

*Biology Article*  
/  
*Biyoloji Makalesi*



**Review Paper / Derleme Makalesi**

**SOME MOLECULAR TECHNIQUES APPLIED in DETERMINATION of ENVIRONMENTAL MICROBIAL DIVERSITY**

**Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR \***

*İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Fatih-İSTANBUL*

**Received/Geliş: 12.11.2014 Revised/Düzelme: 10.12.2014 Accepted/Kabul: 23.12.2014**

---

**ABSTRACT**

The most important questions to be answered in the studies regarding the diversity of microorganisms in natural ecosystems are the functions of bacterial communities and how the compositions of these communities are affected by environmental changes. In order to answer these questions, there needs to be conducted advanced studies concerning the community structure. The total bacteria community studies require a huge amount of genetic data and high range of genetic diversity. Molecular techniques are quite valuable in researching the structure and diversity of bacterial communities. To combine various complementary molecular techniques is a nice strategy to keep track of microbial community changes in natural ecosystems. Combining some commonly-used techniques, i.e. polymerase chain reaction (PCR), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), molecular cloning and fluorescence in situ hybridization (FISH), this review evaluates the advantages of using these techniques together in determining microbial diversity in environmental samples.

**Keywords:** Environmental samples, molecular techniques, microbial diversity.

**DOĞAL ÇEVRELERDEKİ MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ İÇİN KULLANILAN BAZI MOLEKÜLER TEKNİKLER**

**ÖZET**

Doğal ekosistemlerdeki mikroorganizma biyoçeşitliliği ile ilgili çalışmalarda ele alınması gereken en önemli sorular bakteriyal komünitelerin fonksiyonları ve çevresel değişimlerden komünite kompozisyonlarının nasıl etkilendiğidir. Bu soruları cevaplamak için, komünite yapısı ile ilgili ileri çalışmalar gerekmektedir. Total bakteri komünite çalışmaları, çok miktarda genetik bilgi ve yüksek genetik çeşitlilik içermektedir. Moleküler yöntemler, bakteriyal komünitelerin yapılarını ve çeşitliliklerini araştırmak için oldukça değerli araçlardır. Birbirini tamamlayan farklı moleküler yöntemlerin kombinasyonu, doğal ekosistemlerde mikrobiyal komünite değişikliklerini izlemek için oldukça iyi bir stratejidir. Bu derleme günümüzde kullanılmakta olan, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), denatüran jel elektroforezi (DGGE), moleküler klonlama ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemlerinin birlikte kullanılarak çevresel örneklerdeki mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi ve bu yöntemlerin birlikte kullanılmasındaki avantajları değerlendirmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Çevresel örnekler, moleküler teknikler, mikrobiyal çeşitlilik.

---

\* e-mail/e-ileti: nihaldogruoz@gmail.com, tel: (212) 455 57 00 / 15067

## 1. GİRİŞ

Çoğu mikroorganizmanın kültürünün yapılmasındaki zorluklar mikrobiyal ekosistem çalışmalarını sınırlandırır. Moleküler yöntemler, bakteriyal komünitelerin yapılarını ve çeşitliliklerini araştırmak için oldukça değerli araçlardır. Bu teknikler hem kültüre edilebilen hem de kültüre edilemeyen mikroorganizmalar için kullanılabilir. Kültür bağımsız teknikler, çevresel örneklerden elde edilen nükleik asit ekstraksiyonunu temel alır ve komünite yapı ve çeşitliliği hakkında bilgi sağlar. Birbirini tamamlayan farklı yöntemlerin kombinasyonu, doğal ekosistemlerde mikrobiyal komünite değişikliklerini izlemek için oldukça iyi bir stratejidir.

Bu çalışma, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), denatüran jel elektroforezi (DGGE), moleküler klonlama ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemlerinin birlikte kullanılarak alınan çevresel örneklerin mikrobiyal çeşitliliği bakımından değerlendirilmesi ve bu yöntemlerin beraber kullanılmasındaki avantajları değerlendirmektedir.

## 2. MİKROBİYAL EKOLOJİ ÇALIŞMALARINDA NEDEN MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILMAKTADIR?

Doğal ekosistemlerdeki mikroorganizmalar hakkındaki bilgilerimiz sınırlıdır. Ayrıca doğadaki mikrobiyal çeşitliliğin çalışılması da oldukça zordur. Buralardaki mikroorganizmalar yüksek çeşitlilikte olmasına rağmen mikroorganizmaların binlercesi henüz tanımlanmamıştır [1].

Çevresel örneklerdeki mikroorganizmaların çoğunluğu standart prosedürlerin kullanılması ile kültüre edilemezler. Kültür temelli yöntemler mikroorganizmaların biyoçeşitliliği hakkında sınırlı bilgi sağladığı için, moleküler yöntemler mikrobiyal komünite analizleri için temel araçlardır [2].

