



**ANTARKTİKA HORSESHOE ADASI'NDAKİ KRİYOKONİT
HABİTATLARININ MİKROBİYAL BİYOÇEŞİTLİLİĞİNİN
KÜLTÜRDEN BAĞIMSIZ YAKLAŞIMLARLA ARAŞTIRILMASI**

Yusuf GÜLŞAHİN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Ana Bilim Dalı

2024

(Her hakkı saklıdır)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI BİYOLOJİ BİLİM DALI

**ANTARKTİKA HORSESHOE ADASI'NDAKİ KRİYOKONİT
HABİTATLARININ MİKROBİYAL BİYOÇEŞİTLİLİĞİNİN KÜLTÜRDEN
BAĞIMSIZ YAKLAŞIMLARLA ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of Microbial of Cryoconite Habitats on Hohseshoe Island (Antarctica) with
Culture-Independent Approaches)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yusuf GÜLŞAHİN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI

Erzurum
Eylül, 2024



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**ANTARKTİKA HORSESHOE ADASI'NDAKİ KRİYOKONİT HABİTATLARININ
MİKROBİYAL BİYOÇEŞİTLİLİĞİNİN KÜLTÜRDEN BAĞIMSIZ YAKLAŞIMLARLA
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI danışmanlığında, Yusuf GÜLŞAHİN tarafından hazırlanan bu çalışma, 20/09/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE
Atatürk Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI
Atatürk Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Burak ALAYLAR
Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma Türkiye Cumhuriyeti Cumhurbaşkanlığı Himayelerinde Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Destekli ve Tübitak Mam Kutup Araştırmaları Enstitüsü Koordinatörlüğünde gerçekleştirilmiştir. TÜBİTAK 1001 Kutup Projesi olarak desteklenmiştir.
Proje No:121Z769



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI danışmanlığında sunulan “Antarktika Horseshoe Adası’ndaki Kriyokonit Habitatlarının Mikrobiyal Biyoçeşitliliğinin Kültürden Bağımsız Yaklaşımlarla Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	19	30
Kuramsal Temeller	24	30
Materyal ve Metot	23	35
Araştırma Bulguları	4	20
Tartışma ve Sonuç	8	20
Tezin Geneli	15	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları *tabiri caza* dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının **%5’den** büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Yusuf GÜLŞAHİN	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI
20.9.2024	20.9.2024
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Öncelikle Yüksek Lisans eğitimim, tez çalışmalarım ve okul dışı ortamda her konuda bilgisi, deneyimi, maddi, manevi ve yakın ilgisi ile bana her zaman destek olup bu noktaya gelmemde bana yol gösteren ve de manevi kişiliğinden çok şey öğrendiğim danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini ve güler yüzünü benden esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI'ya, tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında yapmış oldukları destek ve katkılardan dolayı sayın hocalarım Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye ve Prof. Dr. Güleray AĞAR'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince bilgi birikimlerini bana aktarıp, maddi manevi her konuda desteğini benden esirgemeyen azminden esinlendiğim ekip arkadaşım Araştırma Görevlisi Şeyma AKSU'ya çok teşekkür ederim.

Geçirdiğim bu süreçte gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse her anlamda bana yardımcı olup güler yüzlerini benden hiç esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Merve YÜCE'ye, Dr. Öğr. Üyesi Selin DOĞAN'a, Dr. Taha Yasin KOÇ'a, Uzman İlknur ÇOLAK'a, Uzman Rabia TATAR'a, Yüksek Mühendis Ekrem GÜLLÜCE'ye ve laboratuvar ekibimizde çalışan tüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

Tez jürimde bulunup sağladığı katkılarından dolayı Doç. Dr. Burak ALAYLAR'a ve de yine bu süreçte her zaman gülümseyip hoş vakit geçirdiğim Biyoloji bölümündeki kıymetli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her konuda olduğu gibi bu süreçte de arkamda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, maddi ve manevi yardımlarını asla esirgemeyen değerli annem Medine GÜLŞAHİN'e, babam Mehmet GÜLŞAHİN'e, ablam Feyza Nur GÜLŞAHİN'e ve kardeşim Tunahan GÜLŞAHİN'e gönülden sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yusuf GÜLŞAHİN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTARKTİKA HORSESHOE ADASI'NDAKİ KRİYOKONİT HABİTATLARININ MİKROBİYAL BİYOÇEŞİTLİLİĞİNİN KÜLTÜRDEN BAĞIMSIZ YAKLAŞIMLARLA ARAŞTIRILMASI

Yusuf GÜLŞAHİN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARADAYI

Amaç: Antarktika yer yüzünün en izole ve ekstrem koşullarını barındırmasıyla biyoçeşitlilik çalışmaları için eşsiz bir kaynak sunar. Bu kapsamda hazırlanan tez çalışmamızda Antarktika Horseshoe Adası'ndaki Türk Bilimsel Araştırma Kampı çevresinden ve Shoemith buzulundan toplanan kriyokonit örneklerinin mikrobiyal biyoçeşitliliğinin kültürden bağımsız yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Altıncı Ulusal Antarktika Bilim Seferi'ne (TAE-6) kapsamında gerçekleştirilen saha çalışmalarında Horseshoe Adası'ndan kriyokonit örnekleri aseptik teknikle toplanmış ve soğuk zincir protokolü ile önce Türkiye'ye sonra da Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarları'na taşınmıştır. Daha sonra her bir numuneden çevresel DNA izolasyonları yapılmış, evrensel primerler ile barkod bölgeleri çoğaltılmış ve yeni nesil DNA dizileme tabanlı analizlerin yapılması ile numunelerin kültürden bağımsız mikrobiyal biyoçeşitlilikleri belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışma sonucunda 10 Antarktik tip kriyokonit örneği başarıyla örneklenerek laboratuvar ortamına taşınmıştır. Bu örneklerin kültürden bağımsız araştırmaları sonucunda prokaryotik biyoçeşitliliğin Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria ve Cyanobacteria şubeleri, ökaryotik mikrobiyal biyoçeşitliliğin ise Ascomycota ve Basidiomycota şubeleri tarafından domine edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan ileri biyoinformatik analizler ile her bir kriyokonit örneğindeki 1283 prokaryotik ve 56 ökaryotik mikrobiyal türün dağılımları raporlanmıştır.

Sonuçlar: Yapılan tez çalışması ile Antarktika Horseshoe Adası kriyokonitlerinin mikrobiyal biyoçeşitliliği ilk kez belirlenerek literatüre kazandırılmıştır. Ayrıca ulusal ve uluslararası arenada gerçekleştirilecek yeni çalışmalara kaynak sağlayacak önemli bir mikrobiyal biyoçeşitlilik raporu hazırlanmıştır. Bu bilgi gelecekteki mikrobiyal kültür ve biyoteknoloji çalışmalarına ışık tutacak niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Antarktika, Horseshoe Adası, Metagenomik, Mikrobiyal Biyoçeşitlilik, Psikrofiller.

Eylül 2024, 124 Sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

INVESTIGATION OF MICROBIAL BIODIVERSITY OF CRYOCONITE HABITATS ON ANTARCTICA HORSESHOE ISLAND WITH CULTURE- INDEPENDENT APPROACHES

Yusuf GÜLŞAHİN

Supervisor: Assist. Prof. Dr Mehmet KARADAYI

Purpose: Antarctica offers a unique resource for biodiversity studies as it contains the most isolated and extreme conditions on earth. In this context, our thesis study aimed to investigate the microbial biodiversity of cryoconite samples collected from the vicinity of the Turkish Scientific Research Camp on Horseshoe Island in Antarctica and from the Shoosmith Glacier using culture-independent methods.

Method: In the field studies carried out within the scope of 6th Turkish Antarctic Science Expedition (TAE-6), cryoconite samples from Horseshoe Island were collected with aseptic technique and transported to Turkey with cold chain protocol and then to Atatürk University Biology Department Research Laboratories. Then, environmental DNA was isolated from each sample, barcode regions were amplified with universal primers and culture-independent microbial biodiversity of the samples was determined by performing next-generation DNA sequencing-based analyses.

Findings: As a result of the study, 10 Antarctic type cryoconite samples were successfully sampled and transported to the laboratory environment. As a result of the culture-independent studies of these samples, it was determined that the prokaryotic biodiversity was dominated by the Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Cyanobacteria phyla, while the eukaryotic microbial biodiversity was dominated by the Ascomycota and Basidiomycota phyla. In addition, the distributions of 1283 prokaryotic and 56 eukaryotic microbial species in each cryoconite sample were reported with advanced bioinformatics analyses.

Conclusions: With this thesis, the microbial biodiversity of Antarctic Horseshoe Island cryoconites was determined for the first time and introduced to the literature. In addition, an important microbial biodiversity report was prepared that will provide resources for new studies to be carried out in the national and international arena. This information will shed light on future microbial culturing and biotechnology studies.

Keywords: Antarctica, Horseshoe Island, Metagenomic, Microbial Biodiversity, Psychophiles.

September 2024, 124 Pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI	ii
ETİK VE BİLDİRİM SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	ix
GİRİŞ	10
KURAMSAL TEMELLER	14
Soğuk Habitatların Mikrobiyal Biyoçeşitliliği ve Biyoteknolojik Önemi	14
Antarktika ve Horseshoe Adasının Psikrofil Mikroorganizma Çalışmaları İçin	
Potansiyeli.....	17
Psikrofil Kaynağı Olarak Kriyokonitler.....	19
MATERYAL ve METOT.....	22
Çalışma Alanının Belirlenmesi ve Örneklemelerin Yapılması	22
Metagenomik Çalışmalar	22
Çevresel Numunelerden DNA İzolasyonu Çalışmaları	22
Mikrobiyal Biyoçeşitlilik Analizleri İçin Seçilen Primer Setleri ve PCR Koşulları.....	23
Kütüphane Hazırlama ve Dizileme Çalışmaları	24
Ham Verinin Biyoinformatik Analizi	24
Taksonomik Sınıflandırma, Çeşitlilik Analizleri ve Raporlama	24
ARAŞTIRMA BULGULARI	25
Çalışma Alanının Belirlenmesi ve Örneklemelerin Yapılması	25
Metagenomik Çalışmalar	29
Çevresel DNA izolasyonu ve PCR Çalışmaları	29
NGS Dizileme İstatistikleri ve Biyoinformatik Analizler	30
Biyoçeşitlilik Analizleri	34

TARTIŞMA ve SONUÇ	49
ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR.....	53
EKLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 1.Antarktika Horseshoe Adası kriyokonit örneklerinin Prokaryotik takson dağılımı	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 2. Antarktika Horseshoe Adası kriyokonit örneklerinin Ökaryotik takson dağılımı	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 3. Kriyokonit örneklerini domine eden prokaryotik mikrobiyal çeşitliliğin üst alem düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 4. Kriyokonit örneklerini domine eden prokaryotik mikrobiyal çeşitliliğin şube düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 5. Kriyokonit örneklerini domine eden prokaryotik mikrobiyal çeşitliliğin sınıf düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 6. Kriyokonit örneklerini domine eden prokaryotik mikrobiyal çeşitliliğin takım düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 7. Kriyokonit örneklerini domine eden prokaryotik mikrobiyal çeşitliliğin aile düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 8. Kriyokonit örneklerini domine eden prokaryotik mikrobiyal çeşitliliğin cins düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 9. Kriyokonit örneklerini domine eden prokaryotik mikrobiyal çeşitliliğin tür düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 10. Kriyokonit örneklerini domine eden ökaryotik mikrobiyal çeşitliliğin üst alem düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 11. Kriyokonit örneklerini domine eden ökaryotik mikrobiyal çeşitliliğin şube düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 12. Kriyokonit örneklerini domine eden ökaryotik mikrobiyal çeşitliliğin sınıf düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 13. Kriyokonit örneklerini domine eden ökaryotik mikrobiyal çeşitliliğin takım düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 14. Kriyokonit örneklerini domine eden ökaryotik mikrobiyal çeşitliliğin aile düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 15. Kriyokonit örneklerini domine eden ökaryotik mikrobiyal çeşitliliğin cins düzeyinde dağılım raporu.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

EK 16. Kriyokonit örneklerini domine eden ökaryotik mikrobiyal çeşitliliğin tür düzeyinde dağılım raporu. **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
ÖZ GEÇMİŞ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Arazi çalışmaları kapsamında yapılan örneklemelere ait bulgular	25
Tablo 2. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin dizileme istatistiği.	30
Tablo 3. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin dizileme istatistiği.	31
Tablo 4. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin taksonomi istatistiği.	31
Tablo 5. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin sınıflandırma istatistiği. .	32
Tablo 6. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin taksonomi istatistiği. ...	33
Tablo 7. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin sınıflandırma istatistiği.	33
Tablo 8. MK-1 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	36
Tablo 9. MK-2 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	37
Tablo 10. MK-3 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	37
Tablo 11. MK-4 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	38
Tablo 12. MK-5 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	38
Tablo 13. MK-6 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	39
Tablo 14. MK-7 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	39
Tablo 15. MK-8 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	40
Tablo 16. MK-9 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	40
Tablo 17. MK-10 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	41
Tablo 18. MK-1 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	43
Tablo 19. MK-2 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	43

Tablo 20. MK-3 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	44
Tablo 21. MK-4 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	44
Tablo 22. MK-5 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	45
Tablo 23. MK-6 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	45
Tablo 24. MK-7 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	46
Tablo 25. MK-8 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	46
Tablo 26. MK-9 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	47
Tablo 27. MK-10 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Psikrofilik mikroorganizmaları konu alan SCI kapsamındaki makale sayılarının yıllara göre dağılımı (1995-2020).....	15
Şekil 2. Kriyokonit çukurunun oluşumu.....	19
Şekil 3. Açık ve kapalı tip kriyokonit çukurları.....	20
Şekil 4. Horseshoe Adası Antarktik tip kriyokonit örnekleme noktaları.	26
Şekil 5. Altıncı Ulusal Antarktik Bilim Seferi (TAE-6) kapsamında Horseshoe Adası'nda gerçekleştirilen arazi ve örnekleme çalışmaları.	27
Şekil 6. Örnekleme yapılan kriyokonitlere ait örnek görüntüler.	28
Şekil 7. Kriyokonit numunelerinde elde edilen çevresel DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	29
Şekil 8. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	29
Şekil 9. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	30
Şekil 10. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerindeki biyoçeşitliliğin alem seviyesinde dağılım grafiği.	32
Şekil 11. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerindeki biyoçeşitliliğin takım seviyesinde dağılım grafiği.	34
Şekil 12. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerindeki biyoçeşitliliğin tür seviyesinde dağılım grafiği.	34
Şekil 13. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin seyreltme eğrileri.	35
Şekil 14. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin PCoA plot grafiği.	35
Şekil 15. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin biyoçeşitlilik grafiği.	36
Şekil 16. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin PCoA plot grafiği.	42
Şekil 17. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin biyoçeşitlilik grafiği.	42

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

%	: Yüzde
<	: Küçük
>	: Büyük
°	: Derece
°C	: Santigrat
<i>g</i>	: Force (Kuvvet)
µl	: Mikrolitre
NGS	: Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Sekanslama)
~	: Yaklaşık
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
DNA	: Deoksiribonükleik asit
HTS	: High-throughput sequencing
TAE-6	: 6. Ulusal Antarktik Bilim Seferi
GPS	: Global Positioning System
IRS	: Inhibitor Removal Solution
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
OTU	: Operational Taxonomic Unit (Operasyonel Taksonomik Birim)
PCoA	: Principal-coordinate analysis (Ana koordinat analizi)

GİRİŞ

Yaygın kanının aksine, Dünya soğuk bir gezegendir ve biyosferin yaklaşık %85'inin sürekli olarak 5 °C'nin altındaki sıcaklıklara maruz kaldığı bilinmektedir (Karadayi *et al.*, 2021). Soğuk habitatlar olarak da bilinen biyosferin bu kısmı temelde kutupları (Arktik ve Antarktik), okyanusların derin bölgelerini ve yüksek dağları kapsar. Güncel çalışmalar, soğuk habitatların önemli bir bölümünün derin okyanuslar (okyanusların %64'ü), kar örtüsü (kara yüzeyinin %35'i), permafrost alanlar (kara yüzeyinin %24'ü), deniz buzu (Dünya yüzeyinin %13'ü) ve buzullardan (karasal ekosistemin %10'u) oluştuğunu açığa çıkarmıştır. Dahası, soğuk su gölleri, yeraltı soğuk toprak katmanları, soğuk çöller ve mağaralar da diğer soğuk ekosistemlere örnek olarak verilmektedir (Margesin and Miteva 2011; Hassan *et al.*, 2016).

Soğuk ekosistemler içerisinde Antarktika yer yüzünün en özel bölgesi olarak kabul edilmektedir. Antarktika kıtalar arasında insan etkileşimi ve yerleşimi yönünden en kısa tarihçeye sahip olan bölgedir. Kıtaya ilk defa yaklaşık 200 yıl önce ayak basılmış ve kıta o günden günümüze çeşitli bilimsel çalışmalara konu olmuştur. Bu çalışmalar içerisinde biyolojik araştırmalar kıtanın ekstrem soğuk tabiatının yaşamsal faaliyetlere imkân vermeyeceği düşüncesi ile ihmal edilmiştir. Bununla birlikte içlerinde tundraların, yüksek dağ ekosistemlerinin ve kuzey kutbunun da bulunduğu çeşitli ekstrem soğuk habitatlarda son yıllarda yapılan biyoçeşitlilik araştırmalarının bu habitatların da canlılık yönünden aktif ve zengin alanlar olduğunu ortaya çıkarması, Antarktika'yı da benzer çalışmaların yapılması için önemli bir odak noktası haline getirmiştir (Peck *et al.*, 2005). Ayrıca, soğuk habitatların önemli bileşeni olan mikrobiyal psikrofillerin biyoteknolojideki öneminin de anlaşılması ile bu çalışmalar büyük ivme kazanmıştır. Dahası, Antarktika başta kriyokonit çukurları olmak üzere, buzullar, buzul gölleri, permafrost alanlar, kar ve deniz buzu gibi pek çok özelleşmiş soğuk habitata ev sahipliği yapmasıyla da mikrobiyal biyoçeşitlilik çalışmaları için eşsiz bir kaynak sağlar.

Bu habitatlar arasında Antarktik tip kriyokonitler özel bir öneme sahiptir. Literatüre göre soğuğa adapte mikrobiyal çeşitliliğin en özel ve korunmuş türlerini barındırma potansiyeline sahip kriyokonit oluşumlar, kar-buz örtüsünün yüzeyine düşen organik partiküllerin güneş ışınları tarafından ısıtılması ve altında eriyen buzun içine gömülmesiyle oluşur. Bu oluşumlar, partiküllerden ve erimiş buz örtüsünden salınan materyallerle aşılınmış ve yapısında canlılığın devamını sağlayacak sıvı halde su içeren eşsiz ekosistemler olarak tanımlanmaktadır (Christner *et al.*, 2003; Edwards and Cameron, 2017). Günümüze kadar yapılan çok sayıdaki biyoçeşitlilik araştırması bu ekosistemlerin soğuğa adapte bakteri, arke,

mikroalg, maya ve küf gibi çok sayıda prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizma yönünden zengin olduklarını göstermiştir.

