluşturulduktan sonra, kütüphaneyi oluşturan klonların rekombinant fosmid vektörü taşıyıp taşımadığı kontrol edilmiştir. Rastgele seçilen 15 klon Kloramfenikol (12.5 µg/ml), %0.2 Maltoz ve indüktör içeren TB besiyerinde 1 gece geliştirmiş ve QIA Prep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) ile saflaştırılmıştır. Klonların saflaştırılması ile elde edilen ürünler %1'lik agaroz jele yüklenerek fosmid içerip içermediği kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre klonların farklı formlarda (halkasal ve supercoil) vektör içerdiği belirlenmiştir.



Şekil 3.13. Klonlardan saflaştırılan vektörlerin %1'lik agaroz jel görüntüsü (M olarak isimlendirilen kuyucuk λ Hind III marker, A1, B1, C1, D1, E1, B2, C2, D2, E2, F2, A3, B3, C3, D3, E3 kütüphanedeki klonlar)

Rekombinant vektörlerin restriksiyon enzimi ile kesilerek içerdiği insert bölgenin büyüklüğünün belirlenmesi

Klonlardan saflaştırılan fosmid vektörlerin içerdiği insert bölgesinin kontrolü için vektörler BamHI enzimi ile kesilmiş elde edilen ürünlerden PFGE gerçekleştirilerek insert bölgelerinin büyüklüğü belirlenmiştir. Şekil 3.14 (a ve b)'te jel görüntüleri verilmiştir. Çizelge 3.2' de enzim ile kesilen vektörlerin ve insertlerin yaklaşık büyüklüğü görülmektedir.



Şekil 3.14. Insert büyüklüğünün belirlendiği PFGE jeli (Kullanılan markerlar ve klon adları şekil üzerinde belirtilmiştir; MR, Mid Range PFG Marker (NEB); LR, Low Range PFGE Marker (NEB); 1 kb plus marker)

Çizelge 3.2. BamHI enzimi ile kesilen vektörlerin ve taşıdıkları insert DNA'nın yaklaşık büyüklükleri

Klon Adı	Insert Büyüklüğü (kb)	Vektör büyüklüğü (kb)
A1	29	9.4
B1	33	9.4
C1	31	9.4
D1	38	9.4
B2	34	9.4
C2	0	-
D2	30	9.4
E2	16	9.4
F2	34	9.4
A3	33	9.4
B3	40	9.4
C3	38	9.4
D3	38	9.4
E3	32	8.6

3.3. Örneğin Mikrobiyal Çeşitliliğinin Belirlenmesi ile İlgili Bulgular

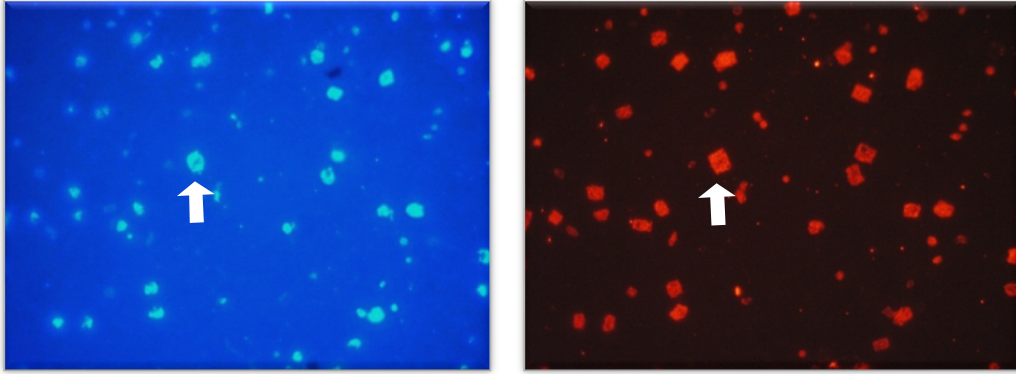
3.3.1. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve hücresel yoğunluğun belirlenmesi

Ağustos 2011 ayında Tuz Gölünden alınan örneğin yapılan DAPI boyaması ile toplam mikroorganizma sayısı, Arc 915 probu ile hibridizasyonu sonrası Archaea sayısı ve Eub 338 probu ile hibridizasyonu sonrası Bacteria sayısı, filtre edilen örnek hacmi ve filtre yüzeyi göz önüne alınarak hesaplanarak belirlenmiştir. Çizelge 3. 3'te yapılan sayımlar sonucu örnekteki toplam hücre, Archaea ve Bacteria sayıları (hücre/ml \pm standart sapma) verilmiştir.

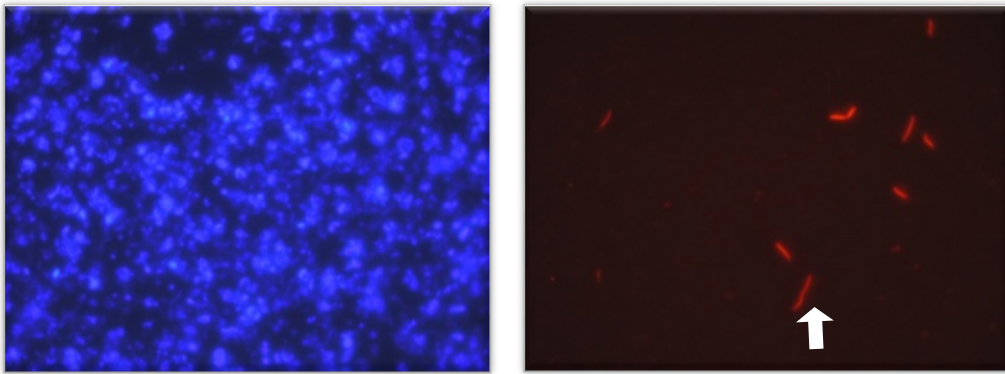
Çizelge 3.3. Tuz Gölü örneklerindeki toplam hücre, Archaea ve Bacteria hücre sayıları

Toplam DAPI sayımı	Arc 915	Eub 338
$2.79 \times 10^6 \pm 0.18$	$1,51 \times 10^6 \pm 0.18$	$1.30 \times 10^4 \pm 0.3$

Hibridizasyon sonrasında floresan mikroskop ile yapılan gözlemlerde Ağustos ayında alınan örnekte *Archaea*'nın oldukça baskın olduğu saptanmıştır. Örnekte *Bacteria* sinyalinin çok zayıf olduğu görülmüştür. Aşağıdaki şekillerde Arc 915 probu (Şekil 3.15), Eub 338 (Şekil 3.16) ile hibridizasyon sonrası tespit edilen hücre fotoğrafları verilmiştir.



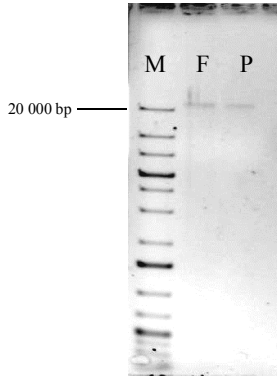
Şekil 3.15. DAPI ve Arc 915 probu ile FISH işlemi sonucu mikroskop görüntüsü (Hibridizasyon sonrası ışığa veren *Archaea* hücreleri sağ tarafta ok ile gösterilen kare şekilli hücreler ve solda aynı görüntü alanının DAPI boyaması)



Şekil 3.16. DAPI ve Eub 338 probu ile FISH işlemi sonucu mikroskop görüntüsü (Hibridizasyon sonrası ışığa veren *Bacteria* hücreleri sağ tarafta ok ile gösterilmiş ve solda aynı görüntü alanının DAPI boyaması)

3.3.2. Su örneğinden total DNA ekstraksiyonu

Tuz gölü su örneğinin santrifüj sonrası oluşturulan pelet ve filtrasyon sonrası elde edilen filtreden genomik DNA ekstraksiyonu, Cifuentes ve ark. (1999) ve Nogales ve ark. (2000)' nın önermiş olduğu ekstraksiyon yöntemlerinde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.17'de DNA ekstraksiyonu sonrası örneklerin %1 agaroz jeldeki durumları görülmektedir. Nanodrop ölçümleri sonucu filtreden elde edilen DNA konsantrasyonu 24 ng/μl, peletten ise 18 ng/μl olarak belirlenmiştir.



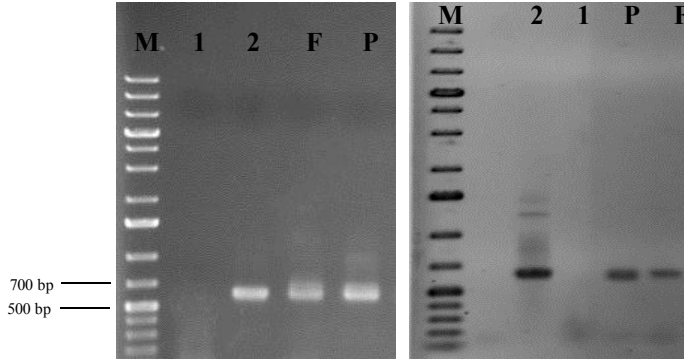
Şekil 3.17. Su örneğinden genomik DNA ekstraksiyonu sonrası jel görüntüsü (M, 1 kb plus DNA ladder, F, filtreden ekstrakte edilen DNA, P, peletten ekstrakte edilen DNA)

3.3.3. Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) ile mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi

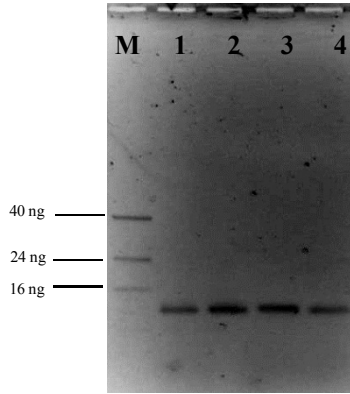
16S rRNA geninin DGGE analizi için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonu

Tuz Gölü su örneği mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen DGGE analizi için, Archaea ve Bacteria spesifik olmak üzere 16S rRNA bölgesinden yaklaşık 600 bp bölge amplifiye edilmiştir. Archaea ve Bacteria için elde edilen amplifikasyon ürünleri Şekil 3.18' de verilmiştir. Sonrasında elde edilen PCR ürünleri GeneJET PCR Purification Kit (Fermantas) kullanımı ile saflaştırılmış ve DGGE jeline yüklenecek miktarı belirlenmesi için Low Mass DNA ladder markerı kullanımı ile ürünler %1' lik agaroz jele yüklenerek DNA miktarları belirlenmiştir (Şekil 3.19). Ayrıca nanodropta ölçüm

yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, herbir örnekten DGGE jeline 300 ng olacak şekilde yükleme yapılmıştır.



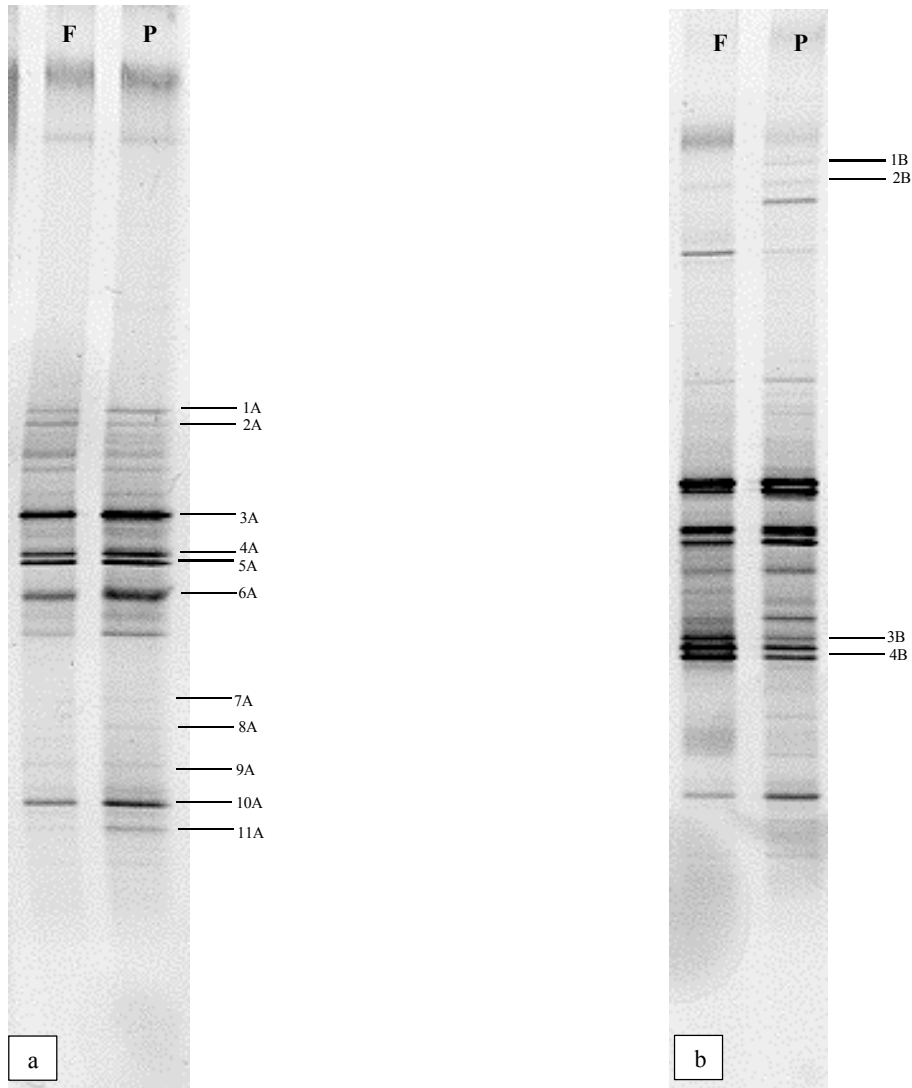
Şekil 3.18. *Archaea* DGGE-PCR amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü (Solda, M, 1 kb plus DNA marker; 1, negatif kontrol; 2, pozitif kontrol; F, filtre DNA; P, pelet DNA), *Bacteria* DGGE-PCR amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü (Sağda, M, 1 kb plus DNA marker; 1, negatif kontrol; 2, pozitif kontrol; F, filtre DNA; P, pelet DNA; üzerinde belirtilmemiş çukura örnek yüklenmemiştir)



Şekil 3.19. DGGE jeline yüklenecek miktarın hesaplanması için yapılan miktar jeli görüntüsü (M, Low Mass DNA ladder; 1, *Archaea* filtre DNA; 2, *Archaea* pelet DNA; 3, *Bacteria* filtre DNA; 4, *Bacteria* pelet DNA)

DGGE jeli

%40-%70 gradiyente sahip DGGE jeline yüklenen 300 ng miktarındaki örneklere ait jel görüntüsü Şekil 3.20 (a ve b)' de *Archaea* ve *Bacteria* olarak verilmiştir. Numaraları verilen bantlardan elüt edilen DNA re-pcr işlemi ile yeniden çoğaltılmış ve GeneJET PCR Purification Kit (Fermantas) kullanımı ile saflaştırılarak dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonrası gen bankasından yapılan karşılaştırmalara göre elde edilen veriler Çizelge 3.4 ve 3.5' te verilmiştir.