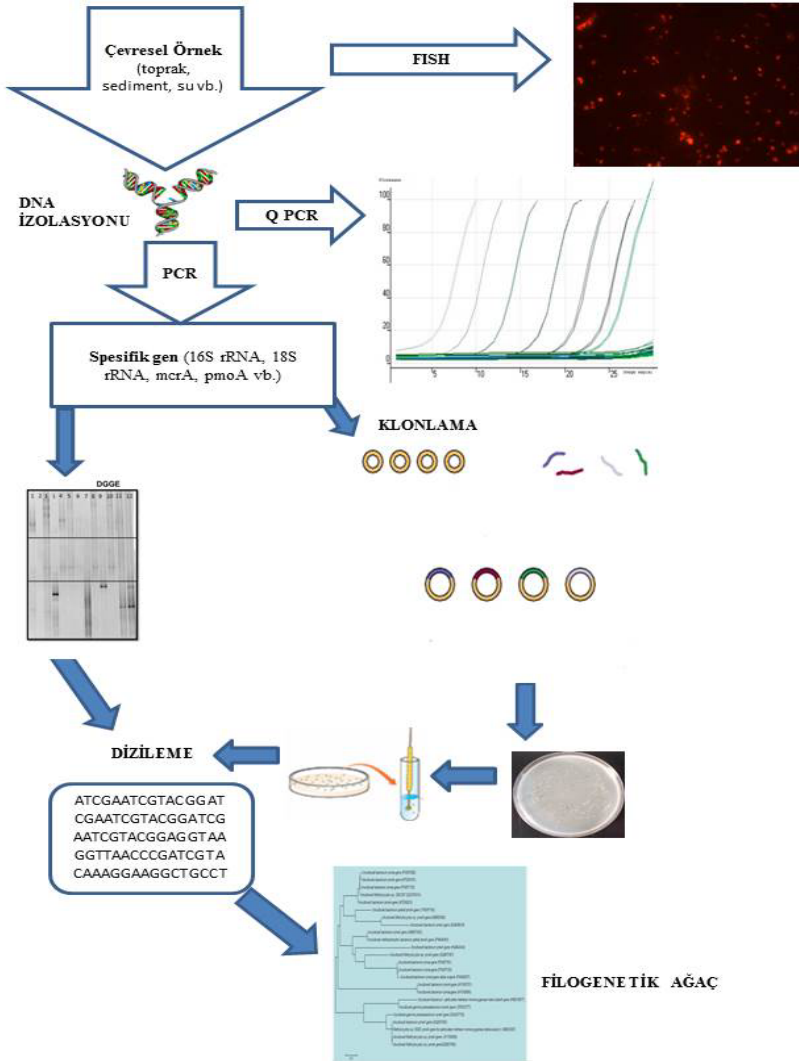
Kültür temelli yöntemler mikroorganizmaların saptanmasında ve tanımlanmasında hâlâ kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar, izole edilen organizmanın fizyolojik ve biyokimyasal potansiyellerinin anlaşılması için güçlü bir araç olsa da kompleks mikrobiyal komünitelerin çeşitliliği hakkında bilgi sağlayamaz. Geleneksel kültür temelli yöntemler standart laboratuvar koşulları altında sadece canlı ve kültüre edilebilir organizmaların izolasyonuna izin verir ki bu değer doğal çevrelerde var olan mikroorganizmaların sadece % 0.1-1'ini karşılar [3]. Mikroorganizmaların %99'unun kültüre edilememesi, henüz o organizmaların gelişme koşulları için gerekli şartları bilmediğimiz/sağlayamadığımız içindir. Ancak bu gerekli koşulların ileriki zamanlarda sağlayamayacağı anlamına da gelmemektedir.

Bakteriyal komünitenin sadece küçük bir kısmı kültüre edilebildiği için, kısıtlı bir bölümü tam olarak karakterize edilmekte ve isimlendirilmektedir. Ayrıca, kültüre edilebilen organizmalar için sınıflandırmanın doğruluğu ve geçerliliği sıklıkla sorgulanmaktadır. Hücre şekli, hücre duvarı, hareket, flagella, Gram boyanma özelliği gibi morfolojik özellikler, mikroorganizmaların ayrıntılı sınıflandırılmaları için yeterli olmayabilir. Moleküler ve kimyasal yöntemlerdeki gelişmeler organizmaları izole etmeden mikrobiyolojik çeşitliliği tahmin etmemizi sağlayan bir alternatif oluşturmuştur [4].

## 3. ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEKİ MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi hedeflenen çevresel örneklerden (sediment, toprak, su vb.) bakteri izolasyonu için, klasik kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Fakat yukarıda da belirtildiği gibi örnekteki mikrobiyal çeşitliliğin sadece çok küçük bir kısmı elde edilebilir. Klasik yöntemlerin yanında, moleküler yöntemleri de kullandığımızda araştırılan ortamdaki mikrobiyal çeşitliliğin büyük fotoğrafı görülebilir [5,6]. Çoğu moleküler strateji, DNA parçalarının çok sayıda kopyasını elde etmek için spesifik hedef genlerin (rRNA genleri) PCR çoğaltımına dayanır [7]. Bu genlerin varlığı, elde edilen örnekteki biyoçeşitliliğinin bir ölçüsüdür. Çünkü spesifik genler genellikle spesifik organizmalar (örneğin pmoA geni metan okside eden

bakterilere, *mcrA* geni metan üreten arkelere spesifiktir) ile bağlantılıdır [8,9]. Spesifik genin örnekte tanımlanması organizmanın varlığına kanıttır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), denatüran jel elektroforezi (DGGE), moleküler klonlama ve DNA dizileme mikrobiyal topluluk analizinde kullanılan temel yöntemlerdir. Bu yöntemlerin yanında Gerçek zamanlı kantitatif PCR (Q-PCR) kullanımı ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi de elde ettiğimiz bilgileri zenginleştirir ve sonuçları daha doğru yorumlamamızı sağlar.