Diğer soğuk habitatlarda olduğu gibi Antarktik tip kriyokonitlerde de canlılık ve biyoçeşitlilik düşük sıcaklığın etkisi altındadır. Burada, sıcaklık yaşam sınırlarını belirleyen en önemli faktörlerden birisidir ve organizmanın gelişme ya da hayatta kalma durumu üzerine kuvvetli bir etkiye sahiptir. Bunun temelinde; sıcaklığın dolaylı olarak tüm biyokimyasal reaksiyonların içinde gerçekleştiği ortam olan suyu ya da doğrudan canlı hücredeki organik molekülleri etkilemesi vardır (Feller, 2013). Bu bağlamda sıradışı karakteristikleriyle Antarktik tip kriyokonitler hem suyun sıvı halde kalmasının hem de metabolik aktivitelerin sürdürülmesinin sağlanabilmesi açısından pek çok zorlayıcı koşulu bir arada bulundurur. Buna rağmen son dönemde yapılan araştırmalar bu habitatların başta bakteri, arke, maya, filamentli fungus, alg, nematod, tardigrad, rotifer, siliat ve çeşitli protozoonlar olmak üzere çok büyük bir biyoçeşitliliğe ev sahipliği yaptığını ve bu canlıların soğuk habitatların kendine özgü olumsuz koşullarını aşmak üzere adaptasyonlar geliştirdiklerini açıkça göstermiştir (Christner *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2009; Edwards and Cameron, 2017; Lutz *et al.*, 2019; Karadayi *et al.*, 2021). Çoğunluğu mikroorganizmalardan oluşan bu biyoçeşitliliğin üyelerinin soğuk habitatlarda görülen ekstrem koşullara (sınırlı besin varlığı, düşük su aktivitesi, düşük enzimatik reaksiyon oranı, ekstrem pH ve tuzluluk faktörleri) karşı bir dizi yapısal, fizyolojik, metabolik ve fonksiyonel uyum mekanizmalarını geliştirdiği rapor edilmiştir (Karadayi *et al.*, 2021).

Bu adaptasyonlar soğuk habitatlarda gerçekleşen ekolojik döngülerin sürdürülmesindeki kritik rollerinin yanı sıra günlük hayatımıza uyarlanabilecek biyoteknolojik süreçlerin geliştirilmesine eşsiz bir ilham kaynağı olmalarıyla da dikkat çekmektedir (Margesin and Schinner, 2001; Cavicchioli *et al.*, 2011; Nam *et al.*, 2011; Banerjee *et al.*, 2016). Örneğin soğuk habitatlardan elde edilen mikroorganizmalarla günümüzde gıda üretimi, atık işleme, madencilik, biyoremediasyon uygulamaları, zirai uygulamalar, tıbbi ve moleküler diagnostik, deterjan, tekstil ve kozmetik gibi çok çeşitli endüstriler için ticari değeri yüksek yeni biyoteknolojik ürünler geliştirilebilmiştir (Hamdan, 2018). Bu ürünlerin temelini çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyeli olan yeni biyoaktif bileşikler (antimikrobiyaller, biosurfaktanlar, antifriz proteinleri, vb.) ve özellikle de soğuk aktif ticari enzimler (amilaz, proteaz, lipaz, ksilanaz, selülaz, vb.) oluşturmaktadır.

Bu bağlamda, uzun yıllardır istikrarlı büyüme gösteren ve 2024 yılına kadar 10,5 milyar dolara ulaşması beklenen küresel enzim pazarında soğuk aktif enzimlerin payının giderek artması ve bu enzimlerin mezofilik/termofilik homologlarından daha yüksek enerji tasarrufu sağlaması sonucunda soğuk ekosistemlere yönelik mikrobiyal biyoçeşitlilik ve biyoteknoloji

alışmaları yüksek ivme kazanmıştır (Nielsen, 2005; Proctor and Gamble, 2009; Srivastava and Srivastava, 2018). Bunun temelinde soğuk habitatların araştırılmasında kullanılan yöntemlerde meydana gelen teknolojik gelişmelerin ve yeni yaklaşımların da büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir (Aliyu *et al.*, 2017).

Soğuk habitatlarla ilgili literatür çalışmaları, güncel araştırmaların temel olarak kültüre bağımlı ve kültürden bağımsız (metagenomik) yöntemlerle gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bu noktada, metagenomik yaklaşıma kıyasla daha düşük bir taksonomik çeşitlilik elde edilebilen kültüre bağımlı yöntemlerin en büyük avantajı biyoteknolojik ürünler geliştirme noktasında kullanılabilecek mikrobiyal kaynak sağlamasıdır. Özellikle soğuğa adapte mikroorganizmalardan soğuk aktif enzimlerin üretilmesini hedef alan çalışmalar için (i) mikroorganizmaların kültivasyonu, (ii) izolasyonu (iii) mikrobiyal özelliklerin ve fenotiplerin anlaşılması ve (iv) enzim üreticilerin seçilimi aşamalarından oluşan kültüre bağımlı yaklaşımlar ihtiyaç duyulan, kabul gören ve yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir (Roohi *et al.*, 2013; Maiangwa *et al.*, 2015; Arabaci and Arikani, 2018; Muslu *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2020). Ancak son yıllarda soğuk ekosistemlerdeki kültüre alınamayan mikrobiyal biyoçeşitliliğin göz ardı edilemeyecek kadar çok ve kıymetli olduğunun anlaşılması, güncel araştırmaların yönünü kültüre bağımlı olmayan metagenomik çalışmalara yöneltmiştir. Gasc *et al.*'a (2015) göre Dünya üzerinde yaşadığı tahmin edilen 10^6 prokaryotik türün yaklaşık %99'u standart protokoller kullanılarak kültüre edilememektedir. Kültüre bağımlı yöntemlerin yoğun olarak tercih edildiği yakın geçmişe kadar taksonomik karakterizasyon için saf mikroorganizma kültürleri gerektiğinden, bu durum mikrobiyal biyoçeşitlilik araştırmaları için bir “darboğaz” olarak anılagelmiştir (Schloss and Handelsman, 2005). Bu darboğaz son yıllarda çevresel bir örnekteki mikrobiyal bir topluluğun tüm genomlarını izolasyon ve kültüre alma aşamalarına ihtiyaç duymaksızın genomik araçlar kullanarak analiz etmeyi içeren metagenomik alanının gelişmesiyle büyük lde zlmştir. Böylece, metagenomik, belirli bir ortamdaki “gerçek” mikrobiyal çeşitlilik hakkında temel bilgiler sağlamış, mikrobiyal ekosistemlerin karmaşık işlevlerini ortaya koymuş, yeni genlerin ve bu genlerin ürünlerinin keşfinde etkin bir rol oynamıştır (Aliyu *et al.*, 2017).

Sunulan literatür bilgileri değerlendirildiğinde hem soğuk habitatların biyoçeşitliliğinin aydınlatılmasına yönelik çalışmaların hem de bu habitatlardan elde edilecek soğuğa adapte mikroorganizmaların biyoteknolojik açıdan değerlendirilmelerinin gerekliliği açıkça görülmektedir. Bu bağlamda dünyanın en önemli soğuk ekosistemlerinden birisi olan Antarktika'da yer alan Horseshoe adası biyoçeşitlilik ve biyoteknoloji araştırmalarına daha önce konu olmamış kriyokonit oluşumlarıyla akademik açıdan özgün bir potansiyele sahiptir.

Bu ilkeler çerçevesinde hazırlanan çalışmamızda, gelecekte ulusal ve uluslararası arenada yapılacak mikrobiyal kültür ve biyoteknoloji çalışmalarına ulusal bir kaynak sağlanması amacıyla Horseshoe Adası kriyokonit oluşumları ilk kez örneklenmiş ve numunelerin mikrobiyal biyoçeşitlilik araştırmaları NGS temelli kültürden bağımsız (metagenomik) yöntemlerle gerçekleştirilmiştir.



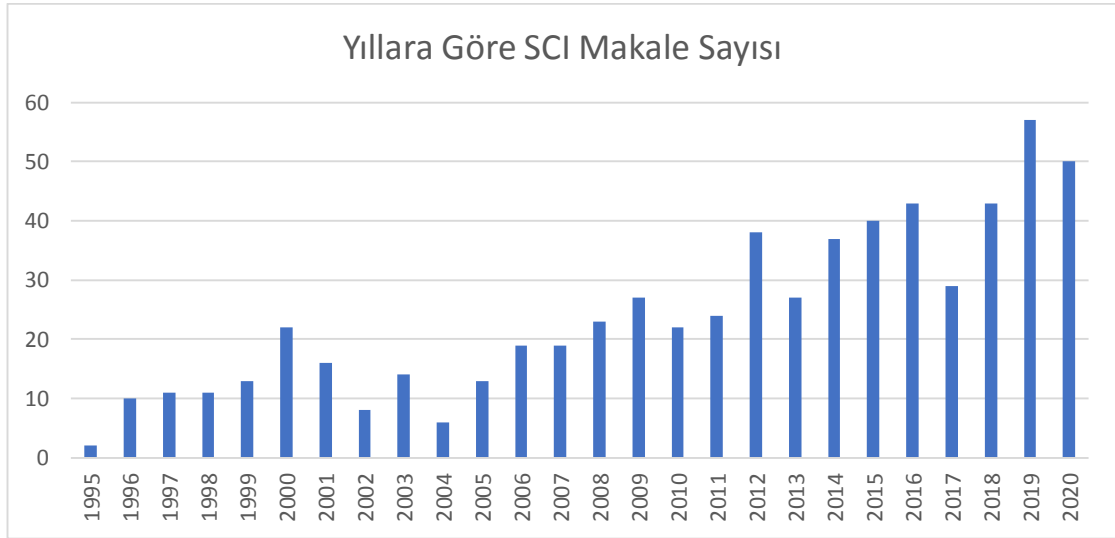
KURAMSAL TEMELLER

Soğuk Habitatların Mikrobiyal Biyoçeşitliliği ve Biyoteknolojik Önemi

Dünya biyosferinin büyük bir kısmı yıl boyunca 5 °C'nin altındaki sıcaklıklara maruz kalmaktadır. Soğuk ekosistemler oldukça çeşitlidir ve derin okyanuslardan yüksek dağların zirvelerine kadar yayılım gösterirler. En ekstrem soğuk ve tamamen donmuş görünen ortamlar bile çok çeşitli ve metabolik olarak aktif psikrofilik ve psikrotolerant mikrobiyal popülasyonları barındırır. Psikrofilik mikroorganizmalar düşük sıcaklıklarda optimum gelişim göstermeleri ve oda ısısından daha yüksek sıcaklıklarda gelişmelerinin azalması ya da tamamen durması ile karakterize edilmektedir (Morita, 1975). Buna karşın psikrotolerant (psikroaktif) mikroorganizmalar 4-5 °C'den insan vücut sıcaklığına (37 °C) kadar geniş bir skalada gelişim gösterebilmeleri ile psikrofillerden ayrılırlar (Panikov and Sizova, 2006).

Bununla birlikte, soğuk habitatlarda gözlenen tüm mikroorganizmaları kesin bir şekilde psikrofil ya da psikrotolerant olarak sınıflandırmak her zaman mümkün değildir. Örneğin deniz buzu içerisinde -1 °C ile -10 °C arasında yaşamını sürdüren bakterilerin çoğunun laboratuvar koşullarında 10 °C ile 25 °C arasında optimal büyüme gösterdikleri ortaya konulmuştur (Bowman *et al.*, 1997). Yine ortalama sıcaklığı -10 °C'den daha az olan permafrost, buzul ve tundra bölgelerinden alınan örneklerde birçok bakteri ve arke türünün psikrofilik karakter göstererek sıfırın altındaki sıcaklıklarda metabolik aktivitelerini sürdürdüğü, buna karşın çok daha geniş sıcaklık aralıklarında da bu aktivitelere devam ettiği bildirilmiştir (Steven *et al.*, 2008; Drotz *et al.*, 2010; Tuorto *et al.*, 2013). Psikrofilide gelişme sınırlarının esneme gösterdiği mikroorganizmalara *Planococcus halocryophilus* (-15 °C ile >30 °C) ve *Psychrobacter arcticus* (< -5 °C ile ~30 °C) örnek olarak verilebilir (Bergholz *et al.*, 2009; Mykytczuk *et al.*, 2013).

Dolayısıyla, ister psikrofilik isterse de psikrotolerant olsun, soğuğa adapte olmuş mikroorganizmaların en dikkat çekici özelliği; düşük sıcaklıkların olumsuz etkilerinin başarılı bir şekilde üstesinden gelebilmeleridir. Soğuk adaptasyonu, tüm hücresel bileşenler seviyesinde meydana gelen karmaşık bir yapısal ve fonksiyonel adaptasyonlar bütünüdür. Soğuğa adapte olmuş mikroorganizmalar kendi doğal habitatlarında çok önemli bir ekolojik öneme sahiptir ve soğukla başa çıkmak için kullandıkları mekanizmalar onları özellikle yeni biyoteknolojik uygulamaların geliştirilmesi için yararlı kılar. Bunun bir sonucu olarak ekstrem soğuk nişlerde gelişebilen ve soğuk adaptasyonu yeteneklerinden dolayı biyoteknolojik uygulamaların geliştirilmesine kaynak sağlayan psikrofilik mikroorganizmalar, birçok bilimsel çalışmanın odağı olmuştur (Şekil 1).



Şekil 1. Psikrofilik mikroorganizmaları konu alan SCI kapsamındaki makale sayılarının yıllara göre dağılımı (1995-2020) (Kaynak: Web of Science).

Her ne kadar Witter'in raporuna göre psikrofilik mikroorganizmaların süt endüstrisi için önemine yönelik çalışmaların tarihçesi 1961 yılına kadar gitse de günümüzde gıda üretimi, atık işleme, madencilik, biyoremediasyon uygulamaları, zirai uygulamalar, tıp ve moleküler diagnostik gibi çok çeşitli endüstriler için de kullanımları mümkündür (Hamdan, 2018). Örneğin petrol ile kirlenmiş soğuk çevrelerin biyoremediasyonunda petrol kökenli hidrokarbonları parçalayabilen psikrofilik mikroorganizmalardan sıklıkla yararlanılmaktadır (Whyte *et al.*, 1999; Margesin and Schinner, 2001; Zhou *et al.*, 2008). Bu mikroorganizmalara *Rhodococcus*, *Pseudomonas* ve *Pseudoalteromonas* cinslerinin psikrofilik üyeleri örnek olarak verilebilir. Ayrıca psikrofillerin soğukta aktive olabilen enzimleri gıda endüstrisi için de oldukça önemli araçlardır. Ticari açıdan önem arz eden bu enzimlerin en önemli örnekleri β -galaktosidazlar, meyve suyu üretim süreçlerinde kullanılan pektinazlar ve hamur işlerinde kullanılan ksilenazlardır (Adapa *et al.*, 2014; Struvay and Feller, 2012).

Yine literatürdeki diğer araştırmalar psikrofillerin tıbbi uygulamalarda kullanılabilecek çok sayıda yeni antimikrobiyal ürünün de kaynağı olabileceğine işaret etmektedir (Tomova *et al.*, 2015). Ayrıca *Pseudoalteromonas* türünün antifriz glikoproteinlerinden Antarticine-NF3 maddesinin yara iyileştirici özelliği keşfedilmiş ve bu ürün kozmetik endüstrisinde rejenerasyon kremi formülasyonlarının geliştirilmesi için kullanılmıştır (Hamdan, 2018).

Psikrofillerin sentezledikleri antimikrobiyal maddelerin bir diğer kullanım alanı ise zirai uygulamalardır. Örneğin, psikrofilik *Nocardioidea* türünden elde edilen antimikrobiyal bileşikler pirinç üreticiliğinde önemli ürün kaybına yol açan *Xanthomonas oryzae* bakterisine

karşı inhibitör aktivite göstermiş ve organik tarımda kullanılabilecek güvenilir pestisitlerin üretimi için umut vaat etmiştir (Gesheva and Vasileva-Tonkova, 2012). Ayrıca, psikrofillerin soğuğa adaptasyonları sırasında ürettikleri çoklu doymamış yağ asitlerinin kültür balıkçılığı için ucuz besin kaynakları olabileceği de öne sürülmektedir (Jadhav *et al.*, 2010).

Psikrofil organizmaların pek çok soğuk aktif enzimleri ürettiği bilinmektedir ve bu enzimler de çeşitli biyoteknolojik ve endüstriyel uygulama alanına sahiptir. Endüstriyel enzimler için küresel pazar son birkaç yılda katlanarak büyümüştür ve bu eğilimin devam etmesi beklenmektedir. 2017 yılında 7 milyar dolar değerinde olan bu pazarın 2024 yılına kadar 10,5 milyar dolara ulaşması beklenmektedir (Srivastava and Srivastava, 2018). Bu enzimler arasında ise soğuk adaptasyonlu enzimler endüstride özellikle, moleküler biyolojide, gıda ve deterjan sektöründe uygulama alanları bulmuştur. Soğuğa adapte enzimlerin biyoteknolojik değeri, düşük ila orta sıcaklıklarda yüksek kcat (birim zamanda bir enzimin tek bir aktif bölgesi tarafından ürüne dönüştürülen substrat sayısı) değerine sahip olmalarından, yüksek sıcaklıklarda yüksek termolabilitelerinden ve organik çözücüler varlığında çalışabilmelerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca bu enzimler düşük sıcaklıkta mezofilik veya termofilik homologlarından daha verimli çalıştıklarından yıkama işlemleri gibi enzimlerin kullanıldığı çeşitli uygulamalarda da enerji tasarrufu sağlar. Düşük yıkama sıcaklığı ve iyileştirilmiş enerji tasarrufu arasındaki bağlantı, deterjan üreticileri tarafından gösterilmiş (Proctor and Gamble. 2009, Nielsen, 2005), yıkama sıcaklığının 40 °C'den 30 °C'ye düşürülmesi ile kullanılan elektrikte %30'luk tasarruf elde edildiği ve bunun da yıkama başına CO₂ salınımının 100 g azalmasına eşit olduğu bildirilmiştir (Nielsen, 2005).