Şekil 3.20. a) *Archaea* DGGE jel görüntüsü, b) *Bacteria* jel görüntüsü (F filtre DNA'sı, P peletten elde edilen DNA, dizi analizine alınan bantlar numaralandırılmıştır)

Çizelge 3.4. *Archaea* grubuna ait numaralı örneklerin dizi analizi sonrasında BLAST sonuçları

Bant Adı	Dizi Analizinde Kullanılan Primer	Accession Numarası	Gen Bankasındaki Karşılığı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen Nükleotid Miktarı
1A	907R	GQ375012.1	Uncultured haloarchaeon clone Cry7_clone82 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	487/499
2A	907R	HQ157588.1	Uncultured archaeon clone MHNAA9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	315/316
3A	907R	EF459729.1	Uncultured Haloquadratum sp. clone 3-46A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	435/435
4A	907R	FR746099.1	Haloquadratum walsbyi C23 complete genome	99%	496/499
5A	907R	GQ911621.1	Uncultured Haloquadratum sp. clone Arch170ppt-c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	495/495
6A	907R	FM210896.1	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, clone XA50	92%	443/483
7A	907R	GQ374968.1	Uncultured haloarchaeon clone Cry7_clone27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	479/491
		AM947480.1	Uncultured haloarchaeon partial 16S rRNA, clone SFG1G111	98%	479/491

Çizelge 3.4 (Devamı). *Archaea* grubuna ait numaralı örneklerin dizi analizi sonrasında BLAST sonuçları

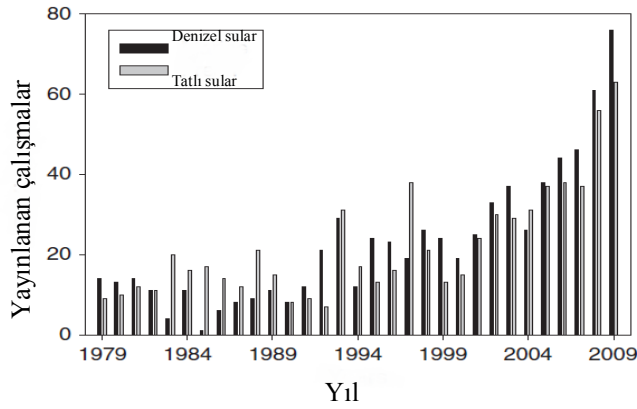
8A	907R	FN391236.2	Uncultured haloarchaeon partial 16S rRNA gene, clone SFH1B111	96%	478/497
9A	907R	JQ068944.1	Halorubrum sp. DSTD307 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	475/479
10A	907R	FN391237.2	Uncultured haloarchaeon partial 16S rRNA gene, clone SFH1C081	98%	321/329
		JN196524.1	Natronomonas sp. GV-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	320/329
11A	907R	AY498645.2	Natronomonas moolapensis 8.8.11 strain CSW8.8.11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	481/487

Çizelge 3.5. *Bacteria* grubuna ait numaralı örneklerin dizi analizi sonrasında BLAST sonuçları

Bant Adı	Dizi Analizinde Kullanılan Primer	Accession Numarası	Gen Bankasındaki Karşılığı	Yüzde Benzerlik	Eşleşen Nükleotid Miktarı
1B	907R	JQ624221.1	Uncultured bacterium clone mMBR.6.12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	467/475
2B	907R	GU941086.1	Uncultured bacterium clone N702B_328 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	463/508
3B	907R	FN994944.1	Uncultured halophilic eubacterium partial 16S rRNA gene, clone SER1H121	85%	426/499
		JN839858.1	Uncultured <i>Salinibacter</i> sp. clone AAA188_F07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	425/499
4B	907R	JN839855.1	Uncultured <i>Salinibacter</i> sp. clone AAA188_D13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	497/511
		FN393552.1	Uncultured halophilic eubacterium partial 16S rRNA gene, clone SFD1B011	97%	498/511

4.TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Çevresel ortamlardaki prokaryotik virüsler, biyosferin ana bileşeni olduklarının anlaşılmasıyla günümüzde mikrobiyologlarda merak uyandırmaya başlamıştır. Biyosferde yaklaşık 10^{31} - 10^{32} virion olduğu ve populasyon değişimindeki ölçümler sonucu saniyede yaklaşık 10^{24} virionun enfeksiyon gerçekleştirerek global popülasyonu etkilediği tahmin edilmektedir (Krupovic ve ark., 2011). Ayrıca sucul sistemlerin bu yoğunluğun büyük bir kısmını kapsadığı ve yaklaşık 10^{30} oranında olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla bu yüksek sayılar, mikrobiyal ekologları viral popülasyon çalışmalarına yöneltmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda, virüslerin oldukça fazla çeşitlilik gösterdikleri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, bakteriyal ve arkeal konakların evriminde önemli etkenler olmalarıyla dünya ekosisteminde birçok role sahip oldukları ve muhtemelen milyarlarca yıldan beri bu işlemleri gerçekleştirdikleri düşünülmektedir. Ayrıca, virüsler okyanuslarda ve diğer doğal ortamlarda karbon ve enerji döngülerinde etkili olmalarıyla ekolojide de ana faktörlerden biridir. Göller, nehirler, okyanuslar ve denizler, deniz buzu ve solar tuzlalar olmak üzere sucul ekosistemlerde virüslerin önemi tahmin edilmekle birlikte, 1980 li yıllarda viral ekoloji dalında sucul ortamlardaki geçirimli elektron mikroskobu (TEM) çalışmaları sonucu sucul ortamlarda önceden düşünülenden daha fazla sayılar da olduğunun belirlenmesiyle günümüzde yeniden kuvvetlenmiştir (Filippini ve Middelboe, 2007; Jacquet ve ark., 2010; Krupovic ve ark., 2011).



Şekil 4.1. ISI web of knowledge veritabanında denizel ve tatlı su ekosistemlerindeki virüslerle ilgili aramalar sonucu ulaşılan yayınların sayısı (Jacquet ve ark., 2010)

Sucul virüslerin büyük bir kısmının okyanuslar ve denizsel ortamlarda bulunduğu düşünülmektedir. Hipersalin ortamlar gerek tuz konsantrasyonları ile gerek iyonik bileşen içerikleriyle bu ortamlara benzerlik göstermektedir. Dünya çapında son zamanlarda hipersalin ortamlarda bulunan virüsler ile ilgili çalışmalar sonucunda mililitrede 10^9 ya da daha fazla oranlarda virüs benzeri yapılar içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca farklı ortamlar ve farklı tuz gradientine sahip ortamlarda viral çeşitliliğin oldukça fazla olduğu belirlenmiştir (Guixa-Boixareu ve ark., 1996; Santos ve ark, 2012). Dünya’da son zamanlarda önem kazanan halovirüsler ile ilgili araştırmalarla karşılaştırıldığında, Türkiye’de çok sayıda hipersalin ortam bulunmasına rağmen literatürde yayımlanan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bilgiler doğrultusunda, ülkemizde İç Anadolu Bölgesinde bulunan ve Dünya’daki önemli hipersalin ortamların arasında bulunan Tuz Gölü’nün viral çeşitliliğinin belirlenmesi gerekliliği gösterilmiştir.

Tuz Gölü ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, gölün jeolojik yapısı, göldeki mikrobiyal komünite yapısı ile ilgili ya da kültür çalışmaları sonucu elde edilen izolatlardan enzim çalışmaları literatürde mevcuttur. Kallı (2000) yaptığı çalışmada Tuz Gölü’nden izole ettiği 18 adet halofilik bakterinin çeşitli biyokimyasal ve antibiyotiklere duyarlılık testlerini gerçekleştirmiş ve bu izolatların *Halobacterium* cinsine ait Archaea olabileceklerini bildirmiştir. Birbir ve Sesal (2003) yaptıkları çalışmada Tuz Gölü’nden izole ettikleri izolatlardan bir kısmını detaylı olarak incelemeye almışlar ve bunların optimum gelişim gösterdikleri tuz, pH ve sıcaklık derecelerini belirlemişlerdir. Ayrıca bu izolatların çeşitli biyokimyasal testlerini yapmışlar ve sonuç olarak Tuz Gölü’nün aşırı derecede halofilik bakteriler açısından uygun bir ortam olduğunu bildirmişlerdir. Birbir ve arkadaşları (2007), kültür çalışmaları ile elde ettikleri ve koloni özelliklerinden *Halobacteriaceae* ailesine ait olduğunu belirledikleri 27 izolattan temsilciler seçmiş, fenotipik karakteristiklerini ve antibiyotik duyarlılıklarını ve hidrolitik enzimlerini araştırmışlardır. Ayrıca, izolatların 16S rRNA analizleri sonucu *Haloarcula*, *Halorubrum* ve *Halobacterium* olarak belirlemişlerdir. Mutlu ve arkadaşları (2008), 16S rRNA analizlerine dayalı farklı moleküler teknikler kullanarak mikrobiyal komünite analizi uygulamışlar ve *Halorubrum*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Haloquadrata*, *Haloterrigena* ve *Salinibacter* cinslerine ait türler

belirlemişlerdir. Bununla birlikte dünyada bazı bölgelerde yayılım gösteren *Salinibacter* türünün Tuz Gölü'ndeki varlığı ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Bunun yanı sıra literatürde Tuz Gölü'nde virüsler ile ilgili yayınlanan çalışma bulunmamaktadır.

Doğadaki mikroorganizmaların yalnızca %0.1-1'inin kültüre edildiği ve kültür bağımlı metodların mikroorganizmaları incelemede yeterli olmadığı bilinmektedir. Virüsler göz önüne alındığında, konak organizmaları kültüre etmek bu kadar sınırlı iken, bu organizmaları enfekte eden virüslerin kültüre alınması doğrultusunda yapılan çalışmaların virüslerin doğal yapılarını yansıtmada yeterli olmadığı bilinmektedir. Bu yüzden sucul mikrobiyal besin ağının önemli bir bileşeni olan virüslerin etkilerini anlamak için, virüs benzeri partiküllerin hızlı ve doğru değerlendirileceği protokoller gerekmektedir. Dolayısıyla mikroskopi ve moleküler genetik temelli yaklaşımlar, virüslerin mikrobiyal topluluğu etkileyen bileşen olduklarını ispatlamada tercih edilen yöntemlerdir. Bu protokollerin temeli, virüs benzeri yapıların yoğunluğunun belirlenmesi, doğal su örneğindeki virüs benzeri yapıların çeşitliliğini belirlemek amacıyla komünite karakterizasyonu ve son zamanlarda DNA dizi analizlerindeki ilerlemeler sonucu günümüzde tercih edilen yöntemler haline gelen metagenomik yaklaşımlardır (Chen ve ark., 2001; Paul ve Sullivan, 2005;. Wommack ve ark., 2009).

Halovirüslerin ortamlarındaki genel özellikleri (şekil ve genom büyüklüğü), saf kültürler kullanılarak izole edilen halovirüslerin gösterdiği genel karakteristik özellikleriyle yansıtılmamaktadır (Santos ve ark., 2012). Baxter ve arkadaşlarının (2011) Büyük Tuz Gölü viral çeşitliliği incelemeye yönelik çalışmalarında viral çeşitliliğin doğru resmedilmesinin birçok yöneme bağlı olduğunu ve yeni hipersalin ortamlardan keşfedilmesiyle ortaya çıktığını vurgulamışlardır. Bu yöntemlerin, biyolojik süreçlerin ve fizikokimyasal koşulların ölçülmesi, geçirimli elektron mikroskobu (TEM), metagenom analizi ve *Archaea*, *Bacteria* ve *Eucarya* tarafından temsil edilen ekstrem halofilik organizmaları enfekte eden yeni virüslerin izolasyonu gibi metodlar olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızın ana basamağını oluşturan kısımda, Tuz Gölü'nde bulunan viral populasyonun analizi için farklı amaçlar doğrultusunda birden fazla yaklaşım uygulanarak viral çeşitlilik incelenmiştir. Buna göre, halovirüslerin yoğunluğu ve morfolojileri mikroskopik yöntemler ile saptanmış ve parmak izi yöntemlerinden PFGE ile viral topluluğun genom büyüklükleri belirlenmiştir. Böylece viral topluluğun karakterizasyonu yapılmıştır. Sonrasında viral DNA elde edilerek metagenomik kütüphane oluşturulmuştur.