Şekil 1. Çevresel örneklerin mikrobiyal çeşitliliğini araştırırken kullanılan ve birbirini tamamlayan bazı moleküler yöntemler

#### 4. MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİ BELİRLEMEDE KULLANILAN BAZI TEMEL YÖNTEMLER

Bir örnekten DNA izolasyonu, kompleks bir ekosistemdeki mikroorganizmaların moleküler yöntemler kullanılarak saptanması ve tanımlanması için çoğunlukla ilk basamaktır [10]. DNA izolasyonunun ilk aşaması hücre lizisidir. İkinci aşaması ise enzimatik ya da kimyasal yöntemlerle protein, RNA ve makromoleküllerin DNA'dan uzaklaştırılmasıdır [11]. Çevresel bir örnekten (sediment, toprak, su vb.) yüksek oranda DNA elde etmek için ticari kitler kullanılabilir gibi klasik DNA izolasyon yöntemleri de kullanılmaktadır. Burada önemli olan yüksek oranda saf DNA eldesinin sağlanmasıdır. Bu amaçla DNA izolasyonu esnasında kullanılan bazı cihazların (hücrelerin parçalanmasına yardımcı olan) eldesi, çalışmanın güvenilirliğini de arttıracaktır. Bunun yanında, kullanılan yöntemlerde modifikasyon ve/veya optimizasyon yapılmalıdır. Ticari kitler tercih edilirken çalışılacak örnek toprak olmasa da toprak izolasyon kitlerinin seçilmesi, yüksek oranda saf DNA eldesini sağlayabilmektedir. Sonunda elde edilen DNA, örnekte var olan tüm mikroorganizmalardan elde edilen karışık genomik DNA'dır.

##### 4.1. PCR

PCR, bakteri, arke, mantar, protozoon, virüs gibi mikroorganizmalara ait hedef nükleik asit zincirlerinin *in vitro* koşullarda, özgün primerler ile ısıya dayanıklı enzimleri kullanarak programlanabilir ısı döngü cihazları ile çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir [12].

PCR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır.

- i) Denatürasyon: Çift sarmal DNA'nın yüksek sıcaklıkta (94°C-96°C) çözülerek (DNA'da ki tamamlayıcı bazlar arasındaki hidrojen bağlarının kopmasıyla) tek sarmal haline gelmesi.
- ii) Bağlanma (annealing): Primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin, tek iplikli hale gelen DNA'ya uygun sıcaklıkta (37°C -65°C) spesifik olarak bağlanması.
- iii) Uzama (extension): Mg<sup>2+</sup> iyonlarının varlığında, 72°C'de, yüksek sıcaklığa dayanabilen polimeraz enzimi ile primerlere nükleotid eklenmesi ve çift iplikli DNA'nın sentezlenmesi.

PCR'nin her bir döngüsü bu basamakları içerir. Her döngü sonunda PCR ürünleri iki katına çıkar. Sonuçta bir genin tek kopyasından milyonlarca kopya yapılabilir. Çalışmalarda hedef gen, genellikle prokaryotlar için 16S rRNA ve ökaryotlar için ise 18S rRNA'yı kodlayan genlerdir [7,13]. Bu sayede çalışılan örnekten elde edilen karışık genomik DNA içinde mikroorganizma varlığı ve temel çeşitlilik saptanmış olur. Bunun yanı sıra, çoğaltılan bu genlerinin dizi analizleri mikrobiyal topluluğun filogenetik ağacını ortaya çıkarır.

Bu genlerin, altın standart olarak kabul görmesi ve çevresel örneklerdeki mikroorganizma çeşitliliğini ortaya çıkarmak için yaygın olarak kullanılma nedenleri şunlardır [14]:

- i) Tüm prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda bulunmaktadır.
- ii) Yeterli büyüklükte ve işlevsel olarak sabittir.
- iii) Tüm hücrelerde hem yüksek düzeyde korunmuş hem de değişken çok sayıda bölgeye sahiptirler.

Çalışmalarda özel spesifik mikroorganizma genleri de kullanılmaktadır (pmoA geni, mcrA geni, dsrA geni, amoA geni vs.). Burada dikkat edilmesi gereken kullanılacak primerlerin spesifik olmasıdır [8,9,15,16]. Çevresel örneklerin mikrobiyal analizinde primer dizaynı doğru sonuçların elde edilmesinde anahtar bir role sahiptir. Ancak çalışılacak spesifik mikroorganizma örnekte oldukça az olabilir. Dolayısıyla, analizler sonucunda veri elde edilemeyebilir. Bunun engellenmesi ve çalışmanın sağlıklı olması için ayrıca kültür zenginleştirme tekniği uygulanmalıdır. Zenginleştirme kültüründe istenen mikroorganizmanın çoğalması sağlanabilmektedir. Ardından yapılan DNA izolasyonu, PCR, DGGE ve klonlama sonucunda

direkt örnekte saptanamayan mikroorganizma saptanabilir ve araştırdığımız spesifik mikroorganizmanın hangi tür/türlerinin çalışılan örnekte bulunduğu tespit edilebilir.

