

Çakalburnu Lagünü (İzmir) sedimentlerinde real-time PCR ile bakteri ve arke düzeylerinin değerlendirilmesi

Assessment of bacteria and archaea levels in Çakalburnu Lagoon (İzmir) sediments by real-time PCR

Burcu Omuzbükten¹ • Aslı Kaçar^{2*}

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Turkey

² Dokuz Eylül Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Turkey

<https://orcid.org/0000-0002-6681-7174>

<https://orcid.org/0000-0002-8705-3695>

*Corresponding author: asli.kacar@deu.edu.tr

Received date: 21.09.2020

Accepted date: 24.12.2020

How to cite this paper:

Omuzbükten, B. & Kaçar, A. (2021). Assessment of bacteria and archaea levels in Çakalburnu Lagoon (İzmir) sediments by real-time PCR *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(2), 147-154. DOI: [10.12714/egejfas.38.2.02](https://doi.org/10.12714/egejfas.38.2.02)

Öz: Kıyusal lagünler, bir veya daha fazla sayıda giriş ile su değişimine izin veren ve bir bariyer gibi denizden ayrılan sığ su kütleleridir. Bu kırılğan ekosistemler kendilerine özgü sediment yapılarına sahip olmaktadır. Büyük ölçüde bentik mikrobiyal döngü yoluyla yürütülen biyojeokimyasal süreçler; lagün ile bitişik kıyı bölgesi arasındaki ilişkiyi anlamak için oldukça önemlidir. Bu çalışma, İzmir Körfezi'nde bulunan ve 67 hektarlık bir alan kaplayan Çakalburnu Lagünü'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın amacını, lagün sedimentlerinde, farklı mikrobiyal toplulukların düzeylerinin belirlenmesi oluşturmaktadır. Araştırmada, lagünün 7 noktasından toplanan sediment örneklerinde, Genel Arke (ARC), Metanojenik Arke (MCRA), Anaerobik Metan Oksidasyonu yapan Arke (ANME 1, ANME 2a, ANME 2c), Genel Bakteri (BAC) ve Sülfat İndirgeyen Bakteri (SRB2) seviyelerinin tespitinde Real-Time qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Çakalburnu Lagünü sedimentlerinde incelenen Genel Arke ve Genel Bakteri bolluklarının maksimum değerleri sırasıyla $2,66 \times 10^{10}$ gen kopya sayısı/gr ve $3,89 \times 10^7$ gen kopya sayısı/gr olarak belirlenmiş olup, bu çalışmada lagün sedimentlerinde arkeal bolluğun yoğun olduğu görülmüştür. Mikrobiyal çeşitliliğin karakterizasyonu, ekosistemin biyolojik temellerinin anlaşılması açısından önemlidir. Çalışmamızda sunulan veriler, lagünler gibi hassas ekosistemlerde, ekolojik ve mikrobiyolojik dengenin korunması ile biyojeokimyasal döngülerin belirlenmesine yönelik çalışmalara katkı sağlamaktadır. Gelecekteki çalışmalarda, mikrobiyal grupların seviyelerinin mevsimlere ve yıllara göre değişimlerinin izlenmesi yönünde çalışmalar yürütülecektir.

Anahtar kelimeler: Lagün, sediment, bakteri, arke, real-time PCR

Abstract: Coastal lagoons are shallow water masses, discredited from the marines as a barrier that permits water to change through one or more inputs. These fragile ecosystems have a specific type of sediments with their own characteristics. Biogeochemical processes, mostly intervened by the benthic microbial loop, are significant for understanding the relationships among the lagoon and the contiguous coastal partition. This study was conducted in the Çakalburnu Lagoon (İzmir) area, which is located at the Bay of İzmir and the area covers 67 hectares. The aim of the present study is to constitute of determining the number of different microbial communities in the lagoon sediments. We collected from lagoon sediments samples at 7 stations and we applied a Real-time qPCR assay to determine levels of archaea (ARC), methanogenic archaea (MCRA), anaerobic methane oxidation archaea (ANME 1, ANME 2a, ANME 2c), bacteria (BAC) and sulfate-reducing bacteria (SRB2) in the study. The amount of maximum abundance of archaeal and bacterial 16S rRNA gene in sediments are $2,66 \times 10^{10}$ gene copy numbers/g and $3,89 \times 10^7$ gene copy numbers/g, respectively. So, it was established that the archaeal abundance was intense in the lagoon sediments. The characterization of microbial diversity is significant for the comprehension of the biological fundamentals of the ecosystem. The data presented in our study contributes to the studies on preserving ecological and microbiological balance and determining biogeochemical cycles in sensitive ecosystems such as lagoons. The research will be conducted on studies to determine the abundance levels of seasonal and annual microbial groups in the future.