Epifluoresan Mikroskop (EFM) kullanımı ile fluoresan boyama metodu doğal sulardaki virüslerin sayılmasında doğru sonuçlar vermesi ile son yıllarda oldukça kullanışlı hale gelmiştir (Hennes ve Suttle, 1995; Suttle, 2007). EFM bazlı metodlar, filtreler üzerinde tutulan nükleik asitlere bağlanma katsayısı yüksek olan fluoresan boyalar kullanılarak boyamanın gerçekleştiği ve EFM kullanımı ile tek tek sayımının yapılarak viral yoğunluğun belirlendiği yaklaşımdır. Çalışmamızda kullandığımız SYBR Gold boyasının çift ya da tek zincirli DNA ya da RNA virüslerine bağlanan hassas bir boya olduğu saptanmıştır. Ayrıca SYBR Gold ile boyanmış sucul örneklerden yapılan incelemelere göre, bu boyanın virüs partiküllerini hızlı boyayan ve stabil ışığa ile doğru sayımına olanak sağlayan bir fluoresan boya olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2001). Dolayısıyla çalışmamızda SYBR Gold ile boyanmış virüs partiküllerinin EFM kullanımı ile daha doğru sonuçlar vereceği yönünde bu yöntem tercih edilmiştir.

Yukarıda da bahsedildiği gibi hipersalin ortamlar yaklaşık 10^9 VLP/ml gibi viral yoğunlukları ile sucul sistemler arasındaki en yüksek VLP sayılarını gösteren ortamlardan biri olarak belirtilmiştir (Guixa-Boixareu ve ark., 1996).

Bettarel ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada Senegal'de dört farklı tuzluluk gradientine sahip sucul ortamlardaki viral yoğunluğu belirlemek amacıyla SYBR Gold boyama yapmışlar ve EFM inceleme sonucu artan tuz konsantrasyonları ile virüs benzeri partiküllerin sayısının arttığını ve 10^8 VLP/ml'ye ulaştığını saptamışlardır.

Hennes ve Suttle (1995) farklı sucul ortamlarda viral yoğunluğu belirlemek için floresan özelliğinde olan Yo-Pro boyasını kullanarak EFM ile inceleme yapmışlardır. Tuz Gölü'ne benzer tuzluluktaki ortamlarda viral yoğunluğu yaklaşık 10^8 VLP/ml olarak belirlemişlerdir.

Jiang ve arkadaşları (2003), Kaliforniya'da alkalın özellikteki tuzlu bir göl olan Mono Gölü'nde viral topluluğun çeşitliliğini birden fazla yöntem dahilinde incelemişler ve viral topluluğun yoğunluğunu belirlemek için EFM yöntemini kullanmışlardır. SYBR Green I floresan boyasını kullanarak yaptıkları analizde viral yoğunluğu yaklaşık 10^9 VLP/ml olarak belirlemişlerdir. Başka bir çalışma ile (Brum ve Steward, 2010), Mono Gölü'nde mevsimsel olarak oluşan tabakalaşma sonucu farklı tabakalardaki viral yoğunluğu belirlemek için SYBR Gold ile boyama sonrasında EFM ile analiz etmişler ve en yüksek viral yoğunluğu 10^8 VLP/ml olarak belirlemişlerdir.

Tuz Gölü su örneği SYBR Gold floresan boyası ile boyanmış ve EFM kullanımı ile virüs benzeri partiküllerin varlığı incelenmiştir. Rastgele alanlarda yapılan çoklu sayımlar sonucu viral yoğunluk 1.04×10^9 VLP/ml olarak belirlenmiştir. Tuz Gölü'nün EFM ile incelenmesi sonucu belirlenen viral yoğunluğun yüksek değerlerde olduğu ve diğer hipersalin ortamlarda belirlenen sonuçlar ile paralellik gösterdiği saptanmıştır.

Viral ekolojide birçok kültür bağımsız yaklaşımın uygulanmasında ana basamak, çevresel örnekten virüslerin yoğun bir şekilde elde edilmesini içermektedir. Yapılacak çalışmalar öncesinde virüs partiküllerinin sayılarının artırılması ve mikrobiyal hücrelerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla viral nükleik asit izolasyonu öncesinde uygulanan 2 yaklaşım vardır, bunlar ultrafiltrasyon, ultrasantrifüj işlemleridir. Kültür bağımlı yollarla virüslerin sayıları artırılıp ultrasantrifüj ile saflaştırılabildiği gibi, su örneği ultrafiltrasyon ile konsantre edilerek virüs partikülleri yoğunlaştırılabilir (Delwart, 2007; Wommack ve ark., 2009). Çalışmamızda önce $0.2 \mu\text{m}$ por çaplı membran filtreler kullanımıyla mikrobiyal hücreler uzaklaştırılmıştır. Ardından sırasıyla 30kD ve 100 kD membran filtrelerine sahip filtrasyon sistemlerinin kullanımıyla

ultrafiltrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyon sonrası viral yoğunluk 10^{10} VLP/ml olarak belirlenmiş ve bu filtratla diğer işlemler gerçekleştirilmiştir.

Konsantrasyon işleminin ardından viral topluluğun morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) uygulanmıştır. TEM önceleri viral yoğunluğun belirlenmesi amacıyla kullanılmış olmasına rağmen günümüzde bu amaçla pek tercih edilmemektedir (Hennes ve Suttle, 1995; Suttle, 2007). Bunun yerine virüslerin morfolojisini belirleme ve büyüklüklerini saptama gibi avantajlara sahip olmasıyla günümüzde çevresel virüslerin çalışılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Virüs partiküllerinin incelenmesi çalışmalarında negatif boyama geniş ölçüde kullanılmaktadır. Bu boyama yönteminde, karbon kaplı grid üzerine alınan örnek, ağır metal tuzlar (fosfotungstik asit ya da uranil asetat) ile boyanmakta ve böylece örnek içerisindeki virüslerin saptanması mümkün hale gelmektedir. Negatif boyama sayesinde virüs partikülleri ile arka plan arasında belirgin bir kontrast oluşmakta ve böylece virüs partiküllerinin morfolojik yapıları belirlenmektedir (Roingard, 2008). Bu sayede virüslerin eş zamanlı olarak karşılaştırma, sınıflandırma ve identifikasyonu yapılmaktadır (Ackermann, 2009).

Sucul ortamlardaki virüsler ile yapılmış olan pek çok TEM analizi bulunmaktadır. Çalışmalarda TEM kullanımı, hipersalin bir ortamdaki viral çeşitliliği belirlemek, spesifik bir virüsün morfolojisi ve yapısal özelliklerini incelemenin yanı sıra, bazı çalışmalarda farklı tuzluluk gradientinin çeşitlilik üzerindeki etkisini araştırmaya yöneliktir.

Çalışmamızda Tuz Gölü'nde virüs partiküllerinin morfolojik çeşitliliğin belirlenmek için TEM kullanılmış ve çeşitli morfolojilerde virüslerin varlığı belirlenmiştir. Buna göre, çalışmamızda birçok hipersalin ortamda bulunduğu saptanan morfolojilere sahip virüslerin Tuz Gölü'nde de bulunduğu görülmüştür. Bu virüs morfolojileri yoğunluk sırasına göre küresel, iğ şekilli ve baş ve kuyruklu virüsler şeklindedir. Ayrıca, farklı morfolojilerdeki virüslere de rastlanmıştır. Bu farklı morfolojilerden filament şeklindeki virüslerin ve kurşunbenzeri virüslerin örnekte yüksek oranda bulunduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra, iğ şekilli-kuyruklu, filament ve kuyruklu ve kın şekilli olmak üzere farklı morfolojideki virüsler tespit edilmiştir.

Guixa-Boixareu ve arkadaşları (1996) çok havuzlu solar tuzlarında farklı tuz konsantrasyonlarında prokaryotik hücrelerin ve virüslerin yoğunluğunu, virüslerin etkisini araştırmış ve virüs partiküllerinin morfolojilerini belirleme amacıyla TEM kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre artan tuz konsantrasyonları ile birlikte prokaryotik hücre yoğunluğunun arttığı ve buna bağlı olarak viral yoğunluğun arttığını belirlemişlerdir. Örnekte, baş ve kuyruklu, limon şekilli ve ikosahedral morfolojilere sahip virüsleri saptamışlardır.

Oren (1997), Ölü Deniz’de bulunan virüs benzeri partikülleri TEM ile incelemiş ve morfolojilerini belirlemiştir. Elde ettiği sonuçlara göre Ölü Deniz’de küresel, iğ şekilli ve baş ve kuyruklu morfolojilerdeki virüslerin yanı sıra önceden rastlanmamış 6 köşeli yıldız şeklinde bir virüs morfolojisi de saptamıştır.

Diez ve arkadaşları (2000), İspanya’da çok havuzlu solar tuzlada bulunan viral toplulukların çeşitliliğini araştırmak için çeşitli yöntemler kullanmışlar ve virüs partiküllerinin morfolojilerini TEM analizi ile belirlemişlerdir. Çeşitliliğin büyük kısmını ikosahedral ve limon şekilli virüslerin oluşturduğunu gözlemlemişlerdir.

Porter ve arkadaşları (2005), *Haloarcula hispanica* ya da *Halorubrum* strainlerini enfekte ettiğini belirledikleri SH1 virüsünü izole etmişler ve bu virüsün karakterizasyonunu çalışmışlardır. Bu aşamalardan biri olan virion morfolojisini incelemek için daha ayrıntılı inceleme olanağı veren ve morfolojik değişimleri engelleyen ‘Thin-section’ elektron mikroskopi yaklaşımını uygulamışlardır. Virion enfeksiyon özelliklerini ve morfolojisini belirlemek amacıyla farklı modifikasyonlar uygulamışlar ve SH1 virüsünü ikosahedral olarak belirlemişlerdir.

Santos ve arkadaşları (2007) yılında farklı tuzluluk gradientine sahip havuzları içeren hipersalin tuzladaki viral topluluğu kültür bağımsız yaklaşımlarla incelemişlerdir. İspanya’da çok havuzlu solar bir tuzladan farklı tuzluluk oranlarındaki havuzlarda viral çeşitliliğin incelenmesinde morfolojilerin belirlenmesi amacıyla TEM işlemi gerçekleştirilmiştir. Analiz edilen bütün örneklerde, küresel, baş ve kuyruklu, limon şekilli ve filament şekilli olmak üzere

dört farklı morfoloji belirlemişlerdir. Filament şeklindeki virüslerin varlığı %31 ve %34 tuzluluğa sahip havuzlarda görülmüş ve ilk kez bu çalışma ile hipersalin ortamlardaki varlığı bildirilmiştir.

Brum ve Steward (2010), alkalın hipersalin bir göl olan Mono Gölü'nde mevsimsel değişikliklerle oluşan tabakalaşmanın virüs morfolojilerine nasıl yansındıklarını araştırmak için TEM yöntemi uygulamışlar ve temel virüs morfolojilerini belirlemişlerdir. Çalışmaları sonucunda baş ve kuyruklu virüslerin yoğun olduğu ve inceledikleri değişimlerin kuyruk uzunluğunu ve kapsit kalınlığını etkiledikleri ve kuyruk uzunluğunun derinlikle arttığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca tuzluluk oranı %7 ile 8.5 arasında değişen Mono Gölü'nde limon şekilli ve filament yapıdaki virüslere rastlamamışlardır. Bu durum limon şekilli virüslerin halofilik arkeler gibi ekstrem halofilik mikroorganizmaları enfekte ettiği ve yüksek tuz konsantrasyonunda varlığı düşüncesini bir kez daha kanıtlamaktadır.

Sime-Ngando ve arkadaşları (2010), Senegal'de ki hipersalin Retba Gölü'nde viral topluluğu çalışmışlar ve çalışmanın aşamalarından biri olan viral morfolojinin belirlenmesinde TEM kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre 5 morfoloji belirlemişlerdir. Çeşitliliğin %46'sını limon şekilli virüslerin, %35'ini de küresel morfolojideki virüslerin oluşturduğunu bildirmişlerdir. %13 oranında lineer yapıdaki virüslerin üçüncü dominant grup olduklarını gözlemlemişlerdir. Baş ve kuyruklu morfolojiye sahip virüslerin ise toplam çeşitliliğin %1'ini oluşturduğunu saptamışlardır. Ayrıca % 5'lik kısmının ise daha önceden belirlenmeyen morfolojilerde olduklarını rapor etmişlerdir.

Baxter ve arkadaşları (2011), Büyük Tuz Gölü'nde viral popülasyonu çalışmak için çeşitli yaklaşımlar kullanmışlar ve bu yaklaşımlardan biri olan TEM ile viral çeşitliliği belirlemişlerdir. Viral çeşitliliği temsilen fusiform yapılar, küresel şekilli virüsler, baş ve kuyruklu virüsleri belirlemişler ve yeni bir kategoriye temsil eden morfolojiyi rapor etmişlerdir. Bu yeni morfolojiyi oluşturan morfoloji, filament ve kın şeklindeki virüsleri kapsamaktadır.