#### **4.2. Denatüran Gradyent Jel Elektrofrezisi (DGGE)**

DGGE, mikrobiyal ekoloji çalışmalarında çok yaygın olarak kullanılan, aynı boyutta ancak farklı nükleotid dizilimlerine sahip çift zincirli DNA moleküllerini ayıran elektroforetik bir yöntemdir. DGGE’de PCR ile çoğaltılan belirteç gen ürünleri (16S rRNA ya da 18S rRNA genleri), üre ve formamid gibi denatüre edici ajanların varlığında ve giderek dereceli artan bir konsantrasyona sahip poliakrilamid jel içinde elektriksel alana maruz bırakıldıklarında ayrışırlar. Çift sarmalın birbirinden ayrılmasıdaki farklılıklar, baz dizilerindeki farklılıklardan kaynaklanır. Yarı ayrılmış DNA molekülünün jel üzerindeki hareket kabiliyeti büyük oranda azalır sonunda da durur. Çift zincirli DNA parçalarının birbirinden ayrılmasını önlemek için GC kuyrukları eklenmiş primerler kullanılır. Böylece DNA molekülü tamamen açılıp jelden çıkmaz. DNA parçalarının görünür hale geçmesi, jelin uygun DNA boyası (Etidyum bromür, SYBR Green vs.) ve uygun tampon çözeltisinde bekletilmesi ile sağlanır [17,18].

DGGE’nin temel basamakları şunlardır [10]:

- i) Çevresel örneklerden nükleik asit (DNA veya RNA) izolasyonu
- ii) İstenen gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması
- iii) DGGE ile PCR ürünlerinin ayrıştırılması ve görüntülenmesi
- iv) Dizi Analizi ve belirlenen dizilerin gen bankalarındaki diziler ile karşılaştırılması.

DGGE jelde görüntülenen bantlar, baz dizileri değişen bir genin farklı formlarıdır. Yani DGGE jeli üzerindeki bantlar, çalışılan örnekteki biyoçeşitliliği gözler önüne serer. Bantların miktarı, örnekteki baskın türleri ifade eder.

DGGE yöntemini çevresel örnekler üzerinde ilk kez kullanan kişi Gerard Muyzer’dir [10]. Çevresel örneklerde kullanılmasının çeşitli avantajları vardır. Bu avantajlardan biri çok sayıda örneğin tek jel üzerinde çalışılarak mikrobiyal çeşitlilik analizinin yapılması ve baskın türlerin belirlenmesidir. DGGE’nin bu özelliği sayesinde hem zaman kazanılır hem de farklı koşullardaki ve/veya farklı çevrelerdeki mikrobiyal çeşitliliğin karşılaştırılması sağlanır. Jeldeki bantların kalınlıkları DNA miktarı hakkında bilgi verir. Bu yöntemin tek baz değişimlerine bile hassas olması mikrobiyal çeşitliliğin net bir şekilde ortaya konmasına neden olur. Ayrıca jeldeki bantların kesilerek dizi analizinin yapılmasına imkan vermesi DGGE yönteminin önemli avantajlarından biridir. Fakat, DGGE yönteminde jel üzerinde görünen bir bant her zaman bir DNA dizisini vermeyebilir. Jel görüntülenirken UV, DNA ya zarar verdiği için bantların kesimi ve dizilenmesinde doğru sonuca ulaşamayabilir. Jeldeki bantların ışıması kısa sürede kaybolduğundan baskın olmayan türlerin kaybı söz konusudur. Jel üzerindeki yakın bantların düzgün şekilde kesilmesi zordur. DGGE yöntemi çevresel örnekteki, mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesinde genel bir resmi ortaya koyması bakımından oldukça önemli bir yöntemdir. Ancak DGGE’nin yukarıda sayılan dezavantajları göz önüne alındığında mikrobiyal çeşitlilik hakkında çok detaylı bilgi vermediği söylenebilir. Daha detaylı bilgileri klonlama ile elde edebiliriz. Ancak genel ve ayrıntılı resmin ortaya konması için DGGE ve klonlama yöntemlerinin beraber kullanılmaları önemlidir.

#### **4.3. Klonlama**

Bir genin kopyasını yapma işlemidir. İstenilen gen, DNA taşıyıcı birimi denilen vektörler ile konak hücreye yerleştirilir ve çoğaltılır. Bu sayede genler ayrıntılı olarak incelenebilir. Dolayısı ile bir çevresel örnekte elde edilen karışık genomik DNA’da hangi mikroorganizmaların bulunduğu belirlenebilir.

Klonlamanın aşamaları şöyledir [19,20]:

- i) DNA'nın izole edilmesi PCR ile çoğaltılması
- ii) DNA'nın uygun vektörlere eklenmesi
- iii) Uygun konak hücreler içinde istenen DNA'nın klonlanması yani transformasyonu
- iv) Klon kütüphanesinin taraması
- v) Biyoinformatik analizi

Kopyalamak istediğimiz ve PCR ile çoğaltılan DNA parçası, genellikle bir plazmid vektöre ligasyon işlemiyle eklenir. Ligasyon iki DNA molekülünün uçlarının birleştirilmesi işlemidir. Dışardan eklenen DNA'yı (veya geni) içeren plazmid rekombinant DNA olarak isimlendirilir. Oluşturulan rekombinant plazmidler bakteri kültürüne eklenir. Ardından konakçı hücreler dış ortamdaki DNA moleküllerini hücre içine alırlar. Konakçı hücrenin her bölünmesinde klonlanan genler de çoğalır.