Enzim pazarında toplam enzim satışının yaklaşık %40'lık payına deterjan enzimleri sahiptir. Deterjan formülasyonlarında amilaz, proteaz ve lipaz gibi dünyadaki toplam enzim marketinde ilk sıralarda gelen hidrolitik enzimlerin kullanımı bir asrı aşkın bir süredir devam etmektedir. İlk kez 1913'te Alman kimyacı Otto Röhm tarafından çamaşır deterjanlarında protein lekelerinin parçalanması için aktif bir bileşen olarak proteaz enzimi kullanılmıştır. İlk ticari deterjan olan Lipolase ise 1988 yılında Novo Nordisk tarafından piyasaya sürülmüş ve bu çalışmalardan sonra deterjan enzimlerine olan ilgi artarak günümüze kadar devam etmiştir (Kumar *et al.*, 1998). Bu enzimler bitki, hayvan, fungi ve bakteri gruplarında yaygın olarak bulunan enzimler olsalar da mikrobiyal kaynaklı enzimler ucuz ortamlarda, kısa sürede ve yüksek verimde elde edilebilir olmaları, ürün saflaştırma ve modifikasyonlarının kolay olması, geniş substrat spesifitelerinden dolayı tercih edilmektedir. Özellikle deterjan endüstrisinde ise psikrofil mikroorganizmalara ait soğuk-aktif hidrolitik enzimler, düşük sıcaklıklarda yıkama imkanı sunup lekelerin çıkarılması ve dolayısıyla enerji tüketiminin azaltılmasını sağlamaları

nedeniyle özellikle tercih edilmektedirler (Furhan *et al.*, 2019, Sahay and Chouhan 2018, Li *et al.*, 2014). Bu enzimlerin en önemli örnekleri soğukta aktive olabilen lipazlar, proteazlar ve amilazlar olarak sıralanabilir (Gerday *et al.*, 2000; Feller and Gerday, 2003; Roohi *et al.*, 2013; Maiangwa *et al.*, 2015; Arabaci and Arikan, 2018; Al-Ghanayem and Joseph, 2020).

Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda çeşitli biyoteknolojik öneme sahip yeni psikrofilik mikroorganizmaların keşfedilmesine yönelik çalışmaların popüleritesinin giderek artması şaşırtıcı değildir. Günümüzde böyle çalışmalar sıklıkla derin okyanus sedimentleri, yüksek dağ ekosistemleri, buzullar ve kutuplar gibi ekstrem soğuk habitatlarda gerçekleştirilmektedir (Karadayı *et al.*, 2022; Karadayı *et al.*, 2023).

Bu habitatlar içerisinde kendine has özellikleri ile Antarktika ön plana çıkmaktadır.

Antarktika ve Horseshoe Adasının Psikrofil Mikroorganizma Çalışmaları İçin Potansiyeli

Antarktika kıtalar arasında insan etkileşimi ve yerleşimi yönünden en kısa tarihçeye sahip olan bölgedir. Kıtaya ilk defa yaklaşık 200 yıl önce ayak basılmış ve kıta o günden günümüze çeşitli bilimsel çalışmalara konu olmuştur. Bu çalışmalar içerisinde biyolojik araştırmalar kıtanın ekstrem soğuk tabiatının yaşamsal faaliyetlere imkan vermeyeceği düşüncesi ile ihmal edilmiştir. Bununla birlikte içlerinde tundraların, yüksek dağ ekosistemlerinin ve kuzey kutbunun da bulunduğu çeşitli ekstrem soğuk habitatlarda son yıllarda yapılan biyoçeşitlilik araştırmalarının bu habitatların da canlılık yönünden aktif ve zengin alanlar olduğunu ortaya çıkarması, Antarktika'yı da benzer çalışmaların yapılması için önemli bir odak noktası haline getirmiştir (Peck *et al.*, 2005). Ayrıca, yukarıda örneklendiği şekilde psikrofillerin biyoteknolojideki öneminin de anlaşılması ile bu çalışmalar büyük ivme kazanmıştır.

Örneğin Christner *et al.* 2003'te yaptıkları çalışmalarında Antarktika'daki bir kriyokonit çukurundan aldıkları numuneleri biyoçeşitlilik yönünden incelemiş ve burada sekiz bakteri (*Acidobacterium*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Cytophagales*, *Gemmimonas*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* ve *Verrucomicrobia*), çeşitli metazoa örnekleri (nematodlar, tardigradlar ve rotiferler), bir fungus (*Choiromyces*), bir siliat (*Spathidium*) ve bir yeşil alg (*Pleurastrum*) grubuna ait çeşitli türlerin varlığını ortaya koymuşlardır. Benzer bir diğer çalışmada ise Antarktika McMurdo Dry Valley buzullarındaki kriyokonit çukurlarının biyoçeşitliliğin araştırılmış, çalışma sonunda siyanobakteri (*Chlorococcus*, *Chroococcus*, *Crinalium*, *Oscillatoria*, *Nostoc* ve *Spirulina*), rotifer (*Philodina gregaria* ve *Cephalodella catellina*), tardigrad (*Acutuncus antarcticus* ve *Hypsibius* spp.) ve siliatlara ait çok sayıda türe

rastlanmıştır (Porazinska *et al.* 2004). Gilichinsky *et al.* 2007’de Antarktik permafrostun mikrobiyal biyoçeşitliliğini incelemeye yönelik yaptıkları çalışmalarında bakteri türlerine (*Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Promicromonospora*, *Azotobacter*, *Aeromonas* ve *Pseudomonas*), küf türlerine (*Cladosporium*), maya türlerine (*Sporobolomyces salmonicolor*, *Corynebacterium* spp. ve *Rhodotorula mucilaginosa*), siyanobakteri ve mikroalg (*Gloeocapsae* sp., *Chroococcidiopsis* sp., *Pseudococcomyxa* sp., *Trebuxia* sp., *Mychonastes* sp., *Chlorococcum* sp. ve *Chlorella* sp.) türlerine rastlamışlardır. Lopatina *et al.* 2013’te yaptıkları araştırmalarında Antarktika’daki Druzhnaja ve Leningradskaja isimli iki Rus istasyonu çevresindeki yüzeysel alanlardan örneklemeler yapmış ve bu örneklerdeki bakteriyel toplulukların çeşitliliğini araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonucuna göre örnekleme yapılan alanlardaki yüzey karında *Variovorax*, *Flavisolibacter*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Aquabacterium*, *Aquaspirillum*, *Comamonas*, *Janthinobacterium*, *Caulobacter*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Curvibacter*, *Polaromonas*, *Bacillus*, *Pedobacter*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Mitsuria*, *Phaselicistis*, *Grimontella* ve *Arcicella* cinslerine ait çeşitli türlerin varlığı gösterilmiştir. Yine Lopatina önderliğinde yapılan daha güncel bir çalışmada Doğu Antarktika’daki dört tane Rus İstasyonu çevresindeki yüzey karından örneklemeler yapılmış ve bu örneklerdeki bakteriyel topluluklar metagenomik yöntemlerle incelenmiştir. Bu araştırmanın sonucuna göre örnekleme yapılan alanlardaki yüzey karının bakteriyel topluluğunu domine eden sınıfların Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Sphingobacteriia, Flavobacteriia, Cytophagia, Actinobacteria, Cyanobacteria ve Bacilli olduğu belirlenmiştir (Lopatina *et al.* 2016). Doğu Antarktika’da ki bir diğer güncel çalışmada ise Queen Maud Land bölgesindeki kriyokonitlerin biyoçeşitliliği araştırılmış ve alınan örneklerde yoğun olarak Proteobacteria, Cyanobacteria ve Actinobacteria gruplarına ait türlere rastlanmıştır. Bu çalışmada ayrıca bir örnekte *Nitrososphaera* arke cinsine ait türlerin varlığı da kaydedilmiştir (Lutz *et al.* 2019).

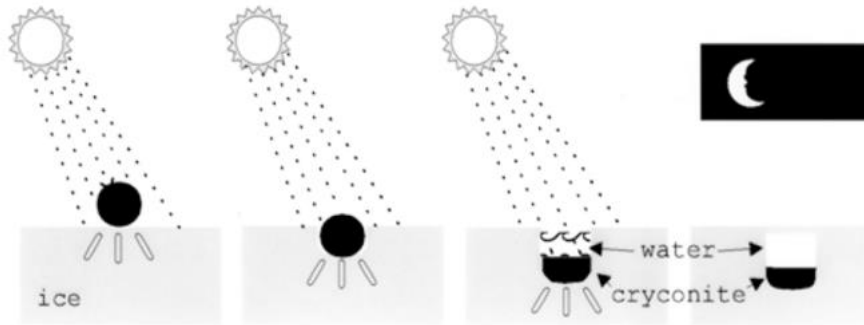
Verilen bu çalışmalardan da anlaşılacağı üzere Antarktika kıtası, tez çalışmamızın da temel konusunu oluşturan biyoçeşitlilik çalışmaları için oldukça yüksek potansiyele sahip bir kaynaktır. Ayrıca çalışma alanımız olan Horseshoe Adası ile ilgili literatürde herhangi bir mikrobiyal biyoçeşitlilik araştırmasının olmaması çalışmamızın özgün değerini ortaya koymaktadır.

Öte yandan literatürdeki çalışmaların genelinin supraglasyal habitatları kapsayacak şekilde kurgulanmış olması dikkat çekicidir. Çok az çalışmada derin deniz sedimentlerinden ve yer altı gölleri gibi subglasyal habitatlardan örneklemeler yapılarak alınabilen numunelerin

biyoçeşitlilikleri incelenebilmiştir. Dahası, mevcut çalışmalar incelendiğinde, subglasyal ortamlardaki mikrobiyal yaşamın çeşitliliği ve fizyolojisi hakkında toplanan verilerin çoğunun, kutup buzullarının sınırlarında toplanan subglasyal erime sularının incelenmesinden elde edildiği görülmektedir. Bununla birlikte asıl büyük buz kütlelerinin iç alanlarında bulunan biyoçeşitlilik hakkında çok az şey bilinmektedir. Bunun nedeni bu bölgelere ulaşımın ve örneklemenin oldukça zor olması olarak açıklanmaktadır (Doran *et al.*, 2008; Siegert *et al.*, 2012). Ayrıca, yine bu bozulmamış bölgelerde yapılan örneklemler sırasında çoğunlukla mikrobiyal ve kimyasal kontaminasyonların da gerçekleşmesi çalışmaların yapılmasını daha da zorlaştırmaktadır (Priscu *et al.*, 2003; Inman, 2005; Siegert *et al.*, 2007; Priscu *et al.* 2013). Bu bilgiler de göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda örnekleme alanları olarak supraglasyal habitatların seçilmesinin mikrobiyal biyoçeşitlilik çalışmalarına başlangıç için daha uygun olacağı açıkça görülmektedir. Bu çerçevede araştırmamız için örnekleme alanları olarak Horseshoe adasındaki kriyokonit habitatları tercih edilmiştir.

Psikrofil Kaynağı Olarak Kriyokonitler

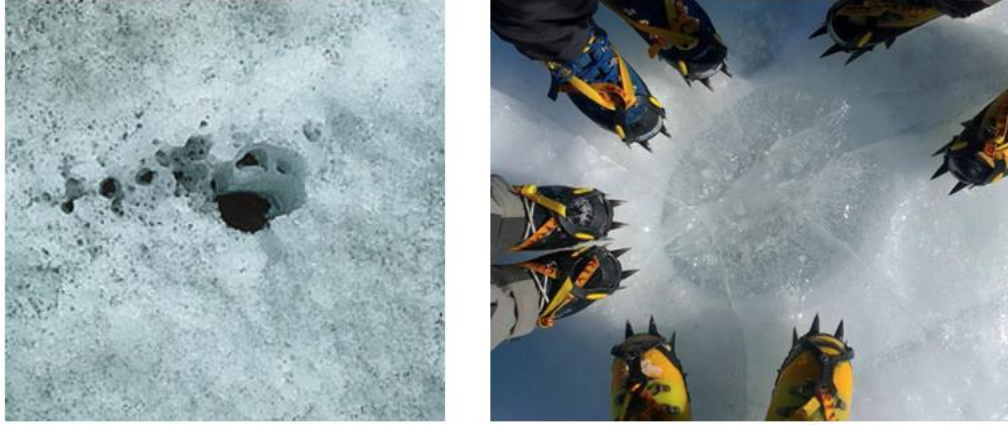
Kriyokonit çukurlar, bir buzulun yüzeyine düşen partiküllerin güneş ışınları tarafından ısıtılması ve altında eriyen buzun içine gömülmesiyle oluşur (Şekil 2).



Şekil 2. Kriyokonit çukurunun oluşumu (Christner *et al.* 2003)

Bu oluşumlar, partiküllerden ve erimiş buzuldan salınan materyallerle aşılınmış ve yapısında canlılığın devamını sağlayacak sıvı halde su içeren eşsiz ekosistemler olarak tanımlanmaktadır (Christner *et al.* 2003; Edwards and Cameron 2017). Günümüze kadar yapılan çok sayıdaki biyoçeşitlilik araştırması bu ekosistemlerin bakteri, arke, mikroalg, maya ve küf gibi çok sayıda prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizma yönünden zengin olduklarını

göstermiştir (Edwards and Cameron 2017; Lutz *et al.* 2019). Bununla birlikte, daha ılıman kuzey kutbu ve yüksek dağ zirvelerinde görülenlerden farklı olarak, Antarktika'daki kriyokonitler çoğunlukla onları dış ortamdan ayıran bir buz katmanı ile izole olmalarıyla dikkat çekmektedir (Şekil 3). Bu da daha yüksek korunuma sahip Antarktik kriyokonitleri, biyoçeşitlilik çalışmaları için mükemmel hedefler haline getirir.



Şekil 3. Açık (solda) ve kapalı (sağda) tip kriyokonit çukurları (Kuhn and Fountain 2017; Darcy *et al.* 2018)

Soğuk Habitatlarda Bilimsel Araştırma Yöntemleri

Çeşitli soğuk habitatlardan alınan örneklerle yapılan biyoçeşitlilik çalışmalarının öncülerinde genellikle ışık mikroskopisi ile doğrudan incelemeden yararlanılmıştır. Daha sonra bu çalışmaları kültüre bağımlı geleneksel mikrobiyoloji uygulamaları takip etmiştir. Ancak son yıllarda bu ekosistemlerdeki kültüre alınamayan mikrobiyal biyoçeşitliliğin göz ardı edilemeyecek kadar kıymetli olduğunun anlaşılması, güncel araştırmaların yönünü kültüre bağımlı olmayan metagenomik çalışmalara yöneltmiştir. Gasc *et al.*'a (2015) göre Dünya üzerinde yaşadığı tahmin edilen 10^6 prokaryotik türün yaklaşık %99'u standart protokoller kullanılarak kültüre edilememektedir. Yakın geçmişe kadar taksonomik karakterizasyon için saf mikroorganizma kültürleri gerektiğinden, bu durum prokaryotik biyoloji için bir “darboğaz” olarak anılagelmiştir (Schloss and Handelsman 2005). Bu darboğaz son yıllarda çevresel bir örnekteki mikrobiyal bir topluluğun tüm genomlarını izolasyon ve kültüre alma aşamalarına ihtiyaç duymaksızın genomik araçlar kullanarak analiz etmeyi içeren metagenomik alanının gelişmesiyle büyük ölçüde aşılmıştır. Böylece, metagenomik, belirli bir ortamdaki “gerçek” mikrobiyal çeşitlilik hakkında temel bilgiler sağlamış, mikrobiyal ekosistemlerin karmaşık işlevlerini ortaya koymuş, yeni genlerin ve bu genlerin ürünlerinin keşfinde etkin bir rol oynamıştır (Aliyu *et al.* 2017).

Günümüzde metagenomik araştırmaları iki temel yaklaşım çerçevesinde gerçekteştirilmektedir. Bunlardan ilki olan klonlama temelli konvensiyonel metagenomik uygulamaları DNA'nın doğrudan çevresel bir numuneden ekstraksiyonunu, DNA'nın uygun büyüklükteki fragmanlara ayrılmasını ve bu fragmanların uygun bir vektöre klonlanmasını içermektedir. Daha sonra bu klonlardan aynı türlere ait olanlar RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) gibi bir marker kullanılarak elemine edilmekte, seçilen eşsiz klonların sekans analizleri yapılmakta ve nihayetinde sekans bilgilerinin değerdendirilmesiyle süreç tamamlanmaktadır (Sjöling *et al.*, 2006; Sjöling and Cowan, 2008; De Maayer *et al.*, 2014). Öte yandan ikinci yaklaşım olan yeni nesil dizileme teknolojilerini içeren metagenomik uygulamaları örneklerdeki metagenomların dizi analizlerinin yapılmasını oldukça kolaylaştırmıştır. Bu sayede çevresel numunelerdeki biyoçeşitliliğin toplam DNA'sı klonlamaya ihtiyaç duyulmaksızın analiz edilebilmektedir (Reuter *et al.*, 2015).

Bahsi geçen iki temel metagenomik araştırma yaklaşımı birbiri ile kıyaslanacak olursa; konvensiyonel metagenomik uygulamaları Sanger sekanslama temellidir. Bu yöntemin en önemli avantajı nispeten uzun fragmanların (yaklaşık 1000 baz çifti) yüksek doğrulukla okunmasına olanak sağlamasıdır (Shendure Ji 2008). Öte yandan Sanger sekanslama tekniğinin yüksek maliyeti ve klon kütüphanelerinin oluşturulması için gerekli ağır iç yükü yöntemin en dikkat çekici dezavantajlarıdır (De Maayer *et al.*, 2014). İkinci yaklaşım olan yeni nesil metagenomik (NGS) araştırma yöntemleri ise yüksek çıktılı sekanslama (HTS: high-throughput sequencing) teknolojilerini içeren bir temel üzerine inşa edilmiştir. Bu yöntemlerin en belirgin avantajı HTS teknolojilerinin Sanger sekanslamaya göre çok daha düşük maliyetli olmasıdır. Ayrıca klonlama basamağına ihtiyaç duymadıklarından dolayı daha az iç gücü gerektirmeleri de bir diğer dikkat çekici özellikleridir. Bununla birlikte HTS teknolojilerinin en önemli problemi oldukça kısa fragmanların (50-500 baz çifti) dizi analizlerinin yapılmasına izin vermeleri olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca henüz gelişmekte olan bu teknolojilerin hatalı okuma oranlarının nispeten yüksek olduğu öne sürülmektedir. Bununla birlikte gelişen teknoloji ve analizde kullanılan algoritmalar sayesinde bu dezavantajlar önemli ölçüde elemine edilmiştir (Aliyu *et al.*, 2017). Böylelikle avantajlar ve dezavantajlar kıyaslandığında tez çalışmamızda takip edilen NGS temelli metagenomik araştırma yönteminin, çalışmanın nihai amacı olan “Antartika'ya yapılan TAE-VI bilimsel seferi kapsamında Horseshoe Adası'ndan örneklenen kriyokonitlerin mikrobiyal biyoçeşitliliğinin kültürden bağımsız yaklaşımlar kullanılarak aydınlatılması” hedefine başarıyla ulaşabilmesi için en uygun yaklaşım olduğu açıktır.

MATERYAL ve METOT

Çalışma Alanının Belirlenmesi ve Örneklemelerin Yapılması

Çalışma alanının merkez noktası olarak 6. Ulusal Antarktik Bilim Seferi (TAE-6) sonunda ulaşılan Antarktika Horseshoe Adası'ndaki Türk Bilimsel Araştırma Kampı çevresi ve Shoesmith Buzulu belirlenmiştir. Bununla birlikte adanın ulaşımına açık sahalarının tamamında kriyokonit arama çalışmaları sefer katılımcısı Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Karadayı tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda bulunan kriyokonit çukurlarından alınan numuneler aseptik koşullarda her bir alan için iki paralel olacak şekilde toplanmıştır. Tez çalışmasının bu basamağı kapsamında Horseshoe Adası'ndaki farklı lokasyonlardan toplam 10 alandan örneklem yapılmıştır. Kapalı kriyokonitlerin buz örtüsünün açılması için manuel buz burgusu kullanılmıştır. Numunelerin alındığı her alanın GPS verileri kayıt altına alınmış ve tüm örnekler ileriki çalışmaların yapılması için -25 °C – 2 °C arasında muhafaza sağlayan soğuk zincir ekipmanı (Dison New Generate Cooler – BC1500A) ile önce üsse daha sonra da Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Araştırma Laboratuvarı'na transfer edilmiştir.