Bu çalışmalardan da görüldüğü gibi hipersalin ortamlarda farklı amaçlar doğrultusunda TEM yöntemi kullanılmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, hipersalin ortamlarda çeşitli morfolojilerde virüs partiküller bulunmaktadır. Bu morfolojiler baş ve kuyruklu virüsler, limon ve iğ şekilli virüsler ile fusiform virüsler, küresel virüsler yoğun olmakla birlikte, son zamanlarda İspanya’da solar tuzlalar ile Büyük Tuz Gölü’nde rastlanan filament şeklindeki virüslerdir. Önceleri *Archaea* domaini üyelerinin baskın olduğu ortamlarda, bakteriyal baş ve kuyruklu virüs morfolojisinin nadiren görüldüğü düşünülmüş ve ekstrem ortamlarda rapor edilmemiştir. Fakat, virüs izolasyonunun çeşitli yaklaşımlar uygulanarak çalışılmaya başlanmasıyla baş ve kuyruklu morfolojideki virüslerin, tanımlanan haloarkeal virüs türlerinin önemli bir kısmını oluşturduğu saptanmıştır (Pina ve ark., 2011). İğ şekilli virüsler yaygın bir şekilde *Archaea* domainine ait halofilleri enfekte edildiği düşünülmekte ve bu durum artan tuzluluk ile birlikte iğ şekilli virüslerin yoğunluğunun artmasının saptanmasıyla doğrulanmaktadır.

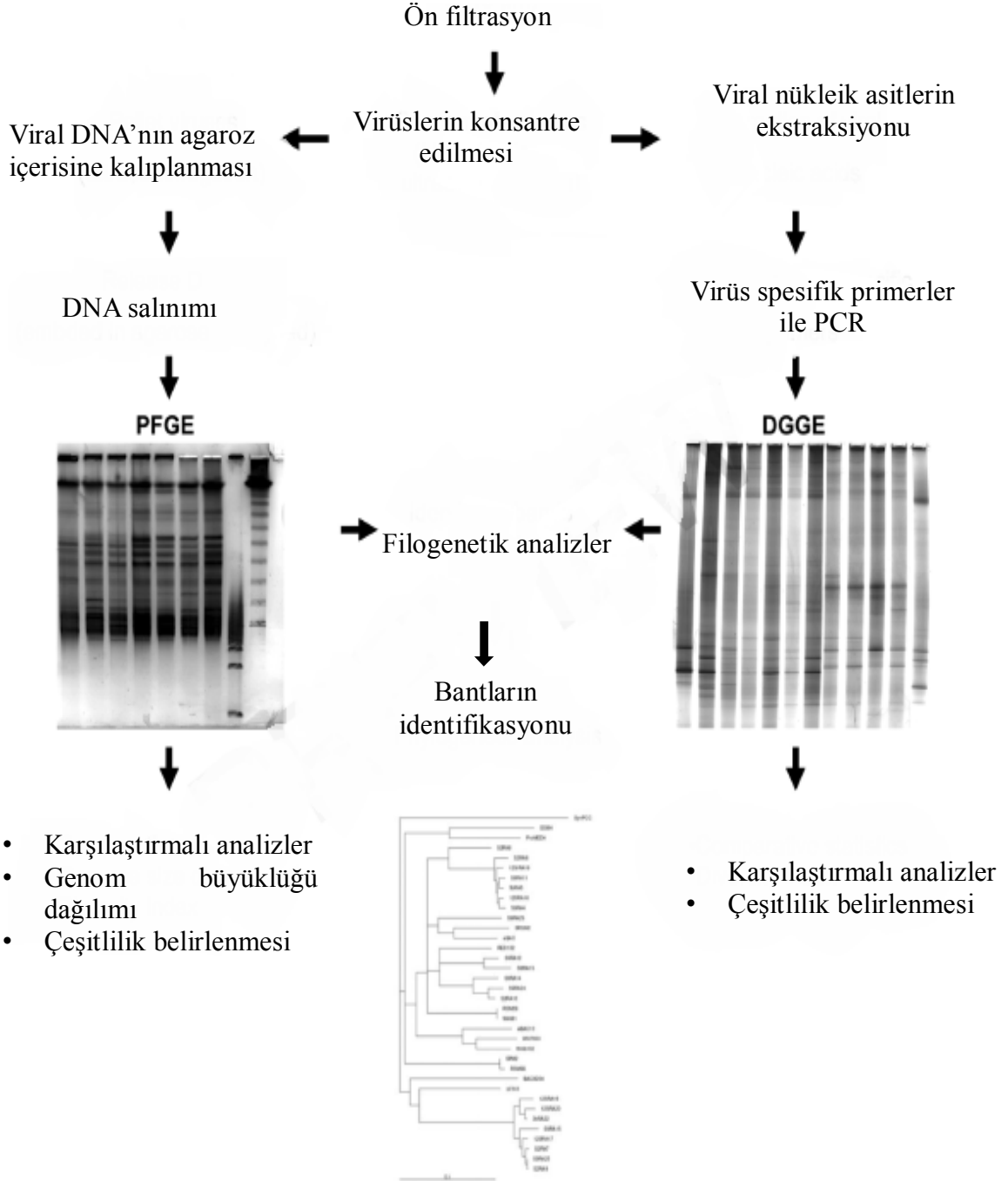
Çalışmamız sonucu küresel ve iğ şekilli virüslerin oldukça yoğun olduğu ve çeşitliliğin büyük kısmını oluşturduğu görülmüştür. Bunu yanı sıra günümüze kadar sadece İspanya’da solar tuzla havuzlarında ve Büyük Tuz Gölü’nde varlığı saptanan filament şekilli virüslerin de oldukça yoğun bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, hipersalin ortamlarda yapılan TEM analizlerinde henüz saptanmamış kurşun benzeri morfolojiye rastlanmış ve bu virüslerin çeşitliliğin yaklaşık %12’sini kapsadığı belirlenmiştir. Bu yapıları ek olarak, elde ettiğimiz sonuçlara göre, iğ şekilli virüsler grubuna dahil edebileceğimiz virüs morfolojilerinin Retba Gölü’nde bulunduğu belirlenmiştir (Sime-Ngando ve ark., 2010). Bu morfolojilere sahip virüsler yine iğ şeklinde olmakla birlikte farklı kuyruk yapıları taşımaktadır. Buna göre iğ şekilli-kuyruk olarak bahsettiğimiz virüs partikülleri iki gruba ayrılmaktadır, bir grup iğsi yapıda ve tek uzun kuyruk içerirken, diğer grup iğsi yapıda olup biri kısa diğeri daha uzun iki kuyruk içerdiği görülmüştür. Bunun yanı sıra çubuk benzeri olarak isimlendirdiğimiz partiküllerin yapısı daha ince ve uzun olup, partiküller orta kısımlarında hafif bir şişlik içermektedir. Retba Gölü’nde yapılan çalışmada bu 3 grup iğsi morfoloji içerisinde sınıflandırılmıştır.

Günümüze kadar sadece Büyük Tuz Gölü'nde varlığı görülen kın şekline sahip virüsler ise Tuz Gölü'nde yaklaşık %5 oranında görülmüştür.

Viral morfolojiyi belirlemede kullanılan tek teknik TEM' dir. Bununla birlikte bazı durumlarda morfolojik çeşitlilik değerlendirilirken bazı hatalar yapılabilir. Ayrıca bazı virüslerin morfolojik özelliklerini TEM çalışmaları ile belirlemek zordur. Küresel virüslerin kuyruklarını kaybetmiş baş ve kuyruklu virüsler olduğu ya da küresel şekle sahip olduğu varsayılan pleomorfik virüslerin temsilcileri oldukları düşünülebilir (Baxter ve ark., 2011). Bu amaçla viral morfolojinin daha iyi analizini sağlayan çeşitli elektron mikroskopi yöntemleri son zamanda kullanılmaktadır. Çeşitli modifikasyonlar ile viral preparatın sıvı azotta dondurulduğu cryo-EM yöntemi ya da özel fiksatifler ile virüslerin fiksasyonu ardından bloklar içerisinde tutulması ve buradan ince kesitler alındıktan sonra elektron mikroskobunda incelenmesi gibi yöntemler morfolojinin daha ayrıntılı incelenmesinde kullanılmalıdır. Bu yöntemler ile viral morfolojinin bozulması ve yanlış değerlendirilmesi minimum düzeye inmekte ve daha ayrıntılı analizler sonucu daha kesin sonuçlara ulaşmayı sağlamaktadır.

Mikrobiyal komünite çalışmalarında kültür bağımlı yaklaşımların sınırlarını ortadan kaldırmak için geliştirilen gen temelinde moleküler teknikler olan genetik parmak izi yaklaşımları arasında PFGE ve DGGE yer almaktadır. Bu yaklaşımlar sayesinde moleküler mikrobiyal ekoloji alanında altın çağ başlamış ve birden fazla çevresel ortamın komünite kompozisyonlarının karşılaştırılmasında birçok çalışmada kullanılmaya başlanmıştır. Son zamanlarda viral ekolojinin çevresel virüslerin önemini keşfedilmesiyle bu iki teknik sucul ortamlardaki virüsleri analizini amaçlayan birçok çalışmanın temel yöntemleri haline gelmiştir. Bu yöntemler ile viral topluluklar incelenirken örnek yine ön işlemler olan filtrasyon ile mikroorganizmaların uzaklaştırılması ve ardından ultrafiltrasyon ya da ultrasantrifüj ile virüs partiküllerinin küçük hacimlerde yoğun bir şekilde eldesi gerekmektedir. Bununla birlikte DGGE yöntemi, mikroorganizma popülasyonunu çalışmada olduğu gibi yine PCR temelli bir yöntem olup, PFGE için böyle bir zorunluluk yoktur (Sandaa ve ark., 2009). Tuz Gölü'nde bulunan halovirüsleri araştırmaya yönelik literatürde bilgi olmamasından dolayı, çalışmamızda PFGE

yöntemi tercih edilmiştir. Çünkü DGGE yönteminde, PCR bazlı yaklaşım olmasıyla, virüslere spesifik primer zorunluluğu bulunmaktadır. Şekil 4.2’ de viral komüniteleri çalışmada genetik parmak izi metodları ile ilgili işlem akışı özetlenmiştir.



Şekil 4.2. Sucul virüs komünitelerini analizinde kullanılan genetik parmak izi yöntemlerinin akış çizelgesi (Sandaa ve ark., 2009)

PFGE büyük DNA parçalarının elektroforetik ayrımına dayalı bir yöntem olup, teknik sucul ortamlardaki çift iplikli DNA virüslerinin 10-100 kb (katları) büyüklüğündeki genomlarının ayrımını sağlayarak viral komünitenin zenginlik, çeşitlilik ve dinamiklerini incelemek için kullanılmaktadır. Sucul ortamlardaki çift iplikli DNA'ya sahip viral çeşitliliği belirlemede PFGE kullanımı, önemli zamansal ve mekansal değişikliklerin genom büyüklüğünde kendini gösterdiğini ve viral komünitelerin canlılığının konak popülasyonunun dinamiği ile yüksek oranda ilişkili olduğunu vurgulamaktadır (Sandaa ve ark.,2009; Jacquet ve ark., 2010).

PFGE, su örneğinin konsantrasyonunun ardından ortamdaki bütün viral genomların analizini sağlamaktadır. Ayrıca, elde edilen bant sayısı dominant genomların büyüklüğüne orantılıdır. Bu metodun ana problemi, aynı büyüklükte genoma sahip farklı viral genotipler arasında ayırım yapılamamasıdır, bu durumda viral çeşitliliğin hatalı tahminine yol açmaktadır. Bu durumda herhangi bir bandın çeşitliliği dizileme ile ya da bu bandın hibridizasyonu ile daha derin analiz edilmelidir (Santos ve ark., 2012). Ayrıca, bu yöntem yalnızca, dsDNA virüslerini inceleme imkanı vermektedir. Sucul ekosistemlerde RNA virüsleri de bulunmakta ve bu durumda yine çeşitlilik hatalı tahmin edilebilmektedir. Fakat bütün bu sorunlara rağmen, viral topluluk kompozisyonlarını çalışmada en uygun yöntem olup, morfolojik çeşitliliğin belirlendiği TEM ile karşılaştırılabilir sonuçlar vermektedir (Weinbauer, 2004; Sandaa ve ark., 2009; Jacquet ve ark., 2010).

Diez ve arkadaşları (2000), İspanya'da farklı tuzluluktaki havuzlara sahip solar tuzlada, bu farklı tuz konsantrasyonlarındaki havuzlarda bulunan viral topluluğun genom çeşitliliğini analiz etmek için PFGE yöntemi kullanmışlardır. Viral topluluğun genom büyüklüğü 20 ile 300 kb arasında olmakla birlikte bütün örneklerde bulunan yoğun bant büyüklüğünü yaklaşık 40 kb olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, hipersalin göllerdeki viral çeşitliliğin denizel ortamlara göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir.

Jiang ve arkadaşları (2003) Kaliforniya'daki yüksek alkaline özelliğe sahip bir tuz gölü olan Mono Gölü'nün viral çeşitliliği birden fazla yaklaşım kullanımıyla araştırmışlardır. Viral topluluğun genom çeşitliliğini belirlemek

üzere PFGE yöntemini kullanmışlar ve genom çeşitliliğini 14-400 kb büyüklükleri arasında olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte prokaryotik organizmaları enfekte eden virüslere özgü olarak en yoğun genom büyüklüğünü 30-60 kb arasında gözlemlemişlerdir. 200 kb ve üzerindeki genom büyüklüğünü ile ortamda algal virüslerin var olabileceği tahminini yürütmüşlerdir.