Keywords: Lagoon, sediment, bacteria, archaea, real-time PCR

GİRİŞ

Sulak alanlar, taşkınların önlenmesi, iklimsel döngülerin dengelenmesi, biyolojik çeşitliliğin korunması, kirliliğin kontrolü, kuraklığın etkilerinin en aza indirilmesi ve su kaynaklarının korunmasında vazgeçilmez bir rol oynamaktadır. Gezegendeki biyolojik olarak en verimli ekosistemlerden biri olduklarından "yaşamın beşiği" olarak adlandırılmışlardır (Li vd., 2020). Türkiye'nin de taraf olduğu Ramsar Sözleşmesi'nde sulak alanların tanımı; "Doğal ya da yapay, sürekli ya da mevsimsel, tatlı, acı ya da tuzlu, durgun ya da akan su kütleleri, bataklıklar, turbalıklar ve gelgitin çekilmiş anında derinliği altı metreyi aşmayan deniz suları" olarak belirtilmektedir (Ramsar

Convention Bureau, 1992). Sulak alan ekosistemlerinin değeri hakkında genel bir anlayış eksikliği nedeniyle, bu alanlar, ülkelerin ekonomisinden ve yoğun kentsel nüfuslarından kaynaklanan sanayileşme ve kentleşme tehdidi altındadır (Yin, 2003).

Sucul ortamlardaki sedimentler ise küresel biyosferin önemli bileşenleridir ve çeşitli bitki ve hayvanlara yaşam alanı sağlamanın yanısıra, besin döngülerindeki önemli dönüşümleri destekleyen benzersiz biyojeokimyasal alanlar oluşturulmasına kadar çeşitli roller oynarlar (Obi vd., 2016). Lagün sistemleri, dünyanın doğal biyolojik kaynakları

olmalarının yanı sıra, bilimsel araştırmalar için doğal birer laboratuvar olarak, biyolojik çeşitliliğin korunması ve sürdürülmesinde büyük öneme sahip hassas ve kırılgan ekosistemlerdir (Yucel-Gier vd., 2018). Kıyısız lagünler, bir veya daha fazla sayıda giriş ile su değişimine izin veren ve bir bariyer gibi denizden ayrılan sığ su kütleleridir. Günümüz kıyı şeridinin %13'ünü sınırlayan bu alanlar, tipik olarak Holosen deniz seviyesinin yükselmesi sırasında, kıyı düzlüklerinin sular altında kalmasından kaynaklanan yaygın kıyı ekosistemleridir. Kıyısız lagünler biyojeokimyasal süreçler açısından oldukça dinamik ortamlardır ve kara-deniz geçiş yüzeyinde organik maddenin taşınmasında, dönüştürülmesinde ve birikmesinde önemli rol oynarlar. Bu sığ ortamlarda, su kolonu ile bağlantılı olduğu için (Oueslati vd., 2019) organik madde (OM) birikiminde bir havuz veya organik ve inorganik besin taşınımı yoluyla bitişik kıyı bölgelerini besleyebilen rezervuarlar olarak işlev görebilirler (Manini vd., 2003). Genellikle antropojenik aktivitelere önemli ölçüde maruz kalırlar ve böylece tarımsal, endüstriyel ve kentsel atıklarla taşınan çok çeşitli organik ve inorganik bileşiklerle kirlenirler (Ribeiro vd., 2016). Lagün sedimentlerinde organik madde mineralize edilir ve kara-deniz geçiş zonunda besin maddeleri ile oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak sedimentlerde nitrifikasyon ve denitrifikasyon meydana gelebilir. Denitrifikasyon ile azot kaybı toplam mineralize azotun %25'ini oluşturabilir. Ayrıca, yüksek organik madde girdisiyle, mineralizasyon oranları yükselir ve sedimentlerin yüzeyinde oksijen hızla tükenir ve anoksik ortamlar gelişebilir (Glud, 2008). Büyük ölçüde bentik mikrobiyal döngü aracılığındaki bu süreçler, lagün ile bitişik kıyı bölgesi arasındaki ilişkiyi anlamak için oldukça önemlidir (Manini vd., 2003). Kentsel kanalizasyon sularıyla kirlenen birçok sığ kıyısız lagünde, sülfat redükleyici bakterilerin aktivitelerinin önemli oranlarda olduğu anoksik katmanlar (sular veya sedimentler) bulunmaktadır. Kara ve deniz arasındaki sınırlardaki konumlarından ötürü, hem organik malzemeli kıtasal tatlı suları, hem de tuzlu ve mineralce zengin deniz sularını aldıklarından; deniz suyundan gelen yüksek sülfat konsantrasyonu, yerinde birincil üretimden kaynaklanan organik maddenin mineralizasyonunda yüksek oranda yer alan anoksik katmanlarda sülfat redüklenmesini uyarır (Caumette, 1986).