Metagenomik Çalışmalar

Çevresel Numunelerden DNA İzolasyonu Çalışmaları

Her bir numuneden mikrobiyal biyoçeşitliliğinin araştırılması için kullanılacak olan toplam DNA UltraClean Mega DNA soil kit kullanılarak izole edilmiştir. Buna göre her bir numunenin izolasyonu için;

1. Kite bulunan 2 ml hacimli Bead Solution tüpü içerisine 1 gram numune konulmuş ve hafifçe vortekslenmiştir.
2. Tüpe 60 µl S1 çözeltisi eklenmiş ve birkaç kez alt üst edilerek karışması sağlanmıştır.
3. 200 µl IRS (Inhibitor Removal Solution) çözeltisi eklenmiş ve tüpler 10 dakika boyunca en yüksek hızda vortekslenmiştir.
4. 10.000 x g hızda 30 saniye boyunca santrifüjlenmiştir.
5. Süpernatant 2 ml hacimli toplama tüplerine transfer edilmiştir.
6. Tüplere 250 µl S2 çözeltisi eklenmiş ve 5 saniye vortekslenerek karıştırılmıştır.

7. 4 °C’de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
8. 10.000 x g hızda 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
9. 450 µl süpernatant 2 ml hacimli yeni toplama tüplerine transfer edilmiş ve üzerine S3 çözeltisinden 900 µl eklenerek 5 saniye boyunca vortekslenmiştir.
10. Karışımdan 700 µl alınarak Spin Filter’e yüklenmiş ve 10.000 x g hızda 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
11. 300 µl S4 çözeltisi eklenmiş ve 10.000 x g hızda 30 saniye boyunca santrifüjlenmiştir.
12. Tüpün tabanında biriken sıvı uzaklaştırılmıştır.
13. 10.000 x g hızda 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
14. Spin Filter yeni bir toplama tüpüne alınmış ve üzerine 50 µl S5 çözeltisi eklenmiştir.
15. 10.000 x g hızda 30 saniye boyunca santrifüjlenmiştir.
16. Spin Filter uzaklaştırılmış ve elde edilen DNA çözeltisi kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Mikrobiyal Biyoçeşitlilik Analizleri İçin Seçilen Primer Setleri ve PCR Koşulları

Prokaryotların tür tayininde kullanılacak olan 16S rRNA genine ait V3-V4 bölgeleri evrensel 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) ve 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC) primer dizileri ile amplifiye edilmiştir. Fungal ökaryotlar için ise 28S rRNA geni D1/D2 bölgesi F63-F (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) ve LR3-R (GGTCCGTGTTTCAAGACGG) primer dizileri ile çoğaltılmıştır.

Araştırmada kullanılan PCR koşulları aşağıdaki gibidir:

Initial denaturation: 95 °C’de 10 dakika

35 döngü:

Denaturation: 95 °C’de 30 saniye

Annealing: 53 °C’de 30 saniye

(10. döngüden sonra her bir döngüde 0,2 °C düşüş, touchdown PCR)

Extansion: 72 °C’de 30 saniye

Final extension: 72 °C’de 3 dakika

Sıcaklık 4 °C’ye düşürülerek reaksiyon tamamlanmıştır.

Kütüphane Hazırlama ve Dizileme Çalışmaları

PCR ampikon ürünleri için kütüphane hazırlama “Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, Cat. No.: FC-131-1096)” ile indeks işlemi ise “TG Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 Indices, 384 Samples - Cat. No.: TG-131-2001) ile yapılmıştır. Saflaştırma (purifikasyon) işlemleri AMPure XP beads (Beckman Coulter) ile yapılmıştır. Dizileme işlemi ise Miseq platformu (Illumina) ile paired-end (PE) 2×150 bazlık okumalar halinde gerçekleştirilmiştir.

Ham Verinin Biyoinformatik Analizi

Ham veri okumaları için (FASTQ) QC kontrolü yapılmış, gerekli görülmesi halinde trim işlemi uygulanmış, veriler yüksek hassasiyet ve hızda kısa DNA dizilerine taksonomik etiketler atayan Kraken Metagenomik sistemi ile OTU sınıflarına ayrılmıştır (Wood and Salzberg, 2014).

Taksonomik Sınıflandırma, Çeşitlilik Analizleri ve Raporlama

Taksonomi istatistiğinin yapılması için örneklerin tür seviyesindeki çeşitliliklerinin belirlenmesinde Shannon Index ve Simpsons Index değerlerinden faydalanılmıştır.

Örnekler arasındaki benzerlik ve farklılıkları göstermek principal coordinate analysis (PCoA) plot ve seyreltme eğrileri (rarefaction curves) analizleri kullanılmış ve sonuçlar görsel grafiklerle özetlenmiştir.

Yine raporlama aşamasında tür seviyesindeki dağılımlar ve diğer taksonomik seviyeleri (alem, şube, sınıf, takım, aile ve cins) kapsayan dağılımlar ayrı ayrı hesaplanarak raporlanmıştır.

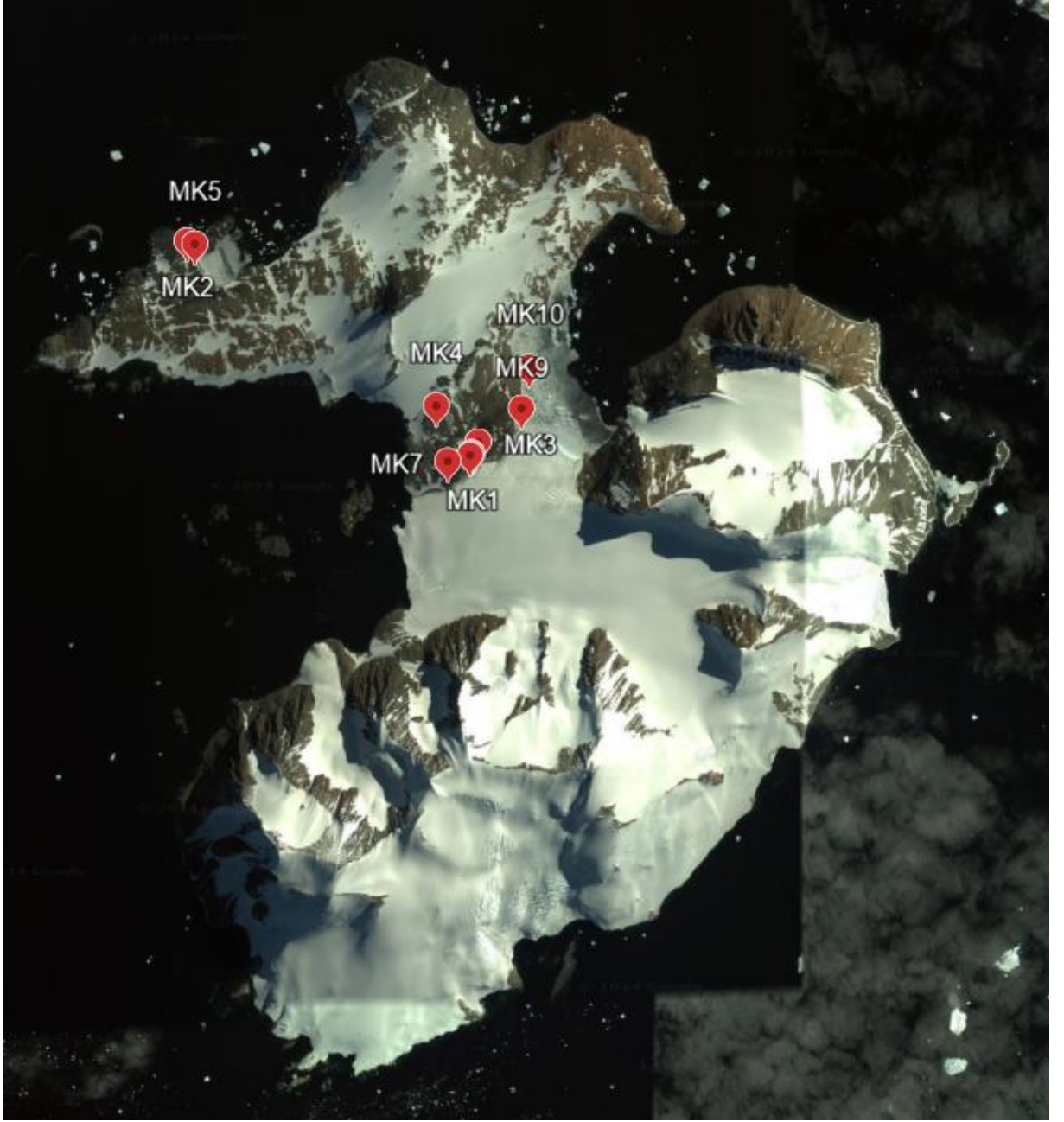
ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışma Alanının Belirlenmesi ve Örneklemelerin Yapılması

6. Ulusal Antarktik Bilim Seferi (TAE-6) kapsamında Horseshoe Adası'nda gerçekleştirilen arazi çalışmalarında tez çalışması için 10 farklı lokasyondan kriyokonit örneklemesi yapılmıştır (Şekil 4 ve Şekil 5). Yapılan örneklemelere ait bilgiler Tablo 1'de özetlenmiş ve gözlenen kriyokonit çukurlarının örnek görselleri Şekil 6'da verilmiştir.

Tablo 1. Arazi çalışmaları kapsamında yapılan örneklemelere ait bulgular.

Örnek Türü	Miktarı	Örnekleme Bölgesi	GPS Koordinatları	Saklama Koşulları	Saklandığı Yer
MK1-Kriyokonit	10 g	Horseshoe Island	67°50'01.5"G/67°13'12.3"B	+4 / -20 °C	Atatürk Üniversitesi
MK2-Kriyokonit	10 g	Horseshoe Island	67°48'39.2"G/67°18'01.3"B	+4 / -20 °C	Atatürk Üniversitesi
MK3-Kriyokonit	10 g	Horseshoe Island	67°49'56.4"G/67°13'04.2"B	+4 / -20 °C	Atatürk Üniversitesi
MK4-Kriyokonit	10 g	Horseshoe Island	67°49'43.0"G/67°13'45.3"B	+4 / -20 °C	Atatürk Üniversitesi
MK5-Kriyokonit	10 g	Horseshoe Island	67°48'40.1"G/67°17'53.1"B	+4 / -20 °C	Atatürk Üniversitesi
MK6-Kriyokonit	10 g	Horseshoe Island	67°50'01.5"G/67°13'12.6"B	+4 / -20 °C	Atatürk Üniversitesi
MK7-Kriyokonit	10 g	Horseshoe Island	67°50'03.8"G/67°13'35.4"B	+4 / -20 °C	Atatürk Üniversitesi
MK8-Kriyokonit	10 g	Horseshoe Island	67°50'00.5"G/67°13'11.2"B	+4 / -20 °C	Atatürk Üniversitesi
MK9-Kriyokonit	10 g	Horseshoe Island	67°49'43.5"G/67°12'19.9"B	+4 / -20 °C	Atatürk Üniversitesi
MK10-Kriyokonit	10 g	Horseshoe Island	67°49'27.8"G/67°12'12.1"B	+4 / -20 °C	Atatürk Üniversitesi



Şekil 4. Horseshoe Adası Antarktik tip kriyokonit örnekleme noktaları.



Şekil 5. Altıncı Ulusal Antarktik Bilim Seferi (TAE-6) kapsamında Horseshoe Adası'nda gerçekleştirilen arazi ve örnekleme çalışmaları.

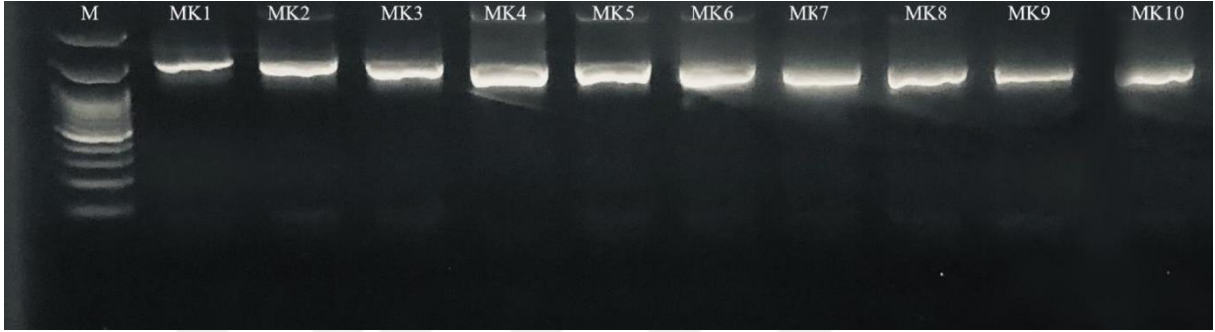


Şekil 6. Örneklemeye yapılan kriyokonitlere ait örnek görüntüler.

Metagenomik Çalışmalar

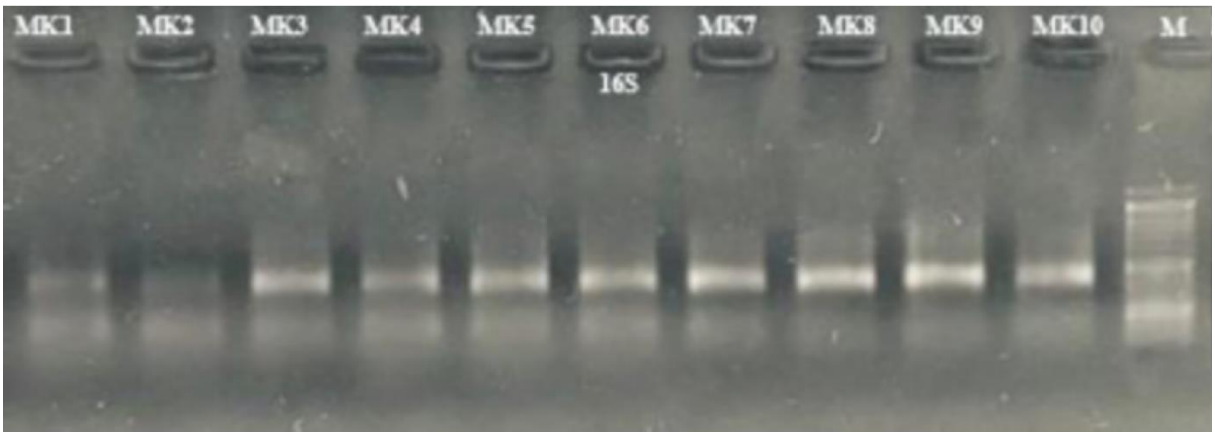
Çevresel DNA izolasyonu ve PCR Çalışmaları

Horseshoe Adası kriyokonit oluşumlarının mikrobiyal biyoçeşitliliğinin kültürden bağımsız metagenomik yaklaşım kullanılarak aydınlatılması amacıyla 10 numune seçilmiştir. Bu numunelerden çevresel DNA izolasyonu başarıyla yapılmış ve sonuçlar Şekil 5’de gösterilmiştir.

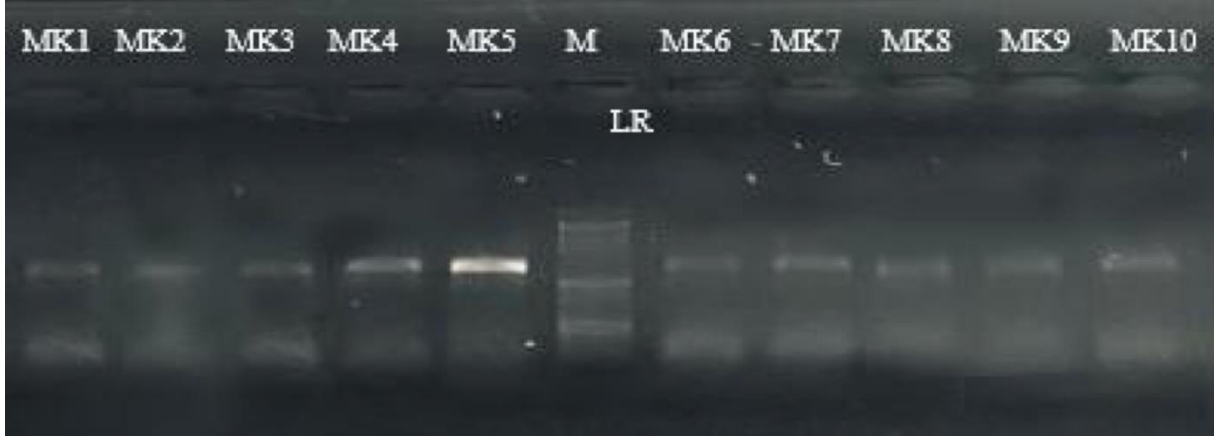


Şekil 7. Kriyokonit numunelerinde elde edilen çevresel DNA’ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Elde edilen çevresel DNA’lar ile 16S 341F / 805R, 28S F63-F / LR3-R ve 18S V9-F / V9-R primer setleri kullanılarak PCR uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen PCR ürünlerine ait görüntüler Şekil 6 ve Şekil 7’de verilmiştir.



Şekil 8. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 9. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

NGS Dizileme İstatistikleri ve Biyoinformatik Analizler

16S 341F / 805R ve 28S F63-F / LR3-R primer setleri kullanılarak çoğaltılan PCR ürünlerinin dizileme işlemleri NGS ile tamamlanmıştır. Bu aşamada elde edilen dizileme istatistikleri Tablo 2 ve Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 2. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin dizileme istatistiği.

Örnek	Okuma Sayısı	Ortalama Okuma Uzunluğu	Sınıflanmış okuma
MK1-16s	5139	144.1	4850 / 94.38%
MK2-16s	7955	141.3	7348 / 92.37%
MK3-16s	14008	125.5	10119 / 72.24%
MK4-16s	9384	143.8	8771 / 93.47%
MK5-16s	7390	148.1	7208 / 97.54%
MK6-16s	17435	133.9	13958 / 80.06%
MK7-16s	10196	137.7	8630 / 84.64%
MK8-16s	10370	136.0	8747 / 84.35%
MK9-16s	6969	121.7	4515 / 64.79%
MK10-16s	8297	144.5	7699 / 92.79%

Tablo 3. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin dizileme istatistiği.

Örnek	Okuma Sayısı	Ortalama Okuma Uzunluğu	Sınıflanmış okuma
MK1-28s	8601	123.1	8601 / 100.00%
MK2-28s	13942	123.9	13942 / 100.00%
MK3-28s	14029	121.7	14029 / 100.00%
MK4-28s	44575	124.1	44563 / 99.97%
MK5-28s	10006	127.4	10006 / 100.00%
MK6-28s	8216	124.0	8216 / 100.00%
MK7-28s	10890	128.5	10890 / 100.00%
MK8-28s	19289	119.4	19289 / 100.00%
MK9-28s	62286	122.3	62259 / 99.96%
MK10-28s	11803	138.2	11803 / 100.00%

16S 341F / 805R primer seti kullanılarak çoğaltılan PCR ürünlerinin taksonomi istatistikleri Tablo 4, Tablo 5 ve Şekil 8’de özetlenmiştir.