Sandaa ve arkadaşları (2003), solar bir tuzlada, % 4 ile %37 arasında değişen tuzluluğa sahip havuzlarda viral dinamiği incelemişlerdir. Bu inceleme için örnek alımı 6 gün aralılarla iki kez gerçekleştirilmiş ve böylece bu kısa süreçteki viral komünite yapısındaki değişim araştırılmıştır. Ancak bu incelemeyi sadece PFGE yöntemi kullanarak gerçekleştirmişler ve 6 günlük arayla band profillerinde değişim saptamamışlardır. Ancak bir bandın birden fazla genom içerebileceğinin gösterilmesiyle, bu viral genomların değişmediği anlamına gelmemekte ve daha derin analizler gerçekleştirilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Elde etikleri sonuçlar doğrultusunda viral toplulukların genom aralığını 10-533 kb arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Ayrıca %4 ile %22 tuzluluk arasındaki havuzlarda viral genomların 32- 340 kb arasında olduğunu, %22'den fazla tuzluluktaki havuzlarda 10-189 kb arasında belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra, %15 ten fazla tuzlulukta dominant genom büyüklüğü 30-62 kb olarak belirlemişlerdir.

Santos ve arkadaşları (2007), İspanya'da çok havuzlu solar tuzladaki farklı tuz konsantrasyonlarındaki havuzlardan farklı zamanlarda aldıkları su örneklerindeki viral topluluğun morfolojik analizinin yanı sıra genom çeşitliliğini PFGE ile araştırmışlardır. Bütün örneklerde yaklaşık 37 kb büyüklüğündeki viral genomun (ya da aynı büyüklükteki farklı virüslerin genomunun) baskın olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmalarında gerçekleştirdikleri TEM analiziyle, PFGE analizi sonuçlarını karşılaştırmışlar ve yaklaşık 37 kb büyüklüğünde dominant bant ile birlikte toplam üç genomik bant belirlemişlerdir. Bu sonuçtan yola çıkarak farklı morfolojilerin aynı genom büyüklüğünde olabileceğini tahmin etmişlerdir.

Santos ve arkadaşları (2010), İspanya'da solar bir tuzlada %32 tuz konsantrasyonundaki solar tuzla viral çeşitliliği için uyguladıkları metagenomik

yaklaşım içerisinde PFGE ile ortamdaki viral genomların büyüklüğünü belirlemişlerdir. Viral toplulukta yaklaşık 37 kb genom büyüklüğün dominant olduğunu saptamışlardır.

Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi PFGE ile analiz edilen viral çeşitliliğin denizsel ortamlarla kıyaslandığında tuzlalarda daha az olduğu belirlenmiştir. Toplam prokaryotik kommunité yapısının tuzluluğa bağlı olduğu ve böylece viral popülasyonların dinamiğinin de konaklarının ekolojisine bağlı olduğunu düşündürmektedir (Diez ve ark., 2000; Sandaa ve ark., 2003; Le Romancer ve ark., 2007; Santos ve ark., 2007, Sandaa ve ark., 2009).

Çalışmamızda Tuz Gölü'nde halovirüslerin genom çeşitliliğini belirlemek üzere gerçekleştirdiğimiz PFGE analizi sonucu en dominant bandın yaklaşık 40 kb olmasıyla 30-40 kb arasında bantların dominant olduğu görülmüştür. Ayrıca yaklaşık 20 kb büyüklüğünde genom varlığı belirlenmiştir. Ayrıca yaklaşık 80 kb ve 145 kb değerlerinde smear şeklinde bantlar olduğu fakat çok yoğun olmadığı görülmüştür. Örneğin %31.6 'lık tuz konsantrasyonu düşünülüğünde aynı konsantrasyonlardaki hipersalin sucul sistemlerde yapılan PFGE analizleri ile benzerlik göstermektedir. Prokaryotik olabilecek virüslerin genom aralığı göz önünde alındığında çalışmamız sonucu elde edilen profilde 3 bant görülmüş ve böylece hipersalin göllerde çeşitliliğin denizsel ortamlara göre az olduğu bir kez daha görülmüştür.

Çalışmamız sonucu viral çeşitliliğin morfolojik olarak TEM ile belirlenmesinde birbirinden farklı 10 morfoloji olabileceği belirlenmiş ve PFGE analizi genom çeşitliliğinin 3-5 bant arasında olabileceği görülmüştür. Bu sonuçlar göz önüne alındığında farklı morfolojilerin aynı genom büyüklüğünde olabileceği tahmin edilmektedir. Bu konuda daha belirgin bir sonuca varmak için ortamdaki viral DNA klonlanarak ya da hibridizasyon yöntemleriyle daha derin olarak analiz edilmelidir (Santos ve ark., 2012). Dolayısıyla çalışmamızın devamında elde edilen viral topluluğun DNA'sı klonlanarak, birçok ayrıntılı analizi sağlayan metagenomik kütüphanesi oluşturulmuştur.

Metagenomik yaklaşımlar, örnekte bulunan bütün viral komünitenin genomlarının dizilenmesi şeklinde olan yaklaşımlar olup sucul sistemlerdeki viral çeşitliliğin analizleri için daha fazla bilgi sağlamaktadır. Metagenomik ve DNA dizileme teknolojilerindeki yenilikler sayesinde viral populasyonların genetik yapısı, viral evrimin mekanizmaları ve viral dizilerin çeşitliliği hakkında kaliteli bilgiler elde edilmeye başlanmıştır. Yeni virüslerin izolasyonu ve karakterizasyonu hızlanmış ve bu durum özellikle ekstrem ortamlarda çok oranda bulunan arkeal virüslerin, yeni virüslerin ve yeni virüs tiplerinin keşfinde önemli başlangıçlar yaratmıştır. *Bacteria* domaini enfekte eden virüsler hakkındaki veri arkeal virüslerle kıyaslandığında biraz daha fazla olmakla birlikte, bu iki domain üyelerini enfekte eden viral çeşitlilik hakkındaki dizi bilgisi oldukça azdır. Yapılan bazı metagenomik yaklaşımlar sonucu sucul ortamlardaki viral kütüphanelerin incelenmesiyle elde edilen dizilerin %65'inin yeni olduğu ve veri tabanlarında bilinen genlerle önemli bir benzerlik göstermediği görülmüştür. Gen Bankasındaki benzerlik gösterenler ise, DNA ve RNA polimerazlar, helikaz, DNA maturazlar, terminazlar, ekzonükleazlar ve integrazlar ve yapısal proteinler ile ilgili genlerle eşleştiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu ilerlemeler sayesinde virüsler hakkındaki çalışmalar sonucunda dizi bilgilerinin gün geçtikçe artması beklenmektedir (Paul ve Sullivan, 2005; Jacquet ve ark., 2010; Rosario ve Breitbart, 2011).

Breitbart ve arkadaşları (2002), kültüre edilmemiş iki farklı denizel sistemdeki viral komüniteyi metagenomik yaklaşım ile incelemişlerdir. Konsantre ettikleri su örneklerini ultrasentrifüj ile pelet haline getirmişler ve shotgun metagenomik kütüphaneyi oluşturmuşlardır. Elde ettikleri sonuçların analizi sırasında %65'inin daha önceden belirlenen dizilerle eşleşmediğini ve böylece çeşitliliğin çoğunun önceden karakterize edilmediğini saptamışlardır. Matematiksel hesaplamalar doğrultusunda oluşturdukları tahmini dizilerin sayısının, her iki komünitedeki populasyonların sadece %2-3'ünü içerdiğini gözlemlemişler ve iki ortamın viral çeşitliliğinin birbirinden oldukça farklı olduğunu belirlemişlerdir.

Angly ve arkadaşları (2006), metagenomik yaklaşım ile çeşitli denizel ortamlardaki virüslerin çeşitliliği ve dağılımı hakkında kapsamlı bir çalışma yapmışlardır. Kütüphane oluşturmadan ultrafiltrasyon ardından elde ettikleri viral metagenomları yeni nesil dizileme teknolojilerinden biri olan pyrosequencing (454 dizileme) yöntemiyle dizilemişler ve biyoinformatik analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Böylece Sargasso Denizi, Meksika Körfezi, Kolombiya'da kıyı suları ve Arktik okyanusunda 68 farklı noktadan, 3000 m derinlikten 10 sene boyunca aldıkları 184 su örneğindeki viral çeşitliliği metagenomik yaklaşım ile ayrıntılı bir biçimde analiz etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda yeni siyanofajları ve tek zincirli DNA virüsleri kapsamında %91'den fazla viral dizinin bilinmediğini saptamışlardır.

Santos ve arkadaşları (2010), İspanya'da kristalize havuz su örneğinin konsantrasyonunun ardından PFGE ve TEM ile viral çeşitlilik analizi sonrasında fosmid vektör kullanımıyla metagenomik kütüphanesini oluşturmuşlardır. Yaklaşık olarak 1.35 Mbp büyüklüğünde klonlanmış viral DNA yı içeren kütüphaneyi farklı biyoinformatik araçlar ile analiz etmişler ve önceden elde edilmiş sonuçlar ile kıyaslamışlardır. Karşılaştırmalar sonucu metaviromun oldukça çeşitlilik içerdiğini ve diğer sucul ve denizel ekosistemleden farklı olduğunu saptamışlardır. Metaviromun %75-80'ninin korunmuş tahmini proteinler ile eşleştiğini ve bazılarının San Diego tuzlalarındaki metaviromlar ile eşleştiğini saptamışlardır. Ayrıca, biyoinformatik analizler sonucu tahmini konakların *Haloquadratum walsbyi* ve *Salinibacter ruber* olarak belirlemişlerdir.

Analiz edilen metagenomik kütüphaneler sonucu yeni diziler elde edilmesinin yanı sıra, bu veriyi değerlendirecek mevcut biyoinformatik araçlar henüz çok yeterli değildir. Angly ve arkadaşları (2009), "Genome relative Abundance and Average Size (GAAS)" adında bir metagenomik araç tasarlamışlardır. Önceden incelenmiş bir farklı metagenomların analizi sonucu bu aracın daha doğru sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir. Hipersalin ortamlardan elde edilmiş 10 farklı viral metagenom ile yapılan analizler sonucu, bu araç ile halovirüslerin genom uzunluğunun 51-263 kbp arasında olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca hipersalin viral metagenomların, hipersalin mikrobiyal

genomlardan daha dar oranda genom büyüklüğüne sahip olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Genomik materyalin izolasyonu viral metagenomikte önemli bir aşamadır. Büyük insert taşıyan kütüphane oluşturulmasında yeterli miktarda genomik materyalin izole edilememesi sorun yaratmaktadır. Sucul örneklerde 10^9 VLP/ml gibi yüksek oranlarda viral partikül bulunmasına rağmen, genomik DNA ya da RNA subnanogram kalitesinde elde edilmektedir. Bu duruma, mikrobiyal genomun sebep olduğu düşünülmektedir. Mikrobiyal genom büyüklük olarak yüzlerce viral genoma denk gelmektedir ve çok az mikrobiyal hücre ya da viral olmayan serbest DNA, viral nükleik asit izolasyonunda çok ciddi bir kontaminasyona sebep olmaktadır. Kontaminasyon, filtrasyon, santrifüj ve nükleaz muamelesinde meydana gelebilmektedir. Klonlamada kullanılan DNA'nın kalitesi metagenomik kütüphane oluşturulmasında çok önemlidir, çünkü istenmeyen dizilerin varlığı oluşturulan metagenomik kütüphanelerde viral DNA'dan elde edilen sonuçları etkileyecek ve ayrıca devam çalışmalarında bu metagenomik kütüphane kullanıldığından sonuçlar bu kütüphaneye göre oluşturulacaktır (Schoenfeld ve ark., 2010).

Büyük insert parçalarından kütüphane oluşturulurken kullanılacak vektör oldukça önemlidir. Shotgun kütüphane oluşturulması ile klonlanan büyük boyuttaki DNA'lar, 3 kb' den kısa boyutlarda temsil edilmekte ve elde edilen çok sayıda kısa dizinin hizalanmasında birçok sorun ortaya çıkarmaktadır. Bu durum da dizi analizi sonrası hatalı veri yorumlamaya neden olmaktadır. Ayrıca viral genomların zayıf promotor içeren ve yüksek kopya sayısı veren vektörlerin kullanımı ile sapma olmadan klonlanması çok zordur. Bu yüzden genellikle transkripsiyon faktörü içermeyen halkasal ya da lineer vektörler tercih edilmektedir (Schoenfeld ve ark., 2010). Metagenomik kütüphane oluştururken fosmid vektör kullanımıyla viral DNA klonlanması ve kütüphane oluşturulması ile bu sorunlar en aza indirgenmektedir. Böylece bu yaklaşım ile, normal genom büyüklüğüne yakın insert taşıyan klonlar oluşturulmakta ve dizileme sonrasında oluşacak çok sayıda kısa dizinin hizalanması sorunu ortadan kaldırılmaktadır (Edwards ve Rohwer, 2005; Santos ve ark., 2007; Santos ve ark., 2010, Rosario

ve Breitbart, 2011). Ayrıca daha hızlı ve kolay iş gücü ile bakteriyal yapay kromozom gibi daha büyük vektörler kullanımı ile klonlama şeklindeki zorlu yöntemlerin üstesinden gelmektedir.