Yine bentik Arkeler de biyojeokimyasal döngülerde ve besin ağlarında önemli bir rol oynar, ancak bu toplulukların kompozisyonu ve bolluğu kıyısız lagün sedimentlerinde çok detaylı araştırılmamıştır (Behera vd., 2020). Anaerobik metan-oksitleyici arke (ANME), metanojenik yolun tersine çevrilmesi yoluyla metanın anaerobik oksidasyonunu (AOM) gerçekleştirir. ANME tarafından gerçekleştirilen AOM'nin sülfat indirgemesine (SR) bağlandığı ilk olarak denizel sedimentlerde keşfedilmiştir. Burada ANME, Deltaproteobacteria'ya ait sülfat indirgeyen bakteriler (SRB) ile metabolik olarak birbirine bağlı konsorsiyumlar oluşturmuştur. Sülfata bağlı AOM (S-AOM) ile ilişkili ANME grupları, çoğunlukla çamur volkanlarında ve bazı sızıntı sedimentlerinde bulunan ANME-3 dışında birçok farklı deniz ortamında ortaya çıkmaktadır. Denizel ortamların yanı sıra, S-AOM'da yer alan ANME karasal ve tatlı su ekosistemlerinde bulunabilir (Timmers vd., 2017). Ayrıca sedimentlere sürekli organik madde girişi ve oksijen eksiklikleri

sağlayan yüksek birincil üretim nedeniyle, sedimentlerin yüzey bölgesinde metan oluşturan arkeler (MA) için de uygun koşullar yaratılmış olur (Reindl ve Bolalek, 2017). SRB ve MA, karbon ve kükürt döngülerinde önemli bir rol oynadıkları haliciler ve kıyı lagünleri de dahil olmak üzere deniz ve kıyı sedimanlarındaki organik madde oksidasyonunun son aşamalarında aktiftir (Takii ve Fukui, 1991). SRB, sülfat indirgeme prosesi ile, sürekli bir sülfat girdisinin bulunduğu ortamlarda, %50'ye kadar bozulma kapasitesi olan organik maddenin anaerobik mineralizasyonundan sorumlu ana mikroorganizma grubudur (Jørgensen ve Bak, 1991). Kıyısız ve denizel ortamlar SRB'nin en karakteristik yaşam alanları olmasına rağmen, MA varlığı, halicilerin tatlı su bölgelerinde ve MA için önemli bir substrat kaynağı sağlayan tuz bataklıklarında nispeten yüksek sayıda kaydedilmiştir. MA, metanogenez yoluyla, CH₄ ve CO₂'nin kıyı sistemlerinden atmosfere serbest bırakılmasında önemli bir rol oynayabilmektedir (Torres-Alvarado vd., 2016).