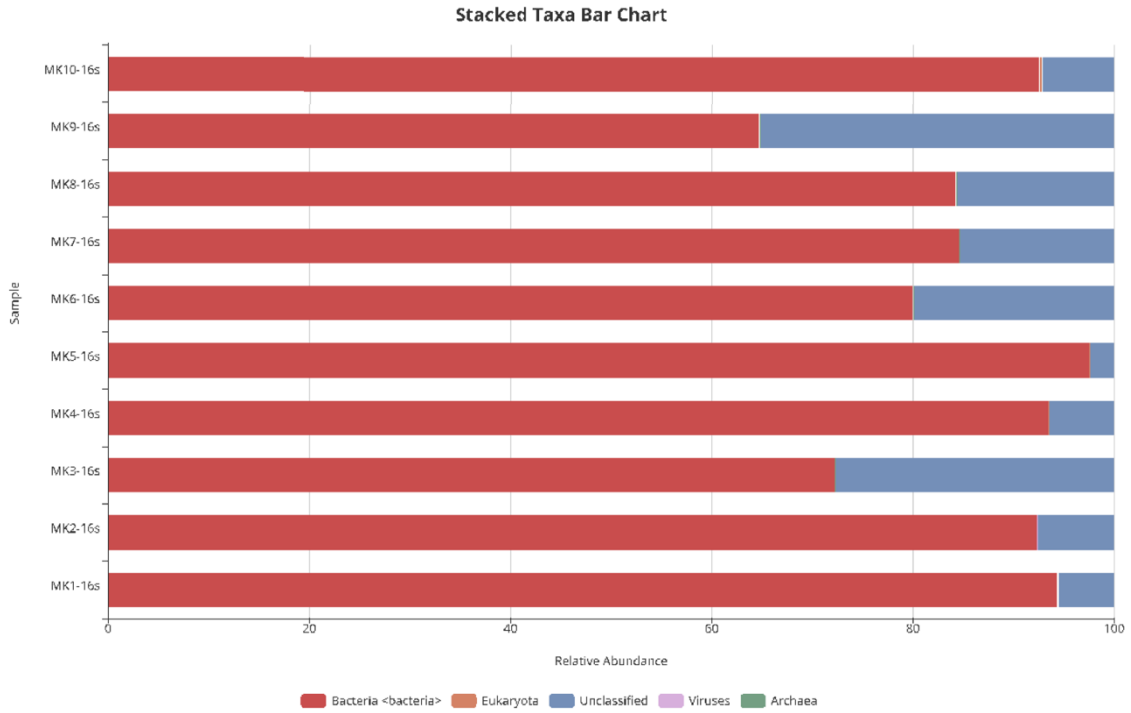
Tablo 4. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin taksonomi istatistiği.

Tür seviyesinde çeşitlilik		
Örnek	Shannon Index (H) / (H / LN (N))*	Simpsons Index (D-1)*
MK1-16s	4.333 / 0.7809	0.97
MK2-16s	4.696 / 0.7835	0.9769
MK3-16s	4.287 / 0.6958	0.9358
MK4-16s	4.344 / 0.7251	0.9486
MK5-16s	2.982 / 0.5241	0.7956
MK6-16s	4.405 / 0.7069	0.9644
MK7-16s	4.531 / 0.7431	0.9517
MK8-16s	4.312 / 0.7165	0.9607
MK9-16s	3.245 / 0.5978	0.8668
MK10-16s	2.284 / 0.4426	0.7468

* Örneklerdeki tür çeşitliliğini gösterir. Shannon indeksi genellikle 1.5-3.5 arasında bir değer alır ve bu indeks arttıkça çeşitlilik de artar. Simpsons indeksi 0-1 arasında bir değer alır. 1 çeşitliliği, 0 ise çeşitlilik yok anlamına gelir.

Tablo 5. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin sınıflandırma istatistiği.

Örnek	Alem	Şube	Sınıf	Takım	Aile	Cins	Tür
MK1-16s	94.38%	93.48%	92.14%	91.46%	75.17%	64.21%	30.63%
MK2-16s	92.37%	88.80%	87.24%	84.58%	70.86%	61.97%	36.81%
MK3-16s	72.24%	69.49%	66.99%	66.71%	59.28%	50.60%	32.15%
MK4-16s	93.47%	92.88%	91.56%	91.47%	77.80%	60.38%	23.04%
MK5-16s	97.54%	96.90%	60.45%	94.88%	85.93%	81.04%	62.57%
MK6-16s	80.06%	77.87%	76.51%	76.05%	64.58%	55.55%	32.07%
MK7-16s	84.64%	81.40%	80.07%	78.91%	70.98%	60.37%	25.90%
MK8-16s	84.35%	78.51%	76.58%	75.55%	63.80%	53.83%	34.27%
MK9-16s	64.79%	54.81%	52.91%	50.28%	48.08%	43.87%	31.34%
MK10-16s	92.79%	92.36%	92.20%	91.85%	87.97%	84.44%	45.34%



Şekil 10. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerindeki biyoçeşitliliğin alem seviyesinde dağılım grafiği.

28S F63-F / LR3-R primer seti kullanılarak çoğaltılan PCR ürünlerinin taksonomi istatistikleri Tablo 6, Tablo 7, Şekil 9 ve Şekil 10'da özetlenmiştir.

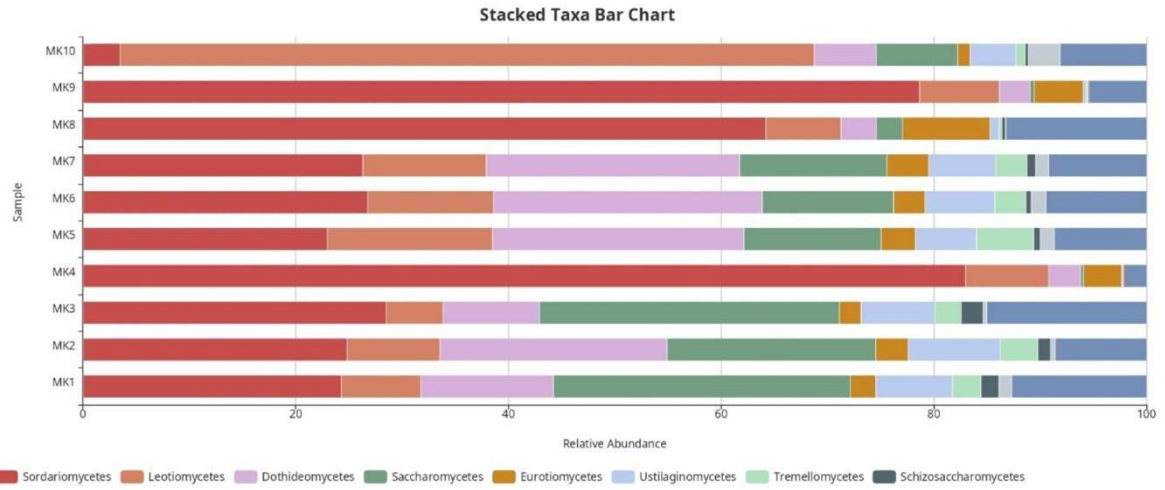
Tablo 6. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin taksonomi istatistiği.

Tür seviyesinde çeşitlilik		
Örnek	Shannon Index (H) / (H / LN (N))*	Simpsons Index (D-1)*
MK1-28s	2.574 / 0.6932	0.8904
MK2-28s	2.363 / 0.6136	0.8441
MK3-28s	2.594 / 0.6815	0.8998
MK4-28s	2.198 / 0.6745	0.8565
MK5-28s	2.167 / 0.5798	0.7989
MK6-28s	2.196 / 0.5875	0.7999
MK7-28s	2.242 / 0.576	0.8127
MK8-28s	2.542 / 0.7208	0.8998
MK9-28s	2.295 / 0.6456	0.8709
MK10-28s	1.065 / 0.2996	0.4136

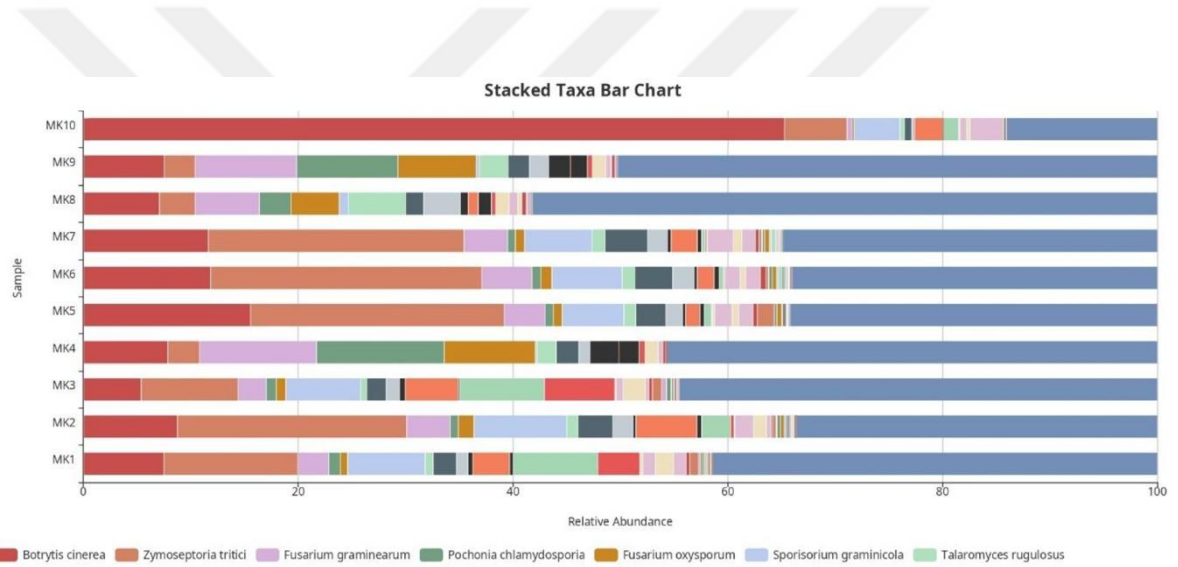
* Örneklerdeki tür çeşitliliğini gösterir. Shannon indeksi genellikle 1.5-3.5 arasında bir değer alır ve bu indeks arttıkça çeşitlilik de artar. Simpsons indeksi 0-1 arasında bir değer alır. 1 çeşitliliği, 0 ise çeşitlilik yok anlamına gelir.

Tablo 7. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin sınıflandırma istatistiği.

Örnek	Alem	Şube	Sınıf	Takım	Aile	Cins	Tür
MK1-28s	100.00%	100.00%	87.29%	85.86%	74.99%	71.91%	58.56%
MK2-28s	100.00%	100.00%	91.38%	90.00%	86.18%	84.97%	66.34%
MK3-28s	100.00%	100.00%	84.94%	83.26%	70.90%	67.67%	55.44%
MK4-28s	99.97%	99.95%	97.91%	96.87%	89.74%	89.43%	54.33%
MK5-28s	100.00%	100.00%	91.30%	89.63%	85.72%	84.85%	65.80%
MK6-28s	100.00%	100.00%	90.51%	89.05%	84.79%	83.95%	65.94%
MK7-28s	100.00%	100.00%	90.79%	89.63%	85.49%	84.62%	65.13%
MK8-28s	100.00%	100.00%	86.75%	83.14%	65.25%	64.60%	41.76%
MK9-28s	99.96%	99.94%	94.56%	92.70%	82.14%	81.74%	49.72%
MK10-28s	100.00%	100.00%	91.84%	91.60%	90.50%	90.37%	85.92%



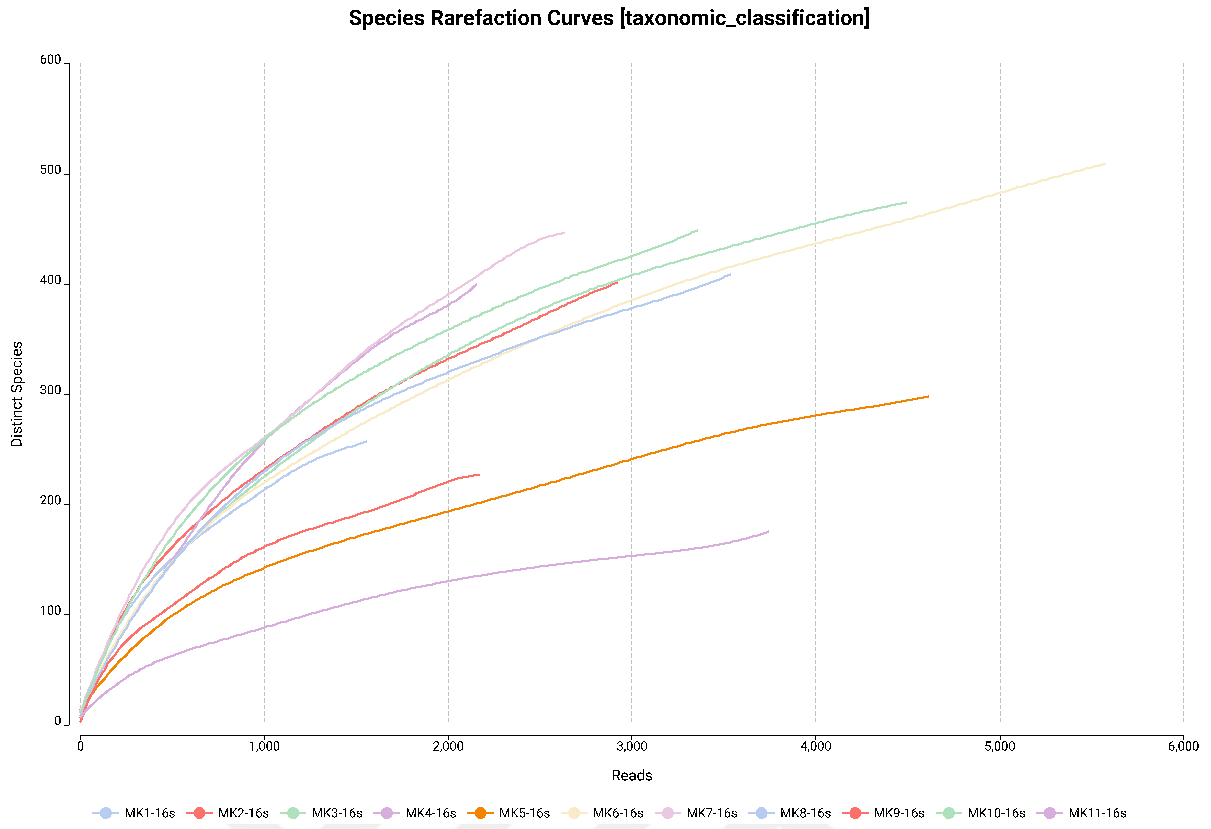
Şekil 11. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerindeki biyoçeşitliliğin takım seviyesinde dağılım grafiği.



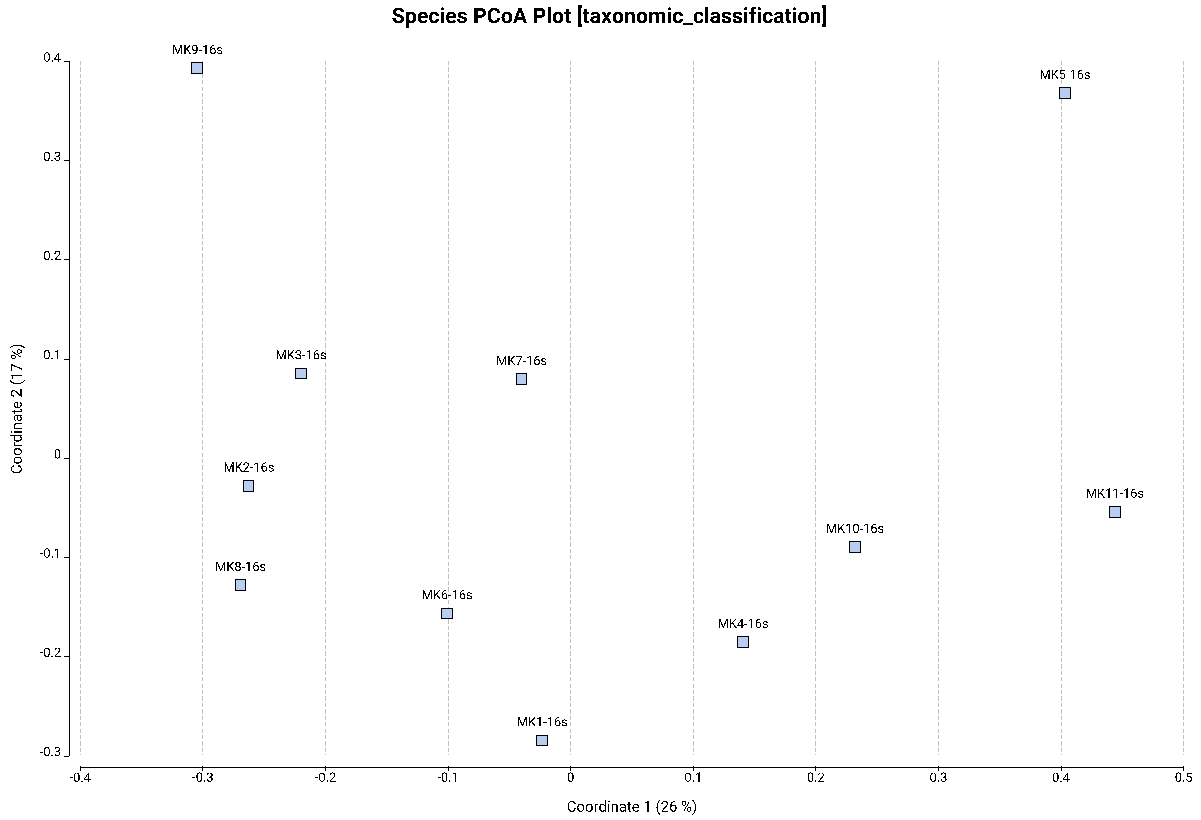
Şekil 12. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerindeki biyoçeşitliliğin tür seviyesinde dağılım grafiği.