Garcia-Heredi ve arkadaşları (2012), küçük insertlere sahip kütüphane oluşturma ile elde edilen verilerin analizinin zorlaşması nedeniyle çalışmalarında fosmid vektörler kullanarak metagenomik kütüphane oluşturmuşlardır. Bu vektörler aracılığıyla viral DNA'yı normal boyutlarına yakın şekilde klonlayarak çalışmışlardır. Dizi analizi sonrası 42 farklı viral genom elde etmişler ve bunlardan bazılarının hemen hemen tam olduğunu ve baş ve kuyruklu virüsler olan Caudovirales grubuna ait üyeler olduğunu belirlemişleridir. Ortamda *Haloquadratum walsbyi*, *Nanohaloarchaea* ve *Salinibacter ruber* enfekte eden virüslerin varlığını belirlemişlerdir.

Çalışmamızda Tuz Gölü'ndeki halovirüslerin morfolojik ve genom çeşitliliği belirlendikten sonra viral DNA ekstrakte edilmiş ve fosmid vektör kullanımıyla 136 klon içeren metagenomik kütüphane oluşturulmuştur. Elde edilen klonlardan rastgele seçilen 15 klonun vektör taşıyıp taşımadığı kontrol edilmiş ve insert bölgesinin büyüklüğü BamHI restriksiyon enzimi ile kesim yapılarak belirlenmiştir. Ayrıca metagenomik kütüphane dizi analizi için GATC Biotech (Almanya) firmasına gönderilmiştir. Dizi analizinin prensibi, vektörün spesifik geri ve ileri primerleriyle uç kısımlarından dizilenmesi şeklindedir. Restriksiyon enzimi ile kesim sonrası incelenen 12 klonun 29-40 kb arasında çeşitli değerlerde olmak üzere E2 klonunun 16 kb büyüklüğünde insert bölgesi içerdiği görülmüştür. İki klondan kesim sonrası sonuç alınamamış ve kesim reaksiyonunda hata olabileceği tahmin edilmiştir. Kullanılan BamHI enzimi vektörü sadece uç kısımlara yakın iki bölgeden kesmekte ve bu durumda kesim sonrası vektör büyüklüğünün yaklaşık 8.5 kb olması beklenmektedir. Ancak, 8.1 kb büyüklüğündeki pCC2FOS vektörü kesim sonrası yaklaşık 9.4 kb olarak belirlenmiştir. Kesim sonrası yalnızca E3 klonun içerdiği vektör büyüklüğü 8.6 kb olarak belirlenmiştir. Dizi analizi sonuçlarında firmanın uzmanları tarafından vektörün uç kısımlarının modifikasyona uğradığı ve böylece dizi analizi sırasında primerlerin eşleşerek okumayı başlatamadığı belirtilmiştir.

Tuz Gölü'nde viral çeşitlilik farklı amaçlar doğrultusunda çok yönlü yaklaşımlar kullanılarak ilk defa ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Dünya çapındaki birçok farklı hipersalin ortamlarla benzer yapıda olduğu görülmüştür.

Çalışmamızın diğer bir amacı, mikrobiyal çeşitliliği belirlemek ve aktif grubu saptamaktır. Bu amaçla kültür bağımsız çalışmalar olan 16S rRNA geni analizlerine dayalı DGGE ve FISH yöntemleri uygulanmıştır

Genetik parmak izi teknikleri, mikrobiyal komünite içerisindeki genetik çeşitlilik profilini ya da paternini sağlayan yöntemlerdir. Bu parmak izi metodlarından biri olan DGGE, doğal örneklerden ekstrakte edilen DNA' dan ribozomal DNA fragmentlerinin bir kısmının spesifik primerler kullanılarak PCR ile amplifikasyonu ve elde edilen fragmentlerin dizilerininin 'melting' davranışına göre gradient içeren poliakrilamid jel içerisindeki elektroforetik ayırımına dayanmaktadır. Domainler arasındaki dizi değişimleri denatürasyon sıcaklığının farklılığına neden olur ve farklı dizilerdeki moleküllerin göçü jel içerisinde farklı pozisyonlarda durur (Muyzer ve Small, 1998; Muyzer, 1999).

Hipersalin ortamlarda farklı tuzluluğa sahip çevrelerdeki komünite yapısının farklı amaçlar doğrultusunda DGGE yöntemi ile araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır.

Anton ve arkadaşları (2000), %30-37 arasında tuz konsantrasyonuna sahip çok havuzlu solar tuzlulardaki *Bacteria* çeşitliliğini araştırmak amacıyla kullandıkları yöntemlerden biri DGGE' dir. DGGE analizi sonucunda jel profilinde iki bant belirlemişler ve bu bantların dizi analizleri sonucunda *Rhodothermus marinus* olarak saptamışlardır.

Mutlu ve arkadaşları (2008) Tuz Gölü mikrobiyal komünitesini çeşitli moleküler yöntemlerle incelemiş ve bu yöntemler arasından DGGE yöntemini çeşitliliği belirlemek amacıyla kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre arkeal çeşitliliği *Haloquadratum walsbyi*, *Halorubrum orientale* ve *Halorubrum* ırklarının temsil ettiğini saptamışlardır. Ayrıca, *Bacteria* domainini *Salinibacter*

ırkları ve ve bazı çevresel 16S rRNA geninin klonları ile benzerlik gösteren grupların oluşturduğunu belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda Tuz Gölü'nün prokaryotik çeşitlilik açısından farklı solar tuzlalar ile benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Çalışmamızda DGGE analizi ile filogenetik bir marker olan 16S rRNA bölgesi melting domain özelliklerine göre ayrılmış ve *Archaea* ve *Bacteria* gruplarını temsil eden türlerin çeşitliliği incelenmiştir. Dizi analizi sonrasında örneklerin Gen Bankasındaki karşılıklarını belirlemek amacıyla BLAST analizleri gerçekleştirilmiş ve jelde dominant olarak belirlenen bantların farklı *Haloquadratum* strainleri ve *Salinibacter* strainleri olarak sırasıyla *Archaea* ve *Bacteria* domainini temsil ettiği belirlenmiştir.

Archaea çeşitliliği temsilen ayrıca “*Natronomonas moolapensis*” ve “*Halorubrum sp.*” belirlenmiştir. 10A olarak isimlendirilen bandın analizi sonucu “*Natronomonas sp.*” olduğu görülmüştür. Ayrıca 1A, 2A, 6A, 7A ve 8A olarak isimlendirilen bantların dizi analizi sonucu Gen Bankasındaki karşılığının Avustralya, Çin, İspanya gibi farklı bölgelerdeki farklı hipersalin ortamlardan oluşturulmuş 16S rRNA gen kütüphanesindeki kültüre edilmemiş örnekler olduğu görülmüştür.

Bakteriyal çeşitlilik incelendiğinde dizi analizi verilerinin sonucunda örneklerin *Salinibacter* strainlerinin yanı sıra, 1B ve 2B olarak isimlendirilen bantların farklı hipersalin ortamların analizinde oluşturulmuş 16S rRNA geni klon kütüphanelerindeki kültüre edilmemiş örnekler ile benzerlik göstermiştir.

DGGE farklı ortam özellikleri doğrultusundaki komünite yapılarındaki değişikliği incelemede iyi bir yöntem olmasına rağmen, örnekteki toplam hücrelerin en az %0.5-1' inin dizilerinin edilebilirliğini sağlamaktadır (Benlloch ve ark., 2002). Dolayısıyla, bu yöntem klon kütüphanesi kurulumuyla desteklenirse daha kapsamlı sonuçlar ile komünite yapısı hakkındaki bilgiler desteklenebilir. Kültüre edilmemiş klonlar ile eşleşmenin çok sayıda olması ise yaklaşık 1600 baz uzunluğundaki 16S rRNA geninin 500 bazlık bölgesinin çoğaltılarak analizinin yanı sıra, ayrıca 1600 baz uzunluğundaki kısmının da

dizilenmesi gerektiğini göstermektedir. Bu analiz için 16S rRNA geninin klon kütüphanesi kurularak klonların dizilenmesi gerekmektedir.

Diğer yandan yapılan DGGE analizi sonucunda *Haloquadratum*, *Halorubrum* ve *Salinibacter* strainlerinin Tuz Gölündeki saptanan varlığı Mutlu ve arkadaşlarının (2008) sonuçları ile paralellik göstermektedir.

FISH yöntemi su örneğinden nükleik asit ekstraksiyonuna ihtiyaç duymadan kolaylıkla uygulanabilen ve spesifik problemler yardımıyla ortamdaki grupların aktivitesini belirlemeye yarayan bir yöntemdir. Yüksek NaCl konsantrasyonuna sahip hipersalin ortamlar, bakteri sindirimini olmadığı ve genelde yüksek besin içerikli ortamlar olup, bu ortamlarda hücresel yoğunluk 10^7 - 10^8 hücre/ml olarak saptanmıştır (Oren, 2002). Yaptığımız çalışmada, FISH analizinde toplam hücreler DAPI boyama ile saptanmış, *Archaea* hücreleri Arc915, *Bacteria* hücreleri Eub338 problemleri kullanımıyla spesifik olarak saptanarak toplam hücrelere oranları belirlenmiştir. DAPI boyama sonucu toplam hücresel yoğunluk 10^6 hücre/ml olarak belirlenmiştir. Arc915 probu ile hibridizasyon sonucu görüntülenen alanlarda çok sayıda kare şekilli hücreler saptanmış ve rastgele alanlarda yapılan sayım sonucu toplam hücrelerin yaklaşık %54'ünün *Archaea* olduğu saptanmıştır. Eub338 ile hibridizasyon sonucu saptanan bakteri hücreleri sayısı ise 10^4 hücre/ml olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, örnekte hücresel yoğunluğun düşük olduğu ve *Archaea* grubunun daha aktif olduğu saptanmıştır. Mutlu (2006), DAPI boyaması sonucu elde ettiği toplam hücre yoğunluğu yaklaşık 10^7 hücre/ml olmakla birlikte yine *Archaea* grubunun daha aktif olduğu ve populasyonun % 50'sinden fazlasını oluşturduğunu belirlemiştir. Ayrıca bakteriyal çeşitliliğin mevsime göre 10^3 ile 10^5 hücre/ml arasında değiştiğini belirtmiştir. Bu durumda FISH sonucu elde edilen veriler Mutlu (2006)'ya benzerlik göstermektedir.

DGGE ve FISH analizleri sonucu elde edilen verilere göre DGGE jelinde çeşitliliğin fazla olmasına rağmen DAPI boyaması ile toplam hücre sayısının düşük olduğu saptanmıştır. FISH yönteminde 16S rRNA geninin aktivitesinin artması durumunda spesifik prob ile hibridizasyon sonucu artan ışımaya şeklinde ortaya çıkmaktadır. *Bacteria* grubunun DGGE jelinde çeşitlilik gösterdiği fakat

FISH sonucunda prob ile hibridizasyon sonucu ışımının düşük olduğu görülmüş ve bu yüzden çok aktif olmadığı düşünülmüştür. Bunun nedeni, hücre aktif olmasa bile ortamda DNA'sının bulunmasıyla ekstraksiyon sırasında elde edilerek PCR işleminde 16S bölgesinin çoğalmasından dolayı tahmin edilmektedir. Ayrıca, 16S bölgesinin korunmuş olmasına rağmen farklı sayılarda operon içermesi ile oluşan problemlerin etkili olabileceği tahmin edilmiştir. Bazı *Archaea* ve *Bacteria* domianı üyelerinin 16S rRNA operonunda operon heterojenitesi görülmektedir. Bu farklılıklar çevresel ekosistemlerden oluşturulmuş 16S rDNA klon kütüphanelerinde ya da gerçekleştirilen jel elektroforez profillerinde çeşitlilik ile ilgili yorumlarda karışıklıklar meydana getirebilir. 16S rDNA dizisinin belli bir organizmayı ya da bir organizmanın 16S rRNA operonunda bir geni temsil ettiği tam olarak açıklanamayabilir. Böylece 16S bölgesi analizlerinin bazı durumlarda çeşitliliğin fazla tahminine yol açabilir (Wintzingerode ve ark., 1997). Bunun yanı sıra, FISH yöntemiyle *Archaea* çeşitliliğinin incelenmesinde çok sayıdaki kare şekilli hücreler görülmüş ve DGGE sonucu elde edilen bantların BLAST analizleri ile farklı *Haloquadratum* strainleri olarak belirlenmiştir. Böylece kare şeklinde görülen hücrelerin *Haloquadratum* türleri olabileceği ve bu iki yöntem ile arkeal çeşitlilik sonuçlarının paralellik gösterdiği düşünülmektedir.

Mikrobiyal hücrelerin yoğunluğunun belirlendiği DAPI boyama sonucu, prokaryotik yoğunluğun düşük olduğu görülmüştür. Buna göre, yüksek sayıda viral yoğunluğun belirlenmesi ile ortamdaki virüslerin aktif olduğu ve hücreler içerisinde çoğaldıktan sonra bakteriyel ölümlere yol açarak yoğunluğu düşürdüğü tahmin edilmektedir. Virüslerin prokaryotik hücrelere oranı genellikle 3-100 olmakla birlikte, göllerde oldukça yüksek değerler rapor edilmiştir. Zengin besin içeriği olan üretken ekosistemlerde virüslerin mikroorganizmaları enfekte etmesiyle virüslerin metabolik olarak aktif olduğu ve böylece bu oranın yükseldiği görülmüştür. Bu gözlem sonucu, hızlı büyüme ve yüksek üretkenlik sağlayan çevrelerde prokaryotik konak hücrelerin oldukça fazla sayılarda virüs ürettikleri tahmin edilmektedir (Wommack ve Corwell, 2000; Jacquet ve ark., 2010).