Plazmid vektörler, konakçı hücreye yerleştirildiklerinde, klonlanan hücrelerin seçici ortamlarda belirlenmesini sağlayan işaretleyicileri vardır. Mavi-beyaz seçimi olarak adlandırılan teknik, klonlanan hücrelerin seçiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teknikte klonlanmak istenen DNA, vektörün *lacZ* geninde bulunan restriksiyon bölgesine eklenir. Böylece *lacZ* geninin bütünlüğü eklenen DNA ile bozulur ve  $\beta$ -galaktosidaz olarak isimlendirilen enzimi kodlayamaz.  $\beta$ -galaktosidaz enzimi, laktozu, glikoz ve galaktoza parçalama özelliğine sahiptir. Klonlama sonunda örnek, ampisilin içeren bir besiyerine ekilir. Plazmit içermeyen bakteri ampisilin direnç geni içermediği için besiyerinde üremez. Ancak sadece bu basamak rekombinat plazmit seçimi için yeterli değildir. Rekombinant plazmit içeren bakteriyi ayırt etmek için besiyerinin, antibiyotik dışında renk oluşturan ve  $\beta$ -galaktosidaz tarafından parçalanabilen X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) olarak adlandırılan bir substrat içermesi gerekir. X-gal, laktoza benzer ve  $\beta$ -galaktosidaz tarafından parçalandığında mavi renge dönüşür. Sonuçta rekombinant plazmit içermeyen bakteriler *lacZ* genini bütünsel olarak taşıdığından  $\beta$ -galaktosidaz üretirler ve besiyerindeki X-gal parçalandığı için koloniler maviye dönüşürler. Rekombinant plazmit içeren bakterilerde ise işlevsel *lacZ* geni olmadığı için  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üretmezler ve besiyeri üzerindeki koloniler beyaz renkte kalırlar. Klonlama işleminin başarılı olduğu koloniler beyaz kolonilerdir. Seçilen beyaz kolonilerin plazmit izolasyonu ve sonra dizi analizi yapılır [21,22]. Klonlama mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan en güvenilir yöntemdir. Bu yöntemle hem kültüre edilen hem kültüre edilemeyen mikroorganizmaların kullanılan primerler ile (genel/ spesifik gen bölgeleri) cins ve tür düzeyinde belirlenebilir. Ancak mikrobiyal çeşitliliğin doğru olarak ortaya konması için çok sayıda beyaz kolonilerin yani klonların seçilmesi gerekmektedir. Çünkü seçilen beyaz kolonilerin her biri farklı bir türün klonu olabilirken, örnekteki baskın türlere göre aynı türün klonu da olabilir. Dolayısı ile ne kadar çok beyaz koloni seçersek çalıştığımız örnekteki mikrobiyal çeşitliliği ve türlerin dağılımını o kadar doğru ortaya koyabiliriz. Bu da zaman, emek ve maliyet demektir.

#### 4.4. DNA Dizi Analizi

Nükleik asit moleküllerindeki nükleotid dizisi, dizileme (sekanslama) yöntemiyle belirlenir. Dizileme bir PCR ürününün kimliğini belirlemede kullanılacak en hassas tekniktir. En yaygın olarak kullanılan, zincir sonlandırma yöntemi olarak da bilinen Sanger'dir [23,24]. Bu teknikte kullanılacak başlangıç materyalleri arasında tek iplikli özdeş DNA molekülleri, uygun primerler ve hidroksil grubu bulunmayan dideoksinükleotidler (ddNTP) bulunur. DNA polimeraz enzimi kullanılarak tek zincirli DNA'nın bir kopyasının oluşturulmasıyla dizi belirlenir. Dideoksinükleotid sentezlenmiş ipliğe dahil edildikten sonra 3 hidroksilden mahrum olduğu için ipliğin daha fazla uzamasını engellerler. Elde edilen DNA parçalarının uzunlukları farklıdır ve bu parçalar birbirlerinden elektroforezle ayrılmışlardır. Sonlandırma ürünlerinin her birine denk gelen bantlar ise radyografiyle veya floresan uygulaması ile belirlenir [25,26]. Ancak Sanger yönteminde az sayıda nükleotid okunabildiğinden uzun bir DNA'nın dizilemesi gerektiğinde

elverişli olmamaktadır. Bu nedenlerle bilgisayar otomasyonlu dizileme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda floresan boyalar kullanılmaktadır. DNA parçaları kılcak jel içerisinde ilerlerken bir lazer ışını ile taranır ve her biri farklı floresanla boyalı ddNTP'leri uyarır. Oluşan ışık toplanır ve bu bilgi bilgisayara aktarılarak DNA dizisi belirlenir [25,26].

Günümüzde dizilemenin verimliliğini arttıracak, Sanger tekniği ve bilgisayar otomasyonlu dizileme yöntemlerinden çok daha ucuz ve hızlı birçok metod bulunmaktadır. Yeni nesil DNA dizileme teknikleri (NGS), mikrobiyal ekoloji ve genom biliminde çığır açmış, çevresel mikrobiyal toplulukların filogenetiğini ve işlevsel çeşitliliğini araştırabilmemize olanak sağlayan ileri derecede gelişmiş floresan görüntüleme teknikleri içeren, karmaşık yeni teknolojilerdir [14]. Bu dizileme sistemlerinin en önemli özelliği yüksek doğrulukta ve hızda dizileme yapmasıdır. Aynı anda milyonlarca kısa dizileme yapılabilmektedir. Çeşitli NGS platformları bulunmaktadır. Roche 454, Illumina, ion torrent bu platformlardan bazılarıdır. Her birinde kullanılan yöntem farklıdır [27]. Roche 454'te çoğaltılmak istenen DNA boncuklara bağlanır ve PCR ile çoğaltılıp kuyulara konur. Ardından pirosekanslamaya tabi tutulur. Pirosekanslama, DNA sentezi sırasında serbest bırakılan bir pirofosfat molekülünün (PPi) tespitine dayalı yeni nesil DNA dizileme tekniklerinden biridir. Eklenen dNTP'ler ardışık bir enzimatik reaksiyonlar dizisini tetikleyerek ışık yayımına neden olur; bu ışık yayımının yoğunluğu serbest bırakılan pirofosfat miktarına bağlıdır. İlk aşamada, nükleik asit polimerleşerek PPi'nin serbest bırakılmasına neden olur. Bu bileşik daha sonra sülfürlaz enzimin etkisiyle ATP'ye dönüştürülür. Bu şekilde elde edilen enerji bir sonraki aşamada kullanılır; bu aşamada lüsiferinin, lüsiferaz enzim tarafından katalize edilmiş bir reaksiyonda oksidasyonu gerçekleşir ve bu reaksiyona ışık yayımı eşlik eder. Bunu takiben eklenen dNTP'ler şablon dizisinin belirlenmesini sağlar [25,28,29].