Biyçeşitlilik Analizleri

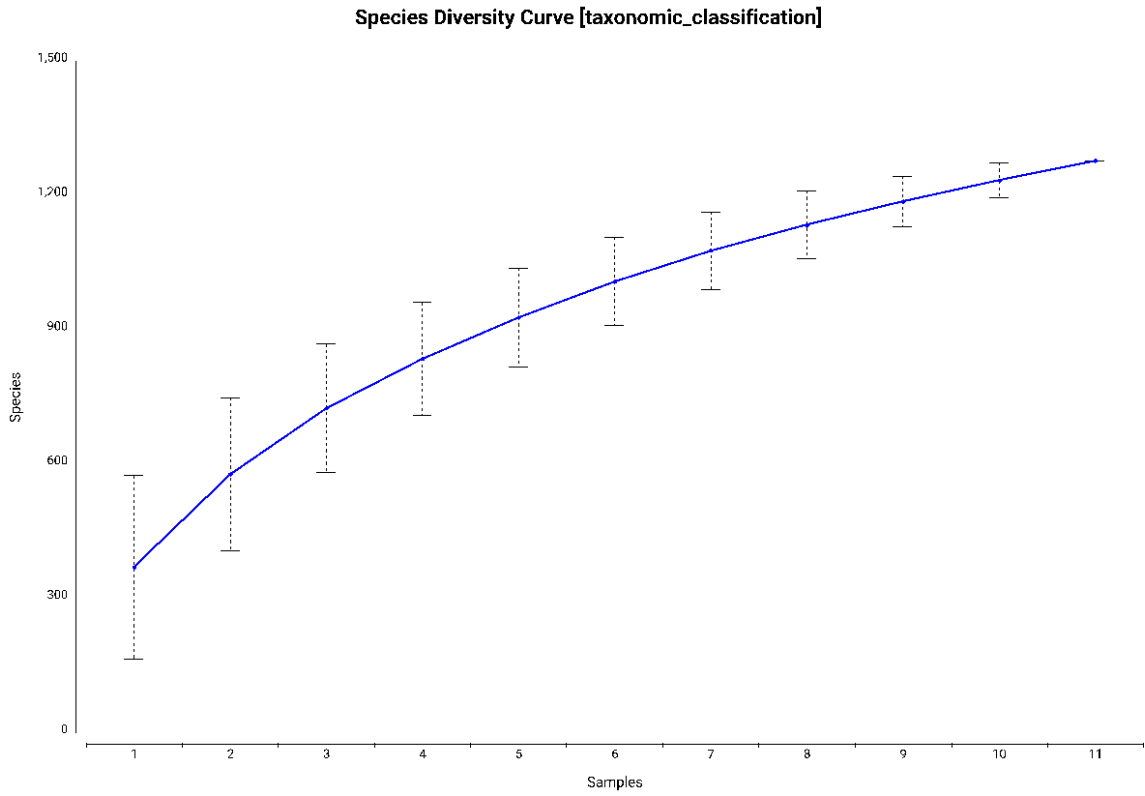
Antarktik tip kriyokonit örneklerinin 16S 341F / 805R, 28S F63-F / LR3-R primer setleri kullanılarak çoğaltılan PCR ürünlerindeki biyoçeşitlilik analizlerine ait bulgular Şekil 6 ve 8’de verilmiştir. Ayrıca, baskın gruplara ait taksonomik dağılımlar Tablo 2, 4 ve 5’de özetlenmiştir.



Şekil 13. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin seyreltme eğrileri.



Şekil 14. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin PCoA plot grafiği.

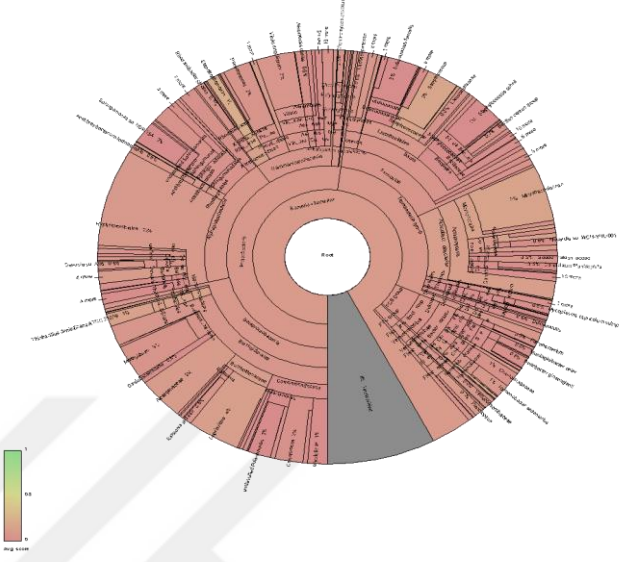


Şekil 15. 16S 341F / 805R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin biyoçeşitlilik grafiği.

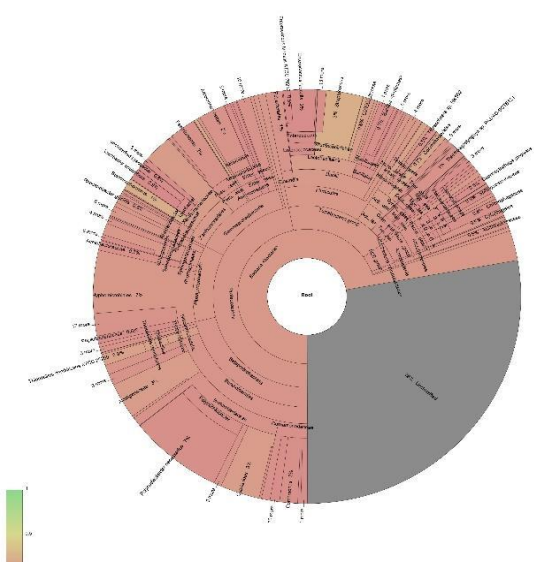
Tablo 8. MK-1 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK1-16S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Clostridium estertheticum</i>	165	10.48	
<i>Acidibrevibacterium fodinaquatile</i>	95	6.04	
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	95	6.04	
<i>Rhodanobacter glycinis</i>	66	4.19	
<i>Granulicella sp. WH15</i>	66	4.19	
<i>Enterococcus faecalis</i>	48	3.05	
<i>Mucilaginibacter celer</i>	44	2.8	
<i>Komagataeibacter xylinus</i>	39	2.48	
<i>Ralstonia pickettii</i>	38	2.41	
<i>Hoeflea sp. IMCC20628</i>	38	2.41	

Tablo 9. MK-2 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK2-16S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Vibrio anguillarum</i>	217	7.41	
<i>Enterococcus faecalis</i>	211	7.21	
<i>Staphylococcus cohnii</i>	173	5.91	
<i>Sphingomonas</i> sp. HDW15A	138	4.71	
<i>Hymenobacter sedentarius</i>	80	2.73	
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	78	2.66	
<i>Aeromonas caviae</i>	65	2.22	
<i>Pedobacter ginsengisoli</i>	65	2.22	
<i>Rhodanobacter glycinis</i>	53	1.81	
<i>Ralstonia pickettii</i>	50	1.71	

Tablo 10. MK-3 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK3-16S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Polynucleobacter necessarius</i>	998	22.16	
<i>Enterococcus faecalis</i>	344	7.64	
<i>Aeromonas caviae</i>	284	6.31	
<i>Thermoleptolyngbya</i> sp. PKUAC-SCTB121	144	3.2	
<i>Lysobacter antibioticus</i>	122	2.71	
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	122	2.71	
<i>Rhodanobacter glycinis</i>	83	1.84	
<i>Tetrasphaera</i> sp. HKS02	74	1.64	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	69	1.53	
<i>Granulicella</i> sp. WH15	55	1.22	

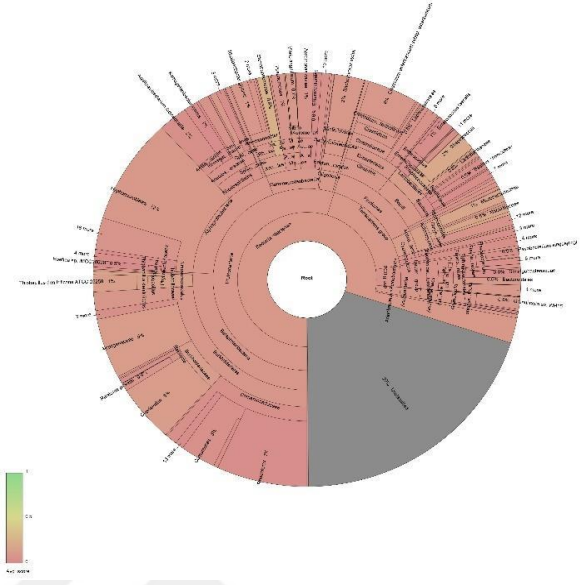
Tablo 11. MK-4 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK4-16S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Clostridium estertheticum</i>	386	17.85	
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	168	7.77	
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	166	7.68	
<i>Ralstonia pickettii</i>	98	4.53	
<i>Staphylococcus aureus</i>	97	4.49	
<i>Enterococcus faecalis</i>	51	2.36	
<i>Aeromonas caviae</i>	50	2.31	
<i>Hoeflea</i> sp. IMCC20628	38	1.76	
<i>Oscillatoria nigro-viridis</i>	32	1.48	
<i>Comamonas</i> sp. NLF-7-7	31	1.43	

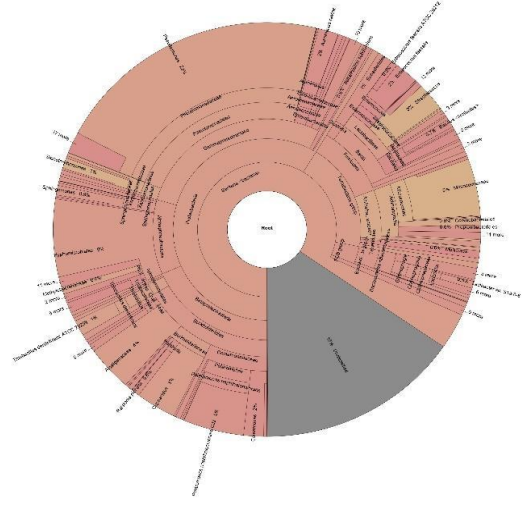
Tablo 12. MK-5 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK5-16S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Thermoleptolyngbya</i> sp. PKUAC-SCTB121	2021	43.71	
<i>Paludibacter propionigenes</i>	272	5.88	
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	263	5.69	
<i>Hydrogenophaga</i> sp. PAMC20947	229	4.95	
<i>Gemmatimonas phototrophica</i>	156	3.37	
<i>Pseudanabaena</i> sp. ABRG5-3	123	2.66	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	109	2.36	
<i>Clostridium estertheticum</i>	78	1.69	
<i>Chamaesiphon minutus</i>	72	1.56	
<i>Algoriphagus machipongonensis</i>	60	1.3	

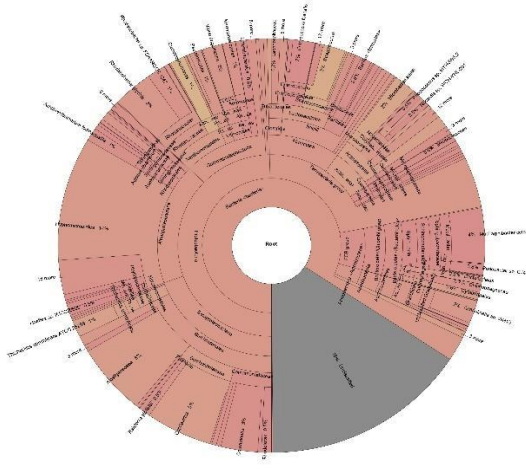
Tablo 13. MK-6 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK6-16S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Clostridium estertheticum</i>	665	11.89	
<i>Bacteriovorax stolpii</i>	391	6.99	
<i>Acidibrevibacterium fodinaquatile</i>	383	6.85	
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	237	4.24	
<i>Aeromonas caviae</i>	231	4.13	
<i>Enterococcus faecalis</i>	231	4.13	
<i>Rhodanobacter glycinis</i>	228	4.08	
<i>Komagataeibacter xylinus</i>	182	3.26	
<i>Granulicella</i> sp. WH15	164	2.93	
<i>Vibrio anguillarum</i>	122	2.18	

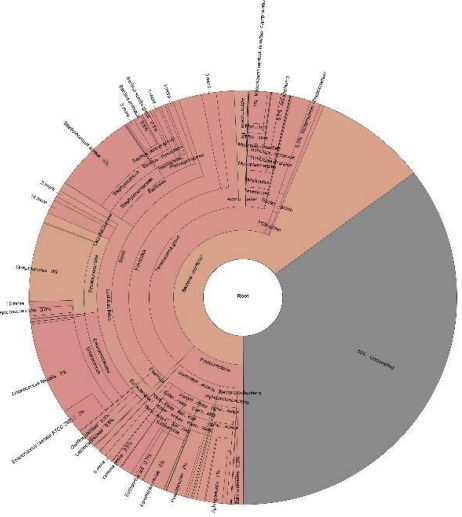
Tablo 14. MK-7 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK7-16S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	468	17.72	
<i>Enterococcus faecalis</i>	234	8.86	
<i>Aeromonas caviae</i>	156	5.91	
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	123	4.66	
<i>Ralstonia pickettii</i>	64	2.42	
<i>Lacibacter</i> sp. S13-6-6	54	2.04	
<i>Planococcus</i> sp. MB-3u-03	40	1.51	
<i>Pseudomonas</i> sp. SWI6	37	1.4	
<i>Gemmatimonas phototrophica</i>	35	1.33	
<i>Mycoplasma capricolum</i>	29	1.1	

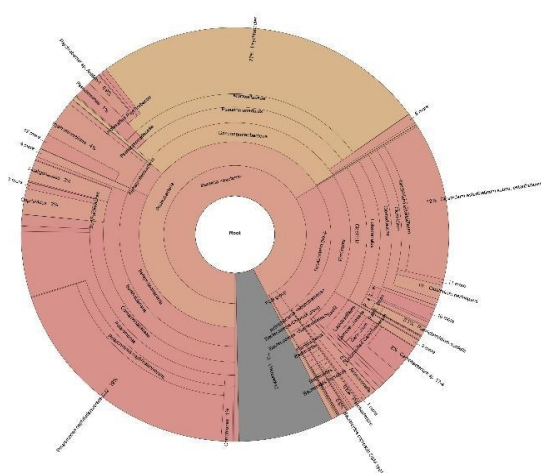
Tablo 15. MK-8 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

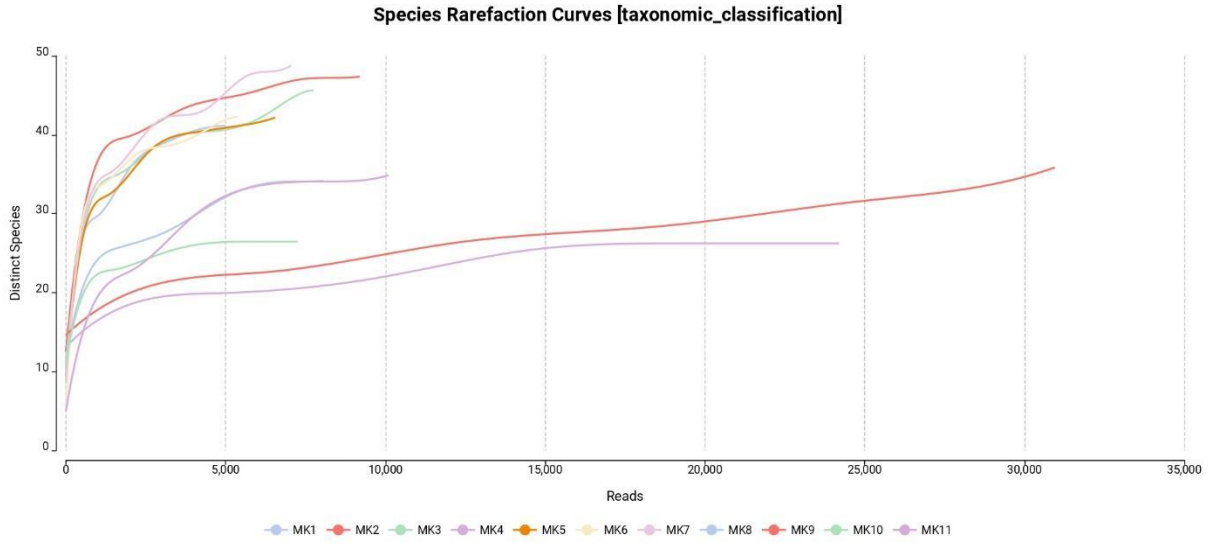
MK8-16S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Mucilaginibacter celer</i>	448	12.61	
<i>Rhodanobacter glycinis</i>	313	8.81	
<i>Enterococcus faecalis</i>	206	5.8	
<i>Granulicella</i> sp. WH15	184	5.18	
<i>Vibrio anguillarum</i>	156	4.39	
<i>Rhodanobacter</i> sp. FDAARGOS 1247	144	4.05	
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	135	3.8	
<i>Acidibrevibacterium</i> <i>fodinaquatile</i>	107	3.01	
<i>Aeromonas caviae</i>	102	2.87	
<i>Pedobacter</i> sp. CJ43	84	2.36	

Tablo 16. MK-9 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

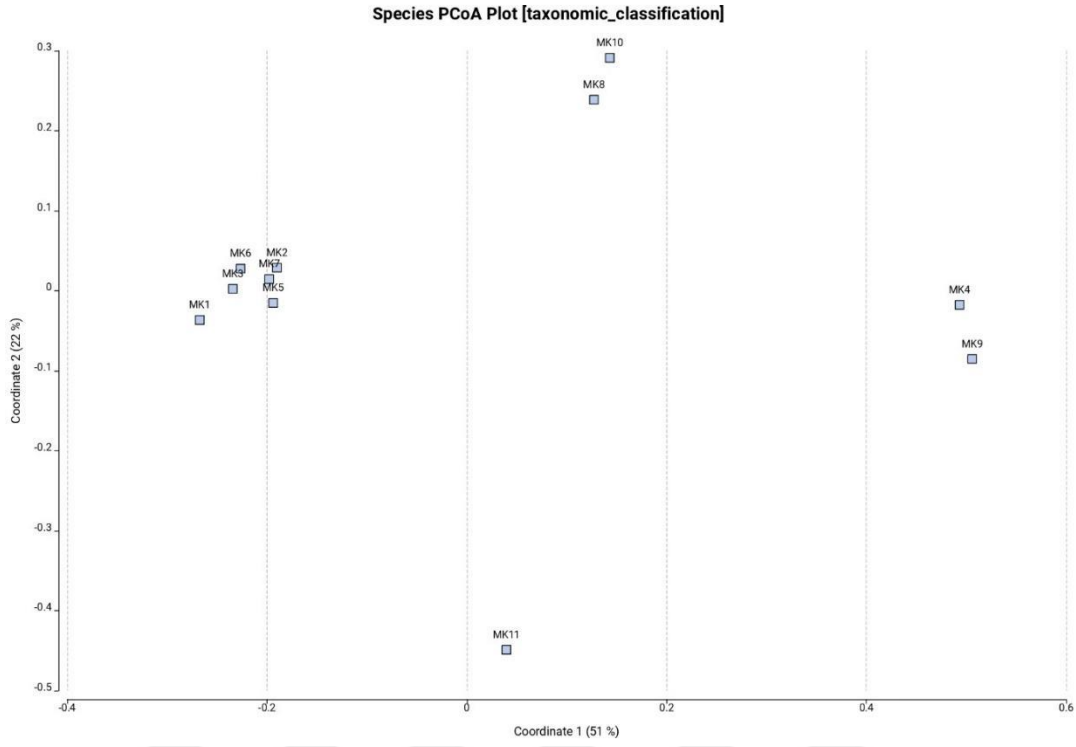
MK9-16S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Enterococcus faecalis</i>	635	29.08	
<i>Staphylococcus aureus</i>	440	20.15	
<i>Aeromonas caviae</i>	120	5.49	
<i>Mycoplasma capricolum</i>	96	4.4	
<i>Yersinia pestis</i>	53	2.43	
<i>Escherichia coli</i>	47	2.15	
<i>Streptococcus iniae</i>	44	2.01	
<i>Bacillus anthracis</i>	42	1.92	
<i>Erysipelothrix larvae</i>	33	1.51	
<i>Bacillus cereus</i>	26	1.19	