Ayrıca çalışmamız sonucunda küresel ve iğ şekilli morfolojilerin çeşitliliğinin büyük kısmını kapsadığının belirlenmesi, prokaryotik çeşitlilik göz

önüne alındığında *Archaea* grubunun daha fazla sayılarda olması ile ilişkilendirilebilir. Küresel morfolojide olan SH1 virüsünün *Halorubrum* strainlerini enfekte edildiği düşünüldüğünde, DGGE sonuçlarında *Halorubrum* straini temsilcisi saptandığından küresel morfolojideki virüslerin SH1 halovirüsü olabileceği düşünülebilir. Santos ve arkadaşlarının (2012) derlemesine göre, Akdeniz solar tuzlarında viral toplulukların araştırılmasında TEM kullanılmış ve *Haloquadratum* hücrelerini enfekte ettiği görülen limon şekilli ve baş ve kuyruk morfolojisindeki virüslere rastlanmıştır. Bu bilgiden yola çıkarak, FISH sonucu kare şekilli hücrelerin görülmesi ile ve DGGE sonucu *Haloquadratum* strainlerinin çeşitliliği temsil ettiğinin belirlenmesi ile ortamdaki limon şekilli ve baş ve kuyruklu yapıdaki virüslerin *Haloquadratum* strainlerini enfekte edebilecek virüsler olduğu düşünülebilir. Baş ve kuyruklu morfolojideki virüsler konak olarak *Bacteria* ya da *Archaea* domaini üyelerini enfekte etmekle birlikte, genellikle *Bacteria* domaini üyelerini enfekte etmektedirler. Çalışmamızda *Bacteria* domaini prokaryotik çeşitliliğinin çok aktif olmadığı belirlenmesi ile bu yapıdaki virüslerinde konaklarına bağlı olarak sayılarının arttıramamış olduğu düşünülebilir. Fakat bütün bu yorumların yapılabilmesi için daha derin analizler yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak,

1. Tuz Gölü'nde halofilik virüslerin varlığı ilk kez gösterilmiş ve komünite analizi kültür bağımsız yaklaşımlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.
2. Viral topluluğun Dünya çapında diğer birçok hipersalin ortam ile benzer yapıda olmasının yanı sıra çeşitliliğin fazla olduğu görülmüştür.
3. Epifluoresan Mikroskopi ile yapılan inceleme sonucunda viral yoğunluk 10^9 VLP/ml olarak belirlenmiştir.
4. Virüs partiküllerinin morfolojik çeşitliliği TEM ile belirlenmiş ve oldukça çeşitli olduğu görülmüştür. Hipersalin ortamlarda baskın olan küresel, iğ şekilli, baş ve kuyruklu morfolojideki halovirüslerin yanı sıra, ayrıca, İspanya'da solar tuzlalar, Büyük Tuz Gölü ve Retba Gölü'nde rastalanan filament şekilli, kın şekilli, filament ve kuyruklu ve farklı kuyruk yapılarına sahip iğ şekilli olmak üzere farklı morfolojilerde

virüslerin olduğu görülmüştür. Kurşun-benzeri morfolojideki virüs partiküllerin hipersalin ortamlarda varlığına ilk defa rastlanmıştır.

5. Viral topluluğun genomik çeşitliliği PFGE analiz edilmiş ve sonuç olarak en dominant bandın yaklaşık 40 kb olmasıyla, 30-40 kb arasında genom büyüklüğünün dominant olduğu ve topluluğun yaklaşık 20 kb büyüklüğünde genom içerdiği belirlenmiştir.
6. Bu çalışmaları desteklemek için mikrobiyal komünite DGGE ve FISH yöntemleriyle incelenmiştir. DGGE ile baskın türlerin *Haloquadratum* strainleri ve *Salinibacter* strainleri olarak sırasıyla *Archaea* ve *Bacteria* domainini temsil ettiği belirlenmiştir. FISH ile toplam hücre sayısının 10^6 hücre/ml olduğu ve %54 ünün *Archaea* olduğu belirlenmiştir. Yüksek sayıda viral yoğunluğun belirlenmesi ile ortamdaki virüslerin aktif olduğu ve hücreler içerisinde çoğaldıktan sonra bakteriyal ölümlere yol açarak yoğunluğu düşürdüğü tahmin edilmiştir. Fakat bu düşünce dizi analizleri ve kültür-bağımlı yöntemler ile analiz edilerek desteklenmelidir.
7. Ortamda yüksek oranda bulunan küresel halovirüslerin bir kısmının SH1 virüsü olabileceği ve DGGE sonucunda *Halorubrum sp.* varlığının belirlenmesiyle bu organizmayı konak olarak kullanabileceği tahmin edilmiştir. Ayrıca baş ve kuyruklu virüslerin toplam çeşitliliğin çok az bir kısmını kapsamasıyla, FISH sonucu *Bacteria* domaininin çok aktif olmamasıyla ilişki olabileceği düşünülmüştür. FISH sonucu kare şekilli hücrelerin görülmesi ile ve DGGE sonucu *Haloquadratum* strainlerinin çeşitliliği temsil ettiğinin belirlenmesi ile ortamdaki limon şekilli ve baş ve kuyruğu yapıdaki virüslerin *Haloquadratum* strainlerini enfekte edebilecek virüsler olduğu düşünülebilir. Fakat bu sonuçlar daha derin analizlerle incelenmelidir.

Bu çalışmanın devamında,

1. Viral toplulukların araştırılmasında diğer çoğu uygulamanın temeli olan metagenomik yaklaşım yeniden uygulanarak, ortamdaki bütün viral DNA'ları içeren metagenomik kütüphane yeniden oluşturulmalıdır.
2. Metagenomik kütüphanenin incelenmesiyle ortamdaki virüsler ve konakları hakkında daha kesin bilgilere ulaşılmalıdır.
3. Metagenomik kütüphane sonucu elde edilen dizi bilgilerine göre spesifik problemler tasarlanıp hibridizasyon ve mikrodizin (microarray) çalışmaları yapılmalıdır.
4. Metagenomik kütüphane sonucu elde edilen veriler ile viral proteinler hakkında elde edilen bilgiler doğrultusunda metatranskriptomik yaklaşım ile viral proteinler ve aktiviteleri hakkında ayrıntılı analizler gerçekleştirilmelidir.
5. Viral morfolojiler cryo-EM ve "Thin-section" elektron mikroskopi yöntemleriyle daha kapsamlı olarak incelenmelidir. Ortamda yoğun olduğu görülen küresel virüslerin kapsid yapısı cryo-EM ile daha ayrıntılı analiz edilmedi. Metatranskriptomik analizleri ile kapsid yapıları desteklenmelidir.
6. Bu kültür-bağımsız yaklaşımların yanı sıra, Tuz Gölü viral çeşitliliği kültür bağımlı yaklaşımlar ile de incelenmeli ve kültür-bağımsız ve kültür-bağımlı analizler sonucu elde edilen bilgiler karşılaştırılmalıdır.
7. Ayrıca gölün viral çeşitliliği farklı mevsimler kapsamında incelenecek ve mevsim değişikliğinin viral komünite ve böylece prokaryotik komünite üzerindeki etkisi araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Aalto, A., Bitto, D., Ravantti, J. J., Bamford, D. H., Huiskonen, J. T. Ve Oksanen, H. (2012), "Snapshot of virus evolution in hypersaline environments from the characterization of a membrane-containing Salisaeta icosahedral phage 1," PNAS, 109(18): 7079–7084.
- Ackermann, H. W. (2009), "Basic Phage Electron Microscopy," Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume1: Isolation, Characterization, and Interactions, vol. 501.
- Amann, R., Fuchs, B. M. ve Behrens, S. (2001), "The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation," Current Opinion in Biotechnology, 12: 231–236.
- Amann, R., Krumholz, L. ve Stahl, D. A. (1990), "Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology," Journal of Bacteriology, 172(2): 762-770.
- Amann, R., Ludwig, W., ve Schleifer, K. H. (1995), "Phylogenetic identification of individual microbial cells without cultivation," Microbiol. Rev. 59: 143-169.
- Angly, F. E., Felts, B., Breitbart, M., Salamonz, P., Edwards, R. A., Carlson, C., Chan, A. M., Haynes, M., Kelley, S., Liu, H., Mahaffy, J. M., Mueller, J. E., Nulton, J., Olson, R., Parson, R., Rayhawk, S., Suttle, C. A., Rohwer, F. (2006), "The Marine Viromes of Four Oceanic Regions," PLoS Biol 4(11): e368. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040368.
- Angly, F.E., Willner, D., Prieto-Davo, A., Edwards, R. A., Schmieder, R. ve ark. (2009), " The GAAS Metagenomic Tool and Its Estimations of Viral and Microbial Average Genome Size in Four Major Biomes," PLoS Comput Biol 5(12): e1000593. doi:10.1371/journal.pcbi.1000593.

- Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F., ve Amann, R.(1999), “Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds,” *Environmental Microbiology*, 1(6): 517-523.
- Anton, J., Rossello-Mora, R., Rodriguez-Valera, F. ve Amann, R. (2000), “Extremely Halophilic *Bacteria* in Crystallizer Ponds from Solar Salterns,” *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7): 3052–3057.
- Atanasova, N. S., Rione, E., Oren, A., Bamford, D. H. ve Oksanen, H. M. (2012), “Global network of specific virus-host interactions in hypersaline environments,” *Environmental Microbiology*, 14(2):426-440
- Bamford, D. H., Ravantti, J. J., Rönholm, G., Laurinavicius, S., Kukkaro, P., Dyall-Smith, M., Somerharju, P., Kalkkinen, N., ve Bamford, J. K. H. (2005), “Constituents of SH1, a Novel Lipid-Containing Virus Infecting the Halophilic Euryarchaeon *Haloarcula hispanica*,” *Journal of Virology*, 79(14): 9097–9107.
- Başbuğ, Y. (1999), “Tuz Gölü’nde Yaşayan *Artemia salina* (L.1758)’in Üreme Özellikleri,” *Tr. J. of Zoology*, 23(2): 635-640.
- Bath, C., Cukalac, T., Porter, K., Dyall-Smith, M. (2006), “His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, Salterprovirus,” *Elsevier*, 350: 228–239.
- Bath, C., Dyall-Smith, M.(1998), “His1, an Archaeal Virus of the *Fuselloviridae* Family That Infects *Haloarcula hispanica*,” *Journal Of Virology*, 72(11): 9392–9395.
- Baxter, B. K., Mangalea M. R., Willcox, S., Sabet, S., Nagoulat, M. N. ve Griffith, J. D. (2011), “Haloviruses of Great Salt Lake:A Model for Understanding Viral Diversity,” *Halophiles and Hypersaline Environments*, DOI 10.1007/978-3-642-20198-1_9.

- Belovsky, G. E., Stephens, D., Perschon, C., Birdsey, P., Paul, D., Naftz, D., Baskin, R., Larson, C., Mellison, C., Luft, J., Mosley, R., Mahon, H., Van Leeuwen, J. ve Allen, V. (2011), “The Great Salt Lake Ecosystem (Utah, USA): long term data and a structural equation approach,” *Ecosphere*, 2(3): Article 33
- Benlloch, S., Lopez-Lopez, A., Casamayor, E. O., Ovreas, L., Goddard, V., Daae, F. L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedros Alio, C. ve Rodriguez-Valera, F. (2002), “Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern,” *Environ. Microbiol.*, 4: 349-360.
- Bettarel, Y., Bouvier, T., Bouvier, C., Carre, C., Desnues, A., Domaizon, I., Jacquet, S., Robin, A., Sime-Ngando, T. (2011), “Ecological traits of planktonic viruses and prokaryotes along a full-salinity gradient,” *FEMS Microbiol Ecol*, 76: 360–372.
- Bexfield, N., Kellam, P. (2011), “ Metagenomics and the molecular identification of novel viruses,” *The Veterinary Journal* 190: 191-198.
- Birbir, M., Çallı, B., Mertoğlu, B., Elevi Bardavid, R., Oren, A., Öğmen, M. N., Ogan, A. (2007), “Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns,” *World J Microbiol Biotechnol*, 23:309–316.
- Birbir, M., Sesal, C. (2003), Extremely Halophilic Bacterial Communities in Şereflikoçhisar Salt Lake, *Turk J. Biol.* 27: 7-22.
- Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J.M., Segall, A. M., Mead, D., Azam, F., ve Rohwer, F. (2002), “Genomic analysis of uncultured marine viral communities,” *PNAS*, 99(22): 14250-14255.
- Brum, J. R. ve Steward, G. R. (2010), “Morphological Characterization of Viruses in the Stratified Water Column of Alkaline, Hypersaline Mono Lake,” *Microb Ecol*, 60: 636–643.