#### **4.5. Klon Kütüphanesi Oluşturma**

Çevresel bir örnekten kopyalanan PCR ürünlerini analiz etmek için en yaygın olarak kullanılan metod tek tek gen parçalarını klonlamak, sonra da dizilemektir [30]. Gen kütüphanesi 16S rDNA, rDNA klonlarından ya da rRNA transkriptlerinden oluşur. Elde edilen dizi, NCBI-GenBank (Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) EMBL (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı) ve DDJB (Japonya veritabanı) gibi veri tabanlarındaki bilinen dizilerle karşılaştırılır. BLAST bu amaç doğrultusunda en yaygın olarak kullanılan bilgisayar programlarından biridir [25,31]. Mevcut tür dizileri ile kıyaslanmakta ve bu karşılaştırmaya dayanarak, dizilimlerin birbirleri ile yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaçlar çizilmektedir. Ayrıca mevcut türlere benzerlik oranlarına göre türün şimdiye kadar tanımlanıp tanımlanmadığı anlaşılmaktadır. Klonlanmış diziler genellikle %80, %85, %90, %92, %94 veya %97 dizi benzeşim eşik değerlerine göre sırasıyla şube, sınıf, takım, familya, alt-familya veya türlere ayrılır [30]. 16S rRNA genlerinin klon kütüphaneleri çeşitlilik konusunda bir ön inceleme yapılmasına ve yeni taksonların belirlenmesine olanak verse de çalışmalar şunu göstermiştir ki toprak gibi çevresel örnekler mikrobiyal zenginliğin %50'sini belgeleyebilmek için bile 40,000'den fazla klon gerektirmektedir [32]. Ne var ki, 16S rRNA genlerinin tipik klon kütüphaneleri 1000'den az dizi barındırmaktadır. Bu yüzden, bir örnekte mevcut olan mikrobiyal çeşitliliğin yalnızca küçük bir kısmını açığa çıkarabilir. Klon kütüphaneleri, (yoğun emek gerektirmesi, zaman alması ve maliyetli olması gibi) kısıtlı yönlerine rağmen mikrobiyal çeşitlilik konusundaki ön incelemeler için "altın standart" olarak düşünülmektedir [30]. Doğruluğu yüksektir ve henüz kültüre edilip tanımlanmamış mikroorganizmaların belirlenmesine olanak verdiği için çok avantajlıdır. Yeni ve ucuz dizileme metodlarının geliştirilmesiyle birlikte, mikrobiyal çeşitlilik analizinde kullanılan bu metotta büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.



#### **4.6. Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH)**

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) analizi, PCR temelli bir yöntem değildir. FISH, mikroorganizmaların hücrelerine zarar vermeden hücre içerisinde, spesifik dizilimlere sahip nükleik asitlerin, floresan boyalı oligonükleotidlerle (prob) hibritlenmesi sonucunda hedef moleküllerin hücre içinde epifloresan ya da konfokal lazer mikroskobu kullanılarak üç boyutlu dağılımlarının izlenmesini sağlayan bir yöntemdir. FISH gıda, tarım, hayvancılık ve tıp alanlarında geniş kullanım alanına sahip olsada bu çalışmada çevresel kullanımı üzerinde durulacaktır. FISH ile mikroorganizmaların kendi ortamlarında tespiti, fizyolojik aktiviteleri, morfolojileri, birbirlerine göre konumlarının belirlenmesi ve sayılarının belirlenmesi mümkündür. FISH'in bu avantajları, mikroorganizmaların zamana ve/veya konumlarına bağlı değişimlerin gözlenmesine olanak verir. Ayrıca çalışılan ortamdaki mikroorganizmaların birbirlerine göre konumlarını göz önüne alarak simbiyotik ilişkileri belirlenebilmektedir [33].

Mikrobiyal ekolojide, spesifik filogenetik bir gruba ait organizmaların kompleks bir ekosistem içerisinde tayini için hücrede mevcut 16S rRNA molekülleri hedeflenir. Problar, hücredeki rRNA'lara bağlanabilen floresan ajanla konjuge formda ve tek sarmal halinde özel baz dizileridir. Hedef olarak rRNA'ların kullanılmasının nedeni her hücrede çok sayıda bulunmasının yanında, korunmuş ve değişken bölgelere sahip olmasından dolayı mikroorganizmaların filogenetik olarak tanımlanmasına olanak sağlamasıdır. [34].