Tablo 17. MK-10 kodlu kriyokonit örneğinin 16S 341F / 805R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

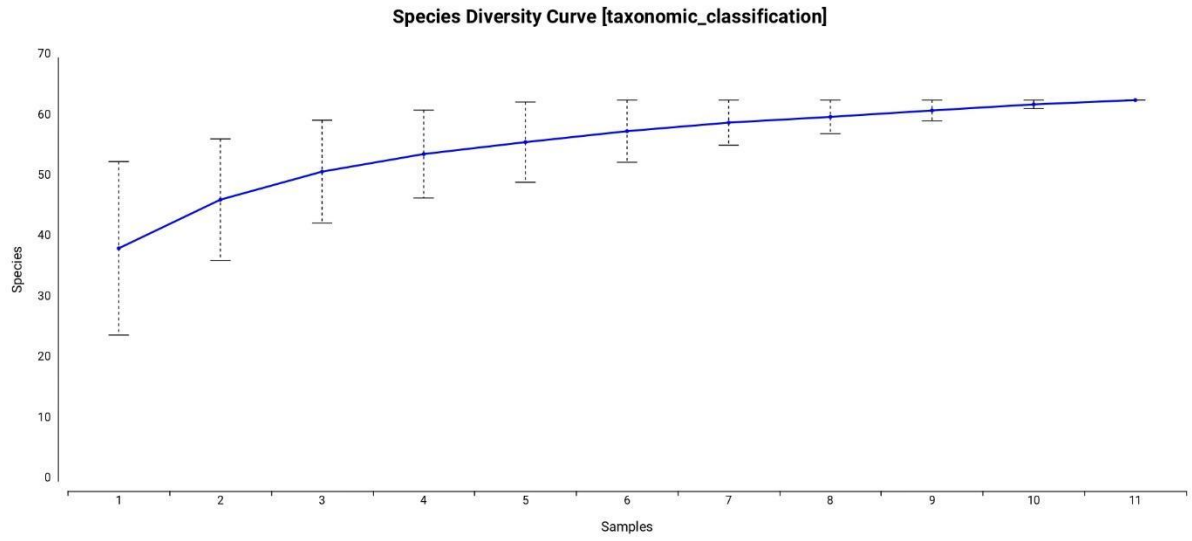
MK10-16S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	1576	41.89	
<i>Clostridium estertheticum</i>	1016	27.01	
<i>Carnobacterium</i> sp. 17-4	188	5.0	
<i>Clostridium perfringens</i>	92	2.45	
<i>Psychrobacter</i> sp. AntiMn-1	78	2.07	
<i>Paenibacillus sordellii</i>	58	1.54	
<i>Bacteroides coprosuis</i>	52	1.38	
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	41	1.09	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	37	0.98	
<i>Lacrimispora saccharolytica</i>	35	0.93	



Şekil 13. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin seyreltme eğrileri.



Şekil 16. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin PCoA plot grafiği.



Şekil 17. 28S F63-F / LR3-R primer seti ile üretilen PCR ürünlerinin biyoçeşitlilik grafiği.

Tablo 18. MK-1 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK1-28S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Ascomycota</i>	7588	88.22	
<i>Basidiomycota</i>	1013	11.78	
<i>Bacteroidetes</i> < <i>Bacteroidetes</i> >	0	0.0	
<i>Streptophyta</i>	0	0.0	
<i>Actinobacteria</i> < <i>actinobacteria</i> >	0	0.0	
<i>Proteobacteria</i>	0	0.0	
<i>Euryarchaeota</i>	0	0.0	
<i>Chordata</i>	0	0.0	

Tablo 19. MK-2 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK2-28S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Ascomycota</i>	12074	86.6	
<i>Basidiomycota</i>	1868	13.4	
<i>Bacteroidetes</i> < <i>Bacteroidetes</i> >	0	0.0	
<i>Streptophyta</i>	0	0.0	
<i>Actinobacteria</i> < <i>actinobacteria</i> >	0	0.0	
<i>Proteobacteria</i>	0	0.0	
<i>Euryarchaeota</i>	0	0.0	
<i>Chordata</i>	0	0.0	

Tablo 20. MK-3 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK3-28S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Ascomycota</i>	12595	89.78	
<i>Basidiomycota</i>	1434	10.22	
<i>Bacteroidetes</i> < <i>Bacteroidetes</i> >	0	0.0	
<i>Streptophyta</i>	0	0.0	
<i>Actinobacteria</i> < <i>actinobacteria</i> >	0	0.0	
<i>Proteobacteria</i>	0	0.0	
<i>Euryarchaeota</i>	0	0.0	
<i>Chordata</i>	0	0.0	

Tablo 21. MK-4 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK4-28S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Ascomycota</i>	44420	99.7	
<i>Basidiomycota</i>	129	0.29	
<i>Streptophyta</i>	2	0.0	
<i>Euryarchaeota</i>	2	0.0	
<i>Bacteroidetes</i> < <i>Bacteroidetes</i> >	0	0.0	
<i>Actinobacteria</i> < <i>actinobacteria</i> >	0	0.0	
<i>Proteobacteria</i>	0	0.0	
<i>Chordata</i>	0	0.0	

Tablo 22. MK-5 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK5-28S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Ascomycota</i>	8650	86.45	
<i>Basidiomycota</i>	1356	13.55	
<i>Bacteroidetes</i> < <i>Bacteroidetes</i> >	0	0.0	
<i>Streptophyta</i>	0	0.0	
<i>Actinobacteria</i> < <i>actinobacteria</i> >	0	0.0	
<i>Proteobacteria</i>	0	0.0	
<i>Euryarchaeota</i>	0	0.0	
<i>Chordata</i>	0	0.0	

Tablo 23. MK-6 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK6-28S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Ascomycota</i>	7232	88.02	
<i>Basidiomycota</i>	984	11.08	
<i>Bacteroidetes</i> < <i>Bacteroidetes</i> >	0	0.0	
<i>Streptophyta</i>	0	0.0	
<i>Actinobacteria</i> < <i>actinobacteria</i> >	0	0.0	
<i>Proteobacteria</i>	0	0.0	
<i>Euryarchaeota</i>	0	0.0	
<i>Chordata</i>	0	0.0	

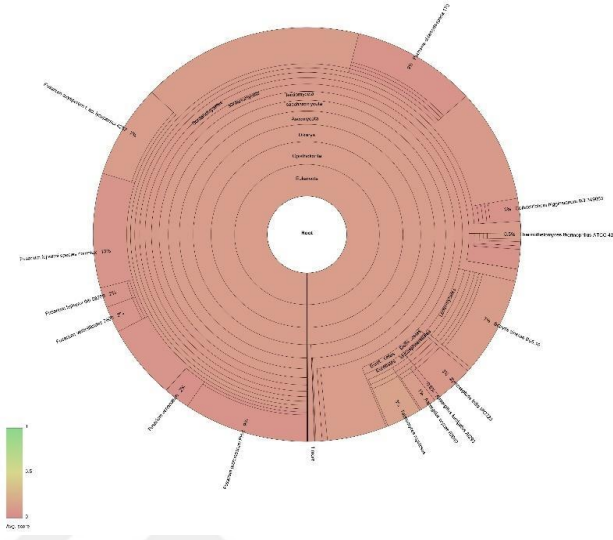
Tablo 24. MK-7 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK7-28S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Ascomycota</i>	9621	88.35	
<i>Basidiomycota</i>	1269	11.65	
<i>Bacteroidetes</i> < <i>Bacteroidetes</i> >	0	0.0	
<i>Streptophyta</i>	0	0.0	
<i>Actinobacteria</i> < <i>actinobacteria</i> >	0	0.0	
<i>Proteobacteria</i>	0	0.0	
<i>Euryarchaeota</i>	0	0.0	
<i>Chordata</i>	0	0.0	

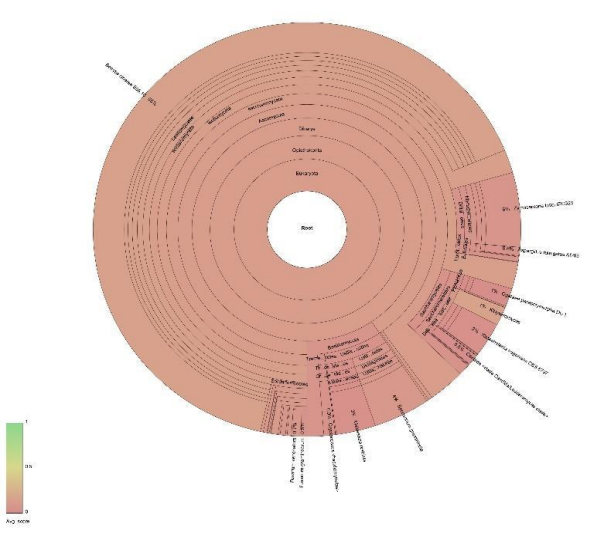
Tablo 25. MK-8 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK8-28S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Ascomycota</i>	19043	98.72	
<i>Basidiomycota</i>	246	1.28	
<i>Bacteroidetes</i> < <i>Bacteroidetes</i> >	0	0.0	
<i>Streptophyta</i>	0	0.0	
<i>Actinobacteria</i> < <i>actinobacteria</i> >	0	0.0	
<i>Proteobacteria</i>	0	0.0	
<i>Euryarchaeota</i>	0	0.0	
<i>Chordata</i>	0	0.0	

Tablo 26. MK-9 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK9-28S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Ascomycota</i>	61944	99.51	
<i>Basidiomycota</i>	297	0.48	
<i>Streptophyta</i>	3	0.0	
<i>Proteobacteria</i>	3	0.0	
<i>Bacteroidetes</i> < <i>Bacteroidetes</i> >	1	0.0	
<i>Actinobacteria</i> < <i>actinobacteria</i> >	1	0.0	
<i>Euryarchaeota</i>	1	0.0	
<i>Chordata</i>	1	0.0	

Tablo 27. MK-10 kodlu kriyokonit örneğinin 28S F63-F / LR3-R primer setine göre baskın taksonomik grupları.

MK10-28S			
Tür	Okuma	%	Krona
<i>Ascomycota</i>	10684	90.52	
<i>Basidiomycota</i>	1119	9.48	
<i>Bacteroidetes</i> < <i>Bacteroidetes</i> >	0	0.0	
<i>Streptophyta</i>	0	0.0	
<i>Actinobacteria</i> < <i>actinobacteria</i> >	0	0.0	
<i>Proteobacteria</i>	0	0.0	
<i>Euryarchaeota</i>	0	0.0	
<i>Chordata</i>	0	0.0	

Tez kapsamında yapılan biyoinformatik analizler sonucunda elde edilen toplam prokaryotik mikrobiyal biyoçeşitlilik ve bunun örneklerdeki dağılımı Ek 1’de, toplam ökaryotik mikrobiyal biyoçeşitlilik ve bunun örneklerdeki dağılımı ise Ek 2’de verilmiştir. Ayrıca, tez çalışmamızda araştırılan kriyokonit örneklerini domine eden prokaryotik ve ökaryotik mikrobiyal çeşitliliklerin taksonomik kategorilere göre dağılımları Ekler 3-16’da verilmiştir.



TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez çalışmasının konusunu oluşturan Antarktika, biyoçeşitlilik araştırmaları için yer yüzünün en ekstrem koşullarını barındıran ekosistemlerden birisi olarak kabul edilmektedir (Margesin and Miteva 201). Bu ekosistemde yaşam limitlerini zorlayan çeşitli etkenlerden en önemlilerine aşırı soğuk, kuraklık, tuzluluk ve radyasyon maruziyeti örnek olarak verilebilir (Hassan *et al.*, 2016). Dolayısıyla Antarktik ekosistemlerde yaşayan organizmalar varlığını sürdürebilmek için bu ekstrem koşullara uyumu sağlayan çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir (Christner *et al.*, 2003). Önceleri, bu mekanizmaların ekolojik uyum süreçlerindeki rolü önemli bir araştırma konusu olarak kabul edilmiş olsa da günümüzde bu ekosistemlerde yer alan mikroorganizmaların gıda üretimi, atık işleme, madencilik, biyoremediasyon uygulamaları, zirai uygulamalar, tıp ve moleküler diagnostik gibi çok çeşitli endüstriler için yüksek potansiyele sahip olduğunun anlaşılmasıyla bilimsel çalışmaların odağı tez konumuzu da oluşturan mikrobiyal biyoçeşitlilik araştırmalarına kaymıştır (Edwards and Cameron, 2017).

Antarktika, ekstremofilik mikrobiyal biyoçeşitlilik çalışmaları için eşsiz bir kaynak sunmaktadır. Literatür çalışmaları incelendiğinde biyoçeşitlilik çalışmalarının permafrost, endolitizme elverişli donmuş kayalar, buzul göller, doğal tuz yatakları, volkanik mağara sistemleri, deniz yüzey altı suları, deniz buzları ve kriyokonit çukurları gibi aşırı özelleşmiş Antarktik ekosistemler üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir (Tian *et al.*, 2009; Edwards and Cameron, 2017). Bunlar arasında çalışmamızın da konusunu oluşturan Antarktik tip kriyokonitler mikrobiyal biyoçeşitlilik açısından literatürde özel bir öneme sahiptir (Lutz *et al.*, 2019; Karadayi *et al.*, 2021). İlgili literatür çalışmalarında çeşitli bölgelerden toplanan Antarktik tip kriyokonitlerin mikrobiyal biyoçeşitlilikleri kültüre bağımlı ve/veya kültürden bağımsız yaklaşımlarla incelenmiş, her bir kriyokonit çukurunun kendine özgü biyoçeşitliliği değerlendirilmiş ve raporlanan biyoçeşitlilik bilgilerinin sonraki biyoteknoloji çalışmalarına nasıl kaynak sağlayabileceği değerlendirilmiştir.

Benzer bir yaklaşımla hazırlanan tez çalışmamız kapsamında 6. Ulusal Antarktik Bilim Seferi (TAE-6) sonunda ulaşılan Antarktika Horseshoe Adası'ndaki Türk Bilimsel Araştırma Kampı çevresi ve Shoesmith Buzulu çevresinde rastlanan 10 Antarktik tip kriyokonit oluşumu örneklenmiş ve alınan numunelerin mikrobiyal biyoçeşitliliği NGS temelli metagenomik yaklaşım ile araştırılmıştır.

Çalışma bulgularımız, incelenen kriyokonit örneklerinin prokaryotik biyoçeşitliliğinin Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria ve Cyanobacteria şubeleri, ökaryotik

mikrobiyal biyoçeşitliliğin ise Ascomycota ve Basidiomycota şubeleri tarafından domine edildiğini ortaya koymuştur. Buna ilaveten, hem her bir örneği domine eden prokaryotik ve ökaryotik mikrobiyal çeşitliliklerin taksonomik kategorilere göre dağılımları hem de tür düzeyinde toplam biyoçeşitlilik analizleri Ekler bölümünde detaylı olarak raporlanmıştır.

Literatürde çalışmamızın rapor edilen bulguları ile doğrudan örtüşen Antarktik kriyokonit biyoçeşitliliği konulu çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Christner *et al.* 2003'te Antarktik kriyokonit örneklerini biyoçeşitlilik açısından incelemiş ve burada bakteri (*Acidobacterium*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Cytophagales*, *Gemmimonas*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* ve *Verrucomicrobia*), metazoa (nematodlar, tardigradlar ve rotiferler), fungus (*Choiromyces*), siliat (*Spathidium*) ve yeşil alg (*Pleurastrum*) gruplarına ait çeşitli türlerin varlığını ortaya koymuşlardır.

Benzer şekilde, Porazinska *et al.* 2004'te Antarktika McMurdo Dry Valley buzullarındaki kriyokonit çukurlarında siyanobakteri (*Chlorococcus*, *Chroococcus*, *Crinalium*, *Oscillatoria*, *Nostoc* ve *Spirulina*), rotifer (*Philodina gregaria* ve *Cephalodella catellina*), tardigrad (*Acutuncus antarcticus* ve *Hypsibius* spp.) ve siliatlara ait çok sayıda türe rastlamıştır.

Daha güncel bir çalışmada ise Doğu Antarktika'da Queen Maud Land bölgesindeki kriyokonitlerin biyoçeşitliliği araştırılmış ve dominant gruplar olarak *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* ve *Actinobacteria* türlerine rastlanmıştır. Bu çalışmada ayrıca bir örnekte *Nitrososphaera* arke cinsine ait türlerin varlığı da kaydedilmiştir (Lutz *et al.* 2019).

Tez çalışmamızın bulgularının literatür kıyaslamaları kriyokonit özelinden diğer Antarktik soğuk ekosistemler perspektifine çekildiğinde bu ekosistemlerdeki mikrobiyal biyoçeşitlilik analizlerinin de araştırma bulgularımızla uyumlu olduğu görülmektedir.

Örneğin, Antarktik permofrost ile yapılan öncü bir çalışmada bakteri (*Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Promicromonospora*, *Azotobacter*, *Aeromonas* ve *Pseudomonas*), küf (*Cladosporium*), maya (*Sporobolomyces salmonicolor*, *Corynebacterium* spp. ve *Rhodotorula mucilaginosa*), siyanobakteri ve mikroalg (*Gloeocapsae* sp., *Chroococcidiopsis* sp., *Pseudococcomyxa* sp., *Trebuxia* sp., *Mychonastes* sp., *Chlorococcum* sp. ve *Chlorella* sp.) türlerine rastlanmıştır (Gilichinsky *et al.* 2007).

Benzer şekilde Antarktika'daki Rus istasyonları Druzhnaja ve Leningradskaja çevresindeki yüzey karında *Variovorax*, *Flavisolibacter*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Aquabacterium*, *Aquaspirillum*, *Comamonas*, *Janthinobacterium*, *Caulobacter*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Curvibacter*, *Polaromonas*, *Bacillus*, *Pedobacter*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Flavobacterium*,

Acinetobacter, *Mitsuria*, *Phaselicistis*, *Grimontella* ve *Arcicella* cinslerine ait çeşitli türlerin varlığı gösterilmiştir (Lopatina *et al.* 2013). Aynı grubun benzer bir diğer çalışmasında Doğu Antarktika'daki dört Rus İstasyonu çevresindeki örnekleme yapılan alanlardaki yüzey karının bakteriyel topluluğunu domine eden sınıfların Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Sphingobacteriia, Flavobacteriia, Cytophagia, Actinobacteria, Cyanobacteria ve Bacilli olduğu belirlenmiştir (Lopatina *et al.* 2016).