- Burns, D. G., Camakaris, H. M., Janssen, P. H. ve Dyall-Smith, M (2004), “Combined Use of Cultivation-Dependent and Cultivation-Independent Methods Indicates that Members of Most Haloarchaeal Groups in an Australian Crystallizer Pond Are Cultivable,” *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9): 5258–5265.
- Chen, F, Lu, J. R., Binder, B. J, Liu, Y. C., Hodson, R.E (2001), “Application of Digital Image Analysis and Flow Cytometry To Enumerate Marine Viruses Stained with SYBR Gold,” *Applied And Environmental Microbiology* 67: 539–545.
- Cifuentes, A., Anton, J., Benloch, S., Donnelly, A., Herbert, R. A. ve Rodriguez Valera, F. (2000), “Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments,”. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1715-1719.
- Delwart, E. L. (2007), “Viral metagenomics,” *Rev. Med. Virol.*, 17: 115–131.
- Diez, B., Anton, J., Guixa-Boixereu, N., Pedros-Alio, C., Rodriguez-Valera, F. (2000), “Pulsed-field gel electrophoresis analysis of virus assemblages present in a hypersaline environment,” *Internatl Microbiol* 3:159–164.
- Dyall-Smith, M. (2004), *Halohandbook*, www.microbiol.unimelb.edu.au / staff/mds/ HaloHandbook.
- Dyall-Smith, M., Tang, S. L., Bath, C. (2003), “Haloarchaeal viruses: how diverse are they?,” *Research in Microbiology* 154: 309–313.
- Edwards, R. A. ve Rohwer, F. (2005), “Viral metagenomics,” *Nature*,3: 504.
- Elevi Bardavid, R., Mana, L., Oren, A. (2007), “*Haloplanus natans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic, gas-vacuolate archaeon isolated from Dead Sea–Red Sea water mixtures in experimental outdoor ponds,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 780–783.
- Filippini, M ve Middelboe, M. (2007), “Viral abundance and genome size distribution in the sediment and water column of marine and freshwater ecosystems,” *FEMS Microbiol Ecol* 60: 397–410.

- Fuchs, B. M., Glöckner, F. O., Wulf, J., Amann, R. (2000), “Unlabeled Helper Oligonucleotides Increase the In Situ Accessibility to 16S rRNA of Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes,” *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8): 3603-3607.
- Garcia-Heredia, I., Martin-Cuadrado, A-B., Mojica, F. J. M., Santos, F., Mira, A., Anton, J., Rodriguez-Valera, F. (2012), “ Reconstructing Viral Genomes from the Environment Using Fosmid Clones: The Case of Haloviruses,” *PLoS ONE* 7(3): e33802. doi:10.1371/journal.pone.0033802
- Guixa-Boixareu, N., Calderon-Paz, J. I., Heldal, M., Bratbak, G., Pedros-Alio, C. (1996), “Viral lysis and bacterivory as prokaryotic loss factors along a salinity gradient,” *Aquat Microb Ecol*, 11:215-227.
- Hennes, K., ve Suttle C. A. (1995), “Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy,” *Limnol. Oceanogr.*, 40(6): 1050-1055.
- Hermes, K. P, Suttle, C. A.(1995), “Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy,” *Limnol. Oceanogr.*, 40(6): 1050-1055.
- Jacquet, S., Miki, T.,Noble, R.,Peduzzi, P., Wilhelm, S. (2010), “Viruses in aquatic ecosystems: important advancements of the last 20 years and prospects for the future in the field of microbial oceanography and limnology,” *Advances in Oceanography and Limnology*, 1(1): 97–141.
- Jiang, S., Steward, G., Jellison, R., Chu, W., ve Choi, S. (2003), “Abundance, Distribution, and Diversity of Viruses in Alkaline, Hypersaline Mono Lake, California,” *Microbial Ecology*, Volume 47, 9–17.
- Jones, F. B., Naftz, L. D., Spencer, J. R., Oviatt, G. C. (2009), “Geochemical Evolution of Great Salt Lake, Utah, USA,” *Aquat Geochem.*, 15:95–121

- Kallı, N. (2000), Tuz Gölü'nden İzole Edilen Aşırı Halofilik Bakterilerin İzolasyon ve İdentifikasyonlarının Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kavurmacı, M., Altaş, L., Kuraç, Y., Işık, M., Elhatip, H. (2010), "Tuz Gölü'nün Aksaray İli Yeraltı Sularına Etkisinin Coğrafi Bilgi Sistemi Kullanılarak Değerlendirilmesi," *Ekoloji* 19(77): 29-34.
- Kılıç, A. M. ve Uyanık, E. (2001), "Tuz Gölü'nde Oluşan Kirlenmenin Göl Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması," 4.Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu 118-19 Ekim 2001, İzmir, Türkiye.
- Krupovic, M., Prangishvili, D., Hendrix, R. W. Ve Bamford, D. H. (2011), "Genomics of Bacterial and Archaeal Viruses: Dynamics within the Prokaryotic Virosphere," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(4): 610-635.
- Kukkaro, P (2008), Characterization of New viruses from hypersaline environments, Akademik Tez, University of Helsinki, Faculty of Biosciences, Helsinki.
- Le Romancer, M., Gaillard, M., Geslin, C., Prieur, D. (2007), "Viruses in extreme environments," *Rev Environ Sci Biotechnol*, 6:17–31.
- Mutlu, M. B. (2006), Tuz Gölü Bakterilerinin Karakterizasyonu ve Mevsimsel Dağılımı, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir
- Mutlu, M. B., Martinez-Garcia, M., Santos, F., Pena, A., Güven, K. ve Anton, J. (2008), "Prokaryotic diversity Tuz Lake, a hypersaline environment in Inland Turkey," *FEMS Microbiol Ecol.*, 65(3): 474-483
- Muyzer, G (1999), "Genetic fingerprinting of microbial communities –present status and future perspectives," *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

- Muyzer, G, Hottentrager, S., Teske, A. ve Wawer, C. (1996), “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rDNA- A New Molecular Approach to Analyze the Genetic Diversity of Microbial Communities,” *Mol, Microb. Ecol. Manual*, 3.4.4: 1-23
- Muyzer, G. ve Smalla, K. (1998), “Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology,” *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127–141.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. ve Uittierlinden A. G. (1993), “Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA,” *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3): 695-700.
- National Research Council (2007), “The New Science of Metagenomics, Revealing the Secrets of Our Microbial Planet, 3. Bölüm, “Viral Metagenomics,” *International Standard Book Number-13: 978-0-309-10676-4*.
- Nogales, B., Moore, E. R., Abraham, W. R. ve Timmis, K.N. (1999), “Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenylpolluted moorland soil,” *Environ. Microbiol.* 1: 199-212.
- Oren, A. (1999), “Microbiological studies in the Dead Sea: future challenges toward the understanding of life at the limit of salt concentrations,” *Hydrobiologia*, 405: 1–9.
- Oren, A. (2002), “Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria,” *FEMS Microbiology Ecology*: 39: 1-7
- Oren, A. (2008), “Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity,” *Saline Systems*, 4:2.
- Oren, A., Bratbak, G., Heldal, M. (1997), “Occurrence of virus-like particles in Dead Sea,” *Extremophiles*, 1: 143-149.

- Ortmann, A. C. ve Suttle, C. A. (2009), "Determination of Virus Abundance by Epifluorescence Microscopy," *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume1: Isolation, Characterization, and Interactions, vol. 501.
- Park, S. J., Kang, C. H., Chae, J. C. ve Rhee, S. K. (2008), "Metagenome microarray for screening of fosmid clones containing specific genes," *FEMS Microbiol Lett*, 284: 28–34.
- Patel, A., Noble, R. T., Steele J. A., Schwalbach, M. S., Hewson, I.,Fuhrman, J.A., (2007), "Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I," *Nature Protocols*, 2(2)
- Paul, J. H. ve Sullivan, M. B. (2005), "Marine phage genomics: what have we learned?," *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 299–307.
- Pei, A. Y., Oberdorf, W. E., Nossa, C. V., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E. A., Jin, Z., Lee, P., Yang, L., Poles, M., Brown, S. M., Sotero, S., DeSantis, T., Brodie, E., Nelson, K. ve Pei, Z. (2010), "Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes," *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12): 3886–3897.
- Pernthaler, A. ve Amann, R.(2004), "Simultaneous Fluorescence In Situ Hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria," *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9): 5426–5433.
- Pietila, M. K., Roine, E., Paulin, L., Kalkkinen, N., ve Bamford, D. H. (2009), "An ssDNA virus infecting archaea:a new lineage of viruses with a membrane envelope," *Mol Microbiol*, 72: 307-319
- Pina, M., Bize, A., Forterre, P., Prangishvili, D. (2011), "The archeoviruses," *FEMS Microbiol Rev* 35: 1035–1054.

- Porter, K., Kukkaro, P., Bamford, J. K. H., Bath, C., Kivel, H. M., Dyll-Smith, M. L., Bamford, D. H. (2005), "SH1: A novel, spherical halovirus isolated from an Australian hypersaline lake," Elsevier Virology 335 : 22–33.
- Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. ve Imhoff, J. F. (1985), "Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern," Microb.Ecol, 11: 107-115.
- Rohwer, R. ve Edwards, R (2002), ".The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy for Phage," Journal of Bacteriology, 184(16): 4529–4535.
- Roine, E. ve Oksanen, H. M. (2011), "Viruses from the Hypersaline Environment," Halophiles and Hypersaline Environments, DOI.10.1007/978-3-642-20198-1.
- Roine, E., Kukkaro, P., Paulin, L., Laurinavicus, S., Domanska, A., Somerharju, P., ve Bamford, D. H. (2010), "New, closely related haloarchaeal viral elements with different nucleic acid types," J Virol 84: 3682-3689.
- Roingard, P. (2008), "Viral detection by electron microscopy: past, present and future," Biol. Cell, 100: 491–501.
- Rosario, K. ve Breitbart, M. (2011), "Exploring the viral world through metagenomics," Current Opinion in Virology, 1:289–297.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T. (1989), "Molecular cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandaa R. A., Skjoldal, E. F., Bratbak, G. (2003), " Virioplankton community structure along a salinity gradient in a solar saltern," Extremophiles 7:347–351.
- Sandaa, R. A., Short, S. M., Schroeder, D. C.(2009), "Fingerprinting aquatic virus communities," *MAVE*, Chapter 2: 9–18.

- Santos, F., Meyerdierks, A., Pena, A., Rossello-Mora, R., Amann R. ve Anton, J. (2007), “Metagenomic approach to the study of halophages: the environmental halophage,” *Environmental Microbiology*, 9(7): 1711–1723.
- Santos, F., Yarza, P., Parro, V., Briones, C. ve Anton, J. (2010), “The metavirome of a hypersaline environment,” *Environmental Microbiology*, 12(11): 2965-2976.
- Santos, F., Yarza, P., Parro, V., Meseguer, I., Rossello-Mora, R. ve Anton, J. (2012), “Culture-Independent Approaches for Studying Viruses from Hypersaline Environments,” *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6): 1635–1643
- Schoenfeld, T., Liles, M., Wommack, K. E., Polson S. W., Godiska, R. ve Mead, D. (2010), “Functional viral metagenomics and the next generation of molecular tools,” *Trends Microbiol.*, 18(1):20.
- Sime-Ngando, T., Lucas, S., Robin, A., Tucker, K. P., Colombet, J., Bettarel, Y., Desmond, E., Gribaldo, S., Forterre, P., Breitbart, M. ve Prangishvili, D. (2010), “Diversity of virus–host systems in hypersaline Lake Retba, Senegal,” *Environmental Microbiology*, doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02323.x
- Spratt, D. A. (2004), “Significance of bacterial identification by molecular biology methods,” *Endodontic Topics*, 9: 5–14.
- Suttle, C. (2007), “Marine viruses — major players in the global ecosystem” *nature reviews microbiology* doi:10.1038/nrmicro1750.
- Suttle, C., Fuhrman, J. A. (2010), “Enumeration of virus particles in aquatic or sediment samples by epifluorescence microscopy,” *MAVE Chapter 15*: 145–153.
- Taher, A. G. (1999), “Inland saline lakes of Wadi El Natrun depression, Egypt,” *International Journal of Salt Lake Research*, 8: 149-169.

- Uygun, A., Şen, E. (1978), “Tuz Gölü Havzası ve Doğal Kaynakları I: Tuz Gölü Suyunun Jeokimyası.” Türkiye Jeoloji Kurumu Bülteni, 21: 113-120.
- Van den Burg, B. (2003), “Extremophiles as a source of novel enzymes,” Elsevier, 6(3): 213-218.
- Vanhoutte, L. T., Huys, D., Cranenbrouck, I. S. (2005), “Exploring microbial ecosystems with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis,” Belgian Co-Ordinated Collections of Microorganisms, <http://bccm.belspo.be/newsletter/17-05/bccm02.html>
- Ventosa, A. (2006), “Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments,” SGM symposium 66: Prokaryotic diversity – mechanisms and significance.
- Ventosa, A., Arahall, D. R. (2009), “Physico-Chemical Characteristics of Hypersaline Environments and Their Biodiversity”, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) Extremophiles, 2: 247-263.
- Weinbauer, M. G. (2004), “Ecology of prokaryotic viruses,” FEMS Microbiology Reviews 28: 127–181.
- Wen, K., Ortmann, A. C., Suttle, C. A. (2004), “Accurate Estimation of Viral Abundance by Epifluorescence Microscopy,” Applied and Environmental Microbiology, 70(7): 3862–3867.
- Wintzingerode, F., Göbel, U. B., Stackebrandt, E. (1997), “Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis,” FEMS Microbiology Reviews 21: 213-229.
- Wommack, K. E., Colwell, R. R. (2000), “Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems,” Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(1): 69–114.

- Wommack, K. E, Williamson, K. E, Helton, R. R, Bench, S. R, Winget, D. M (2009), "Methods for the Isolation of Viruses from Environmental Samples," Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, 501. DOI 10.1007/978-1-60327-164-6 1.
- Yaşar İ., Kahraman Ö. Tekin E., Koçyiğit, A. (2008), "Çamaltı Tuzlasından Ekstrem Halofilik Archaea İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu," E.Ü. Su Ürünleri Dergisi Sayı (2):117–121.