FISH'in temel basamakları şunlardır [33] :

- i) Fiksasyon aşamasında hücre duvarı paraformalddehit ya da etanol çözeltileri kullanılarak problara geçirgen hale getirilmesi.
- ii) Hibridizasyon basamağında problar hedef hücredeki rRNA dizisine bağlanması
- iii) Bağlanmayan probların ortamdaki uzaklaştırılması
- iv) Görüntüleme epifloresan ya da konfokal lazer mikroskobu kullanılması

Konfokal lazer mikroskobu biyofilm gibi örneklerin üç boyutlu görüntülenmesine olanak sağlayarak mikroorganizmaların doğal ortamlarındaki konumları, diğer mikroorganizmalarla simbiyotik ilişkileri belirlenebilir.

FISH yönteminin avantajları yanında tüm yöntemlerde olduğu gibi uygulamalarda dezavantajları da vardır. Hem metodolojik hem de çevresel faktörler FISH performansını etkilemektedir. En önemli ve zaman alan kısım uygun oligonükleotidlerin tasarlandığı ve özgünlüklerin incelendiği kısımdır. Bunlar dışında fiksasyon aşamasında tüm hücreler kolayca geçirgen hale getirilemeyebilir. Ayrıca hücredeki rRNA düzeyi az ise tespit edilmesi sıkıntılıdır. FISH'de kültüre edilemeyen mikroorganizmaların tespiti gelişme koşulları bilinmediğinden zordur. Tüm bu dezavantajlara rağmen FISH, mikrobiyal ekoloji çalışmalarının vazgeçilmez yöntemlerinden biridir. Diğer yöntemlerle beraber kullanıldığında mikroorganizmaların, üç boyutlu dağılımlarının izlenmesini, birbirlerine göre konumlarının belirlenmesi gibi çok değerli bilgiler vererek kullanılan diğer yöntemlerin bu eksiklerini kapatmaktadır.

#### **4.7. Gerçek Zamanlı Kantitatif (Q-PCR)**

Gerçek zamanlı kantitatif (Q-PCR), mikrobiyal ekoloji araştırmalarında taksonomik ve fonksiyonel genlerin varlığı ve gen anlatımının belirlenmesi için kullanılan hızlı ve etkin bir tekniktir [35,36]. Q-PCR, 16S rDNA'yı hedeflediğinde, çoğalma reaksiyonlarında oluşan ürün miktarını anında ölçme özelliğine sahiptir. Çünkü PCR çoğaltımını, floresan işaretli problar kullanıldığı için görünür hale getirir. Bu özellik, mikrobiyal ekoloji çalışan araştırmacılara, çalışılan örneğin başlangıçtaki DNA kopya sayısını yani mikroorganizma sayısını (genel ya da spesifik) belirleme olanağını verir. Bunun yanında ekosistemde bulunan aktif olan mikrobiyal türlerin, aktif olarak üretilen enzim ve proteinlerin sayımına ilişkin veriler de sağlar. Q-PCR'ın her bir PCR döngüsünde artan amplikonları (çoğaltılan gen ürününü) gerçek zamanlı olarak

ölçebilmek için ya SYBR Green gibi ek floresan ajanlardan ya da floresan problardan (TaqMan) faydalanılır. Yayılan floresan, çoğalan PCR ürünü ile doğru orantılıdır.

Q-PCR aynı zamanda amoA, pmoA ve dsrA genlerini hedef alarak sırasıyla amonyak oksitleyiciler, metan oksitleyiciler ve sülfat indirgeyiciler gibi önemli fizyolojik mikroorganizma gruplarının niceliksel tespiti için çevresel örneklerde başarıyla kullanılmaktadır [37].

## 5. SONUÇ

Kültür temelli yöntemlerin kullanılması, çevresel örneklerdeki mikroorganizmaların biyoçeşitliliği hakkında sınırlı bilgi sağlar. Günümüzde, moleküler yöntemler mikrobiyal komünite analizleri için temel araçlardır. Bu derlemede, mikrobiyal ekoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılan PCR, DGGE, klonlama, rRNA genlerinin dizilemesi, Q-PCR ve FISH gibi moleküler yöntemler incelenmiştir. Her bir yöntemin birbirine göre avantajları olduğu gibi dezavantajları da vardır. Ancak çevresel örneklerin mikrobiyal biyoçeşitliliğini araştıran çalışmalarda bu yöntemlerin beraber kullanılması ve değerlendirilmesi, her bir yöntemin bir diğerinin açık noktasını kapatacağı için bizi en doğru sonuçlara ulaştıracağı açıktır.

## REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] V.L. Torsvik, Øvreås L. *DNA Reassociation Yields Broad-Scale Information on Metagenome Complexity and Microbial Diversity*. In: Handbook of Molecular Microbial Ecology I. John Wiley & Sons, Inc., 3-16, 2011.
- [2] J.M. Gonzalez, A. Ortiz-Martinez, M.A. Gonzalez-del Valle, L. Laiz, C. Saiz- Jimenez. An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rRNA sequences from complex environmental communities. *J. Microbiol. Methods*. 55: 459–46, 2003.
- [3] C. Schabereiter-Gurtner, G. Pinar, W. Lubitz, S. Rölleke. An advanced strategy to identify bacterial communities on art objects. *J. Microbiol. Methods*. 45: 77–87, 2001.
- [4] S.J. Giovannoni, T.B. Britschgi, C.L. Moyer, K.G. Field. Genetic diversity in Saragasso Sea Bacterioplankton. *Nature*. 345: 60-62, 1990.
- [5] D.L. Kirchman. *Introduction and overview*. In: Microbial Ecology of the Oceans. Wiley-Blackwell: New Jersey, 1-26, 2008.
- [6] R. Daniel. *Soil-Based Metagenomics*. In: Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats. Wiley-Blackwell, 83-92, 2011.
- [7] J.M. Gonzalez, C. Saiz-Jimenez. Unknown microbial communities on rock art painting. Consequences for conservation and future perspectives. *Coalitio.*, 10: 4–7, 2005.
- [8] J. Wang, S. Krause, G. Muyzer, M. Meima-Franke, H. J. Laanbroek, P. L. Bodelier. Spatial patterns of iron-and methane-oxidizing bacterial communities in an irregularly flooded, riparian wetland. *Frontiers in microbiology*. 3: 1-13, 2012.
- [9] D. Liu, H. Ishikawa, M. Nishida, K. Tsuchiya, T. Takahashi, M. Kimura, S. Asakawa. Effect of Paddy-Upland Rotation on Methanogenic Archaeal Community Structure in Paddy Field Soil. *Microb. Ecol.* 1-9, 2014.
- [10] G. Muyzer, K. Smalla. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 127– 141, 1999.
- [11] L.M. Feinstein, W.J. Sul, C.B. Blackwood. Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5428–5433, 2009.
- [12] K.B. Mullis, F.A. Faloona. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods. Enzymol.* 155:335–350, 1987.

- [13] T.C. Dakal, P.K. Arora. Evaluation of potential of molecular and physical techniques in studying biodeterioration. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 11: 71–104, 2012.
- [14] G. Rastogi, R.S. Sani. *Molecular techniques to asses microbial community structure, function and dynamics in the environment*. In *Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications*. Ahmad I., Ahmad F., Pichtel J., eds, Springer, New York, 29–57, 2011.
- [15] L.A. O'Sullivan, A.M. Sass, G. Webster, J.C. Fry, R.J. Parkes, A. J. Weightman. Contrasting relationships between biogeochemistry and prokaryotic diversity depth profiles along an estuarine sediment gradient. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 85: 143-157, 2013.
- [16] E. W. Vissers, F. S. Anselmetti, P. L. Bodelier, G. Muyzer, C. Schleper, M. Tourna, H. J. Laanbroek. Temporal and Spatial Coexistence of Archaeal and Bacterial amoA Genes and Gene Transcripts in Lake Lucerne. *Archae.* 2013:1-11, 2013.
- [17] G. Muyzer, E.C. de Waal, A.G. Uitterlinden. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700, 1993.
- [18] C.C. Gaylarde, C.H. Rodriguez, Y.E. Navarro-Noya, B.O. Ortega-Morales. Microbial biofilms on the sandstone monuments of the Angkor Wat Complex, Cambodia. *Curr. Microbiol.* 64: 85–92, 2012.
- [19] S. Mocali, A. Benedetti. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Res. Microbiol.* 161: 497–505, 2010.
- [20] Promega (2007) pGEM-T easy vector manual. Available from: <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgem-t%20and%20pgem-t%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf> [accessed April 12, 2014].
- [21] W.J. Thieman, M.A. Palladino. *Biyoteknolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık, Çeviri ed. Tekeoğlu M. Ankara, 2013.
- [22] M.T. Madigan, J.M. Martinko. *Mikroorganizmaların biyolojisi*. Palme Yayıncılık, Çeviri ed. Çökmüş C. Ankara, 2010.
- [23] F. Sanger, A.R. Coulson. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94: 441-448, 1975.
- [24] A.M. Maxam, W. Gilbert. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Science.* 74: 560-564, 1977.
- [25] I. Mecler, U. Nawrot. Techniki molekularne stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej. *Mikol. Lek.* 14: 280–284, 2007.
- [26] A. Raszka, A. Ziembinska, A. Wiechetek. Techniki molekularne stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej. *Środowisko*, 2: 101–114, 2009.
- [27] M.L. Metzker. Sequencing technologies mdash] the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11: 31-46, 2010.
- [28] S. Balzer, K. Malde, A. Lanzen, A. Sharma, I. Jonassen. Characteristics of 454 pyrosequencing data-enabling realistic simulation with flowsim. *Bioinformatics.* 26: 420-425, 2010.
- [29] M. Ronaghi. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome. Res.* 11: 3–11, 2013.
- [30] T.Z. DeSantis, E.L. Brodie, J.P. Moberg, I.X. Zubieta, Y.M. Piceno, G.L. Andersen. High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microbiol. Ecol.* 53: 371–383, 2007.
- [31] T.A. Tatusova, T.L. Madden. BLAST 2 SEQUENCES, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 247–250, 1999.
- [32] J. Dunbar, S.M. Barns, L.O. Ticknor, C.R. Kuske. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3035–3045, 2002.

- [33] R.I. Amann, W. Ludwig, K.H. Schleifer. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143–169, 1995.
- [34] S.W. Rogers, T.B. Moorman, S.K. Ong. Fluorescent in situ hybridization and microautoradiography applied to ecophysiology in soil. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 71: 620–631, 2007.
- [35] S.A. Bustin, V. Benes, T. Nolan, M.W. Pfaffl. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 34: 597–601, 2005.
- [36] C.J. Smith, A.M. Osborn. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 67: 6–20, 2009.
- [37] M. Foti, D.Y. Sorokin, B. Lomans, M. Mussman, E.E. Zacharova, N.V. Pimenov, J.G. Kuenen, G. Muyzer. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2093–3000, 2007.