Ayrıca Vázquez *et al.* tarafından 2017 yılında yapılan araştırmada Antarktika Carlini İstasyonu çevresi mikrobiyal biyoçeşitliliği araştırılmış ve özellikle petrol kirliliği olan alanlarda petrol parçalama kabiliyeti gösteren *Polaromonas naphthalenivorans* türünün baskınlığına dikkat çekilmiştir. Çalışma örneklerimizde buna benzer bir baskınlık MK10 kodlu kriyokonit örneğinde (%41,89) gözlemlenmiştir.

Daha güncel bir çalışmada ise Vostok subglasiyel gölü (Antarktika) ökaryotik mikrobiyal çeşitliliğini domine eden grupların Ascomycota ve Basidiomycota türleri olduğu saptanmıştır (Gura and Rogers, 2020). Tez çalışmamızın 28S NGS analizlerindeki taksonomik dağılımlar değerlendirildiğinde sonuçların bu literatür ile uyumlu olduğu ve araştırılan Antarktik tip kriyokonitlerin de Ascomycota ve Basidiomycota türleri tarafından domine edildiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamız sonucunda Horseshoe Adası'ndan örneklenen kriyokonitlerin prokaryotik ve ökaryotik biyoçeşitliliğinin literatürdeki ilişkili çalışmalarla önemli ölçüde uyum gösterdiği değerlendirilmiştir. Bununla birlikte literatürde Antarktik tip kariyokonitlerin biyoçeşitliliğine yönelik araştırmaların kısıtlı olması ve Horseshoe Adası özelinde daha önce herhangi bir ilgili araştırmasının gerçekleştirilmemiş olması çalışmamızın özgünlüğü açısından önem arz etmektedir. Ayrıca raporlanan mikrobiyal biyoçeşitlilik içerisinde önemli ekolojik ve biyoteknolojik potansiyele sahip çok sayıda türün tespit edilmiş olması dikkate değerdir. Yine incelenen her bir kriyokonit örneğinin önemli ölçüde tanılanamayan diziler içermesi, bu örneklerin yeni türler keşfetme açısından yüksek potansiyelini açıkça ortaya koymaktadır.

ÖNERİLER

Antarktika’da Türk bilim insanlarının çalışmalarını sürdürdüğü en önemli istasyon olan Horseshoe Adası sahip olduğu eşsiz sucul ve karasal ekosistemleri ile biyolojik araştırmalar için özgün bir kaynak sunmaktadır.

Tez çalışmamız kapsamında kapsamında 6. Ulusal Antarktik Bilim Seferi (TAE-6) ile ulaşılan Antarktika Horseshoe Adası’ndaki Türk Bilimsel Araştırma Kampı çevresi ve Shoesmith Buzulu çevresinden örneklenen 10 Antarktik tip kriyokonitin prokaryotik ve ökaryotik mikrobiyal biyoçeşitliliği kültürden bağımsız NGS temelli bir metagenomik yaklaşımıyla araştırılmıştır.

Bu çalışma ile Horseshoe Adası’nın kriyokonit oluşumlarına ev sahipliği yaptığı ilk kez bildirilmiştir.

Örneklenen Antarktik tip kriyokonitlerin prokaryotik ve ökaryotik mikrobiyal biyoçeşitliliklerine ilişkin detaylı araştırma ilk kez yapılmış ve toplamda 1283 prokaryotik ve 56 ökaryotik mikrobiyal taksa raporlanmıştır.

Horseshoe Adası kriyokonit ekosistemlerinin literatür için yeni mikrobiyal türlere ev sahipliği yapma potansiyeli ilk kez aydınlatılmıştır.

Özetle, Türk bilim insanlarının kutup araştırmaları faaliyetlerini yoğun olarak sürdürdükleri Horseshoe Adası’nın biyolojik araştırmalar için yüksek potansiyeli tez çalışmamız ile bir kez daha doğrulanmıştır. Tez çalışmamızdan elde edilen mikrobiyal biyoçeşitlilik bilgisi hem literatüre yeni kazandırılması açısından hem de gelecekteki mikrobiyal ekoloji ve biyoteknoloji odaklı kültüre bağımlı konvensiyonel mikrobiyoloji araştırmalarına kaynak sağlayacak olmasından dolayı bilimsel önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Adapa, V., Ramya, L., Pulicherla, K., Rao, K., 2014. Cold active pectinases: Advancing the food industry to the next generation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 2324-2337.
- Al-Ghanayem, A.A., Joseph, B., 2020. Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 2871–2882.
- Aliyu, H., Maayer, P.D., Sjöling, S., Cowan, D.A., 2017. Metagenomic Analysis of Low-Temperature Environments, in R. Margesin (ed.), *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, 389-422.
- Arabaci, N., Arıkan, B., 2018. Isolation and characterization of a cold-active, alkaline, detergent stable α -amylase from a novel bacterium *Bacillus subtilis* N8. *Prep Biochem Biotechnol*, 48(5), 419–426.
- Banerjee, S., Kirkby, C.A., Schmutter, D., Bissett, A., Kirkegaard, J.A., Richardson, A.E., 2016. Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 97, 188-198.
- Bergholz, P. W., Bakermans, C., Tiedje, J. M., 2009. *Psychrobacter arcticus* 273-4 uses resource efficiency and molecular motion adaptations for subzero temperature growth. *Journal Bacteriology*, 191, 2340-2352.
- Bowman, J.P., McCammon, S.A., Brown, M.V., Nichols, D.S., McMeekin, T.A., 1997. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 3068-3078.
- Cavicchioli, R., Amils, R., Wagner, D., and McGenity, T., 2011. Life and Applications of Extremophiles. *Environmental Microbiology*, 13(8), 1903–1907
- Christner, B.C., Kvitko, B.H., Reeve, J.N., 2003. Molecular identification of Bacteria and Eukarya inhabiting an Antarctic cryoconite hole. *Extremophiles*, 7, 177-183.
- Costa, O.Y.A., de Hollander, M., Pijl, A., Liu, B., Kuramae, E.E., 2020. “Cultivation-independent and cultivation-dependent metagenomes reveal genetic and enzymatic potential of microbial community involved in the degradation of a complex microbial polymer”, *Microbiome*. 8(1), 76.
- De Maayer, P., Valverde, A., Cowan, D.A., 2014. The current state of metagenomic analysis. In: Poptsova MS (ed) *Genome analysis: current procedures and applications*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp 183-220.

- Doran, P.T., Fritsen, C.H., Murray, A.E., Kenig, F., McKay, C.P., Kyne, J.D., 2008. Entry approach into pristine ice-sealed lakes - Lake Vida, East Antarctica, a model ecosystem. *Limnology and Oceanography: Methods*, 6, 542-547.
- Drotz, S.H., Sparman, T., Nilsson, M.B., Schleucher, J., Oquist, M.G., 2010. Both catabolic and anabolic heterotrophic microbial activity proceed in frozen soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 107, 21046-21051.
- Edwards, A., Cameron, K. A., 2017. Microbial Life in Supraglacial Environments. In R. Margesin (ed.), *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, 57-82.
- Feller, G., Gerday, C., 2003. Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 1, 200-208.
- Feller, G., 2013. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 13, 11643–11665.
- Furhan, J., Awasthi, P., Sharma, S., 2019. Biochemical characterization and homology modelling of cold-active alkophilic protease from Northwestern Himalayas and its application in detergent industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 726-735.
- Gasc, C., Ribière, C., Parisot, N., Beugnot, R., Defois, C., Petit-Biderre, C., Boucher, D., Peyretailade, E., Peyret, P., 2015. Capturing prokaryotic dark matter genomes. *Res Microbiol*, 166, 814-830.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahier, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georlette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A., Feller, G., 2000. Coldadapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnology*, 18, 103-107.
- Gesheva, V., Vasileva-Tonkova, E., 2012. Production of enzymes and antimicrobial compounds by halophilic Antarctic *Nocardioides* sp. grown on different carbon sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2069-2076.
- Gilichinsky, D.A., Wilson, G.S., Friedmann, E.I., McKay, C.P., Sletten, R.S., Rivkina, E.M., Vishnivetskaya, T.A., Erokhina, L.G., Ivanushkina, N.E., Kochkina, G.A., Shcherbakova, V.A., Soina, V.S., Spirina, E.V., Vorobyova, E.A., Fyodorov-Davydov, D.G., Hallet, B., Ozerskaya, S.M., Sorokovikov, V.A., Laurinavichyus, K.S., Shatilovich, A.V., Chanton, J.P., Ostroumov, V.E., Tiedje, J.M., 2007. Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology. *Astrobiology*, 7, 275-311.
- Gura, C. and Rogers, S. O., 2020. Metatranscriptomic and metagenomic analysis of biological diversity in subglacial Lake Vostok (Antarctica). *Biology*, 9(3), 55.

- Hamdan, A., 2018. Psychrophiles: Ecological significance and potential industrial application. *South African Journal of Science*, 114, 1-6.
- Hassan, N., Rafiq, M., Hayat, M., Shah, A.A., Hasan, F., 2016. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*, 15(2), 147-172.
- Inman, M., 2005 The plan to unlock Lake Vostok. *Science*, 310, 611-612.
- Jadhav, V., Jamle, M., Pawar, P., Devare, M., Bhadekar, R., 2010. Fatty acid profiles of PUFA producing Antarctic bacteria: Correlation with RAPD analysis. *Annals of Microbiology*, 60, 693-699.
- Karadayi, G., Alaylar, B., Karadayi, M., Gürkök, S., Aksu, Ş., Egamberdieva, D., Güllüce M., 2021. Biodiversity, Ecological, and Commercial Importance of Psychrophilic Microorganisms. *Microbial Communities and their Interactions in the Extreme Environment*, Ed: D. Egamberdieva, N. K. Birkeland, W. J. Li, H. Panosyan. Springer, Singapore, 225-247.
- Karadayı, M., Güllüce, M., Karadayı, G., Gürkök, S., Aksu, Ş., Gülşahin, Y., Satıcı, E., 2021. Antarktika Kriyokonit Çukurları: Biyoçeşitlilik ve Biyoteknoloji Araştırmaları İçin Gizemli Kaynaklar. 5. Ulusal Kutup Bilimleri Sempozyumu, Kocaeli
- Karadayı, M., Aksu, Ş., Gürkök, S., Karadayı, G., Gülşahin, Y., Güllüce, M., 2022. Antarktik Tip Kriyokonitten Soğuk Aktif Amilaz Üretici Mikroorganizmaların İzolasyonu. 6. Ulusal Kutup Bilimleri Sempozyumu, İstanbul
- Karadayı, M., Gülşahin, Y., Karadayı, G., Aksu, Ş., Gürkök, S., Güllüce, M., 2023. Gaul Koyundan (Horseshoe Adası, Antarktika) Örneklene Bir Kriyokonitin Prokaryotik ve Ökaryotik Biyoçeşitliliğinin Metabarkodlama ile Araştırılması. 7. Ulusal Kutup Bilimleri Sempozyumu, İstanbul
- Karadayı, M., Karadayı, G., Aksu, Ş., Gülşahin, Y., Gürkök, S., Güllüce, M., 2023. Shoesmith Buzulu (Horseshoe Adası, Antarktika) Kriyokonit Örneklerindeki, Prokaryotik Biyoçeşitliliğinin 16S Metabarkodlama ile Araştırılması. 7. Ulusal Kutup Bilimleri Sempozyumu, İstanbul
- Kuhn, M. and Fountain, A. G., 2017. The climate of snow and ice as boundary condition for microbial life. *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*, 3-20.
- Kumar, C.G., Malik, R.K., Tiwari, M.P., 1998. Novel enzyme-based detergents: An Indian perspective. *Indian Institute of Science Issue*, 75, 1312-1318.
- Li, X.L., Zhang, W.H., Wang, Y.D., Dai, Y.J., Zhang, H.T., Wang, Y., Wang, H.K., Lu, F.P., 2014. A high-detergent-performance, cold-adapted lipase from *Pseudomonas stutzeri*

- PS59 suitable for detergent formulation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102, 16–24.
- Lopatina, A., Krylenkov, V., Severinov, K., 2013. Activity and bacterial diversity of snow around Russian Antarctic stations. *Research in Microbiology*, 164, 949-958.
- Lopatina, A., Medvedeva, S., Shmakov, S., Logacheva, M. D., Krylenkov, V., Severinov, K., 2016. Metagenomic Analysis of Bacterial Communities of Antarctic Surface Snow. 31, 7:398.
- Lutz, S., Ziolkowski, L.A., Benning, L.G., 2019. The Biodiversity and Geochemistry of Cryoconite Holes in Queen Maud Land, East Antarctica. *Microorganisms*, 7, 160.
- Maiangwa, J., Ali, M., Salleh, A., Abd Rahman, R., Shariff, F., Leow, T., 2015. Adaptational properties and applications of cold-active lipases from psychrophilic bacteria. *Extremophiles*, 19, 235-247.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 650-663.
- Margesin, R., Miteva, V., 2011. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 162(3), 346-361.
- Morita, R.Y., 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39, 144-167.
- Muslu, S., Genc, B., Adiguzel, M., Albayrak, S., Adiguzel, A., 2020. Proteolytic, Lipolytic and Amylolytic Bacteria Reservoir of Turkey; Cold-Adaptive Bacteria in Detergent Industry. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 14(1), 63-72.
- Mykytczuk, N.C., Foote, S.J., Omelon, C.R., Southam, G., Greer, C.W., Whyte, L.G., 2013. Bacterial growth at 15 °C; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 7, 1211-1226.
- Nam, E.S., Kim, Y.H., Shon, K.H., Ahn, J.K., 2011. Isolation and characterization of a psychrophilic bacterium producing cold active lactose hydrolyzing enzyme from soil of Mt. Himalaya in Nepal. *African Journal of Microbiology Research*, 5(16), 2198-2206.
- Nielsen, P.H., 2005. Life cycle assessment supports cold- wash enzymes. *International Journal Applied Science*, 2005, 10, 10.
- Panikov, N.S., Sizova, M. V., 2006. Growth kinetics of microorganisms isolated from Alaskan soil and permafrost in solid media frozen down to 35 °C. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 500-512.
- Peck, L., S., Clark, M. S., Clarke, A., Cockell, C. S., Convey, P., Detrich, H. W., Fraser, K. P., Johnston, I. A., Methe, B. A., Murray, A. E., Römisch, K., Rogers, A. D., 2005. Genomics: applications to Antarctic ecosystems. *Polar Biology*, 28, 351-365.

- Porazinska, D., L., Fountain, A., G., Nylen, T., H., Tranter, M., Virginia, R., A., Wall, D., H., 2004. The Biodiversity and Biogeochemistry of Cryoconite Holes from McMurdo Dry Valley Glaciers, Antarctica. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 36, 84-91.
- Priscu, J. C., Bell, R. E., Bulat, S. A., Ellis-Evans, J. C., Kennicutt, M. C., Lukin, V. V., Petit, J. R., Powell, R. D., Siegert, M. J., Tabacco, I., 2003. An international plan for Antarctic subglacial lake exploration. *Polar Geogr* 27, 69-83.
- Priscu, J. C., Achberger, A. M., Cahoon, J. E., Christner, B. C., Edwards, R. L., Jones W. L., 2013. A microbiologically clean strategy for access to the Whillans Ice Stream subglacial environment. *Antarctic Science*, 25, 637-647.
- Proctor and Gamble., 2009. Sustainability Report. http://www.pg.com/en_US/downloads/sustainability/reports/PG_2009_Sustainability_Report.pdf.)
- Reuter, J.A., Spacek, D.V., Snyder, M.P. 2015. High-throughput sequencing Technologies. *Mol Cell*, 58, 586-597.
- Roohi, R., Kuddus, M., Saima, S., 2013. Cold-active detergent-stable extracellular α -amylase from *Bacillus cereus* GA6: Biochemical characteristics and its perspectives in laundry detergent formulation. *Journal of Biochemical Technology*, 4, 636-644.
- Sahay, S., Chouhan, D., 2018. Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16, 319-325.
- Schloss, P.D., Handelsman, J., 2005. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol*, 6, 1.
- Shendure, J., 2008. The beginning of the end for microarrays? *Nat Methods*, 5, 585-587.
- Siegert, M.J., 2007. Exploration of Ellsworth Subglacial Lake: a concept paper on the development, organisation and execution of an experiment to explore, measure and sample the environment of a West Antarctic subglacial lake. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 6, 161-179.
- Siegert, M. J., Clarke, R. J., Mowlem, M., Ross, N., Hill, C. S., Tait, A., 2012. Clean access, measurement, and sampling of Ellsworth Subglacial Lake: A method for exploring deep Antarctic subglacial lake environments. *Reviews of Geophysics*, 50, RG1003.
- Sjöling, S., Stafford, W., Cowan, D., 2006. Soil metagenomics: exploring and exploiting the microbial gene pool. In: van Elsas JD, Jansson JK, Trevors JT (eds) *Modern soil microbiology*. CRC Press, Boca Raton, pp 409-434.

- Sjöling, S., Cowan, D.A., 2008. Metagenomics: microbial community genomes revealed. In: Margesin R, Schinner F, Marx J-C, Gerday C (eds) *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer, Berlin, pp 313-332.
- Srivastava, A., Srivastava, M., 2018. Enzymes market—global opportunity analysis and industry forecast, 2017–2024. <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>.
- Steven, B., Pollard, W.H., Greer, C.W., Whyte, L.G. 2008. Microbial diversity and activity through a permafrost/ground ice core profile from the Canadian high Arctic. *Environmental Microbiology*, 10, 3388-3403.
- Struvay, C., Feller, G., 2012. Optimization to low temperature activity in psychrophilic Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 11643-11665.
- Tian, F., Yu, Y., Chen, B., Li, H., Yao, Y. F., Guo, X. K., 2009. Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity in Arctic sediment as revealed by 16S rRNA and 18S rRNA gene clone libraries analysis. *Polar Biology*, 32, 93-103.
- Tomova, I., Stoilova-Disheva, M., Lazarkevich, I., Vasileva-Tonkova, E., 2015. Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands. *Frontiers in Life Science*, 8, 348-357.
- Tuorto, S.J., Darias, P., McGuinness, L.R., Nicolai, P., Tingjun, Z., Max, M.H., Lee, J.K., 2013. Bacterial genome replication at subzero temperatures in permafrost. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 8, 139-149.
- Vázquez, S., Monien, P., Minetti, R. P., Jürgens, J., Curtosi, A., Primitz, J. V., ... & Helmke, E., 2017. Bacterial communities and chemical parameters in soils and coastal sediments in response to diesel spills at Carlini Station, Antarctica. *Science of the Total Environment*, 605, 26-37.
- Whyte, L.G., Bourbonnière, L., Bellerose, C., Greer, C.W., 1999. Bioremediation assessment of hydrocarbon-contaminated soils from the high Arctic. *Bioremediation Journal*, 3, 69-79.
- Wood, D. E., Salzberg, S. L., 2014. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome biology*, 15, 1-12.
- Zhou, Z., Qing, J., Jinlai, M., Fangming, L., 2008. Antarctic psychrophile bacteria screening for oil degradation and their degrading characteristics. *Marine Science and Technology Bulletin*, 10, 50-57.