Dolayısı ile kıyısız lagünler, bentik mikrobiyal çeşitlilik açısından nadiren araştırılan oldukça değişken ve dinamik sistemlerdir (Manini vd., 2003). Genellikle bu sistemleri oldukça kararsız hale getiren ve öngörülemeyen dalgalanma koşullarına maruz kalan önemli fiziksel ve kimyasal değişkenlerle karakterize edilirler (Pusceddu vd., 1996). Bununla birlikte, lagün sedimentleri kirleticilerin depolama alanıdır ve bu nedenle kirleticilerin sediment üzerindeki etkilerinin anlaşılmasında ve mikrobiyal topluluklar ile ilişkilerinin belirlenmesinde, bir bütün olarak lagünlerin potansiyel etkilerini anlamak açısından önemlidir (Obi vd., 2016). Sedimentlerdeki besin maddeleri bileşimi ile ilişkili biyotik ve abiyotik faktörler, içerdiği mikrobiyal çeşitliliğini ve biyoaktif bileşik üretme potansiyelini yönlendirdiğinden (Al Amoudi, 2016), çalışmalar bu ortamların karakteristik özelliklerine sahip mikrobiyal çeşitliliğin tespitine odaklanmaktadır. Mikrobiyal açıdan bakıldığında Çakalburnu Lagünü sedimentleri nadir araştırılmış ve moleküler yöntemler kullanılarak bir inceleme yapılmamıştır. Genel olarak, doğal ve antropojenik streslerin lagün ekolojisi ve biyojeokimyasal fonksiyonlar üzerindeki etkisini değerlendirmek için bir gösterge olabilecek genel arke, metanojenik arke, anaerobik metan oksidasyonu yapan arke, genel bakteri ve sülfat redükleyen bakteriyel toplulukların bileşimi hakkında mevcut bir bilgi yoktur. Çalışmamızda, antropojenik ve doğal faktörlerden dolayı yoğun bir baskı altında olan Çakalburnu Lagünü'nde bentik mikrobiyal toplulukların kompozisyonu ve bolluğu incelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Çalışma alanı ve örnekleme

Bu çalışma, İzmir Körfezi'nde (İzmir'in kuzeybatısında, 38.406 ° - 38.415 ° N ve 27.045 ° - 27.060 ° E) bulunan 67 hektarlık bir alan kaplayan Çakalburnu Lagünü (İzmir) bölgesinde gerçekleştirilmiştir. Çakalburnu Lagünü'nün genişliği 752 m, uzunluğu 1054 m ve derinliği 0,5 ile 1 m arasında değişmektedir. Önemli ekonomik kalkınma ile teşvik edilen kentleşme, Türkiye'de son elli yılda hızla artmıştır. Sanayileşme ve kentleşme süreçlerinde (Esbah, 2004), sulak

alanlar Türkiye'nin tehdit altındaki ekosistemleri arasındadır (Kara, 2019). İzmir şehrinin toplam kentleşmiş bölgesi geniş sanayi bölgelerini kapsamakta olup, Türkiye'nin en büyük ihracat limanlarından birine sahiptir. Lagün, İzmir Körfezi'nin iç kısmında yer alır; kapalı ortamı, sıg derinliği ve sınırlı su sirkülasyonu nedeniyle ötrofik bir ortama sahiptir. Ayrıca Çakalburnu Lagünü kum midyesi (*Tapes decussatus* L., 1758) yetiştiriciliği açısından önemli bir alandır (Yucel-Gier vd., 2018).

Örnekleme, 7 adet kıyı istasyonundan (Şekil 1) toplanan sediment numunelerinin steril 50 mL'lik falcon tüplere alımı ile gerçekleştirilmiştir. Kıyı istasyonlarının seçiminde lagünün deniz ile bağlantı noktalarındaki sediment değişimi ve lagünün içindeki alan belirlenmiştir. Örneklemede asepsi-antisepsi kurallarına uyulmuş olup, sediment numuneleri laboratuvara 4°C'de transfer edilmiştir. Örnekler -20°C'de muhafaza edilmiş olup, 1 hafta içerisinde DNA ekstraksiyonu ve Real-time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. Çakalburnu Lagünü örnekleme noktaları
Figure 1. The sampling points of Çakalburnu Lagoon

DNA ekstraksiyonu

Toplam genomik DNA izolasyonu, DNeasy PowerSoil DNA izolasyon (Qiagen) kiti kullanılarak, protokole uygulanan bazı modifikasyonlar ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre DNA ekstraksiyonu için her sediment numunesinden 0.25 g tartılarak DNA ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen toplam genomik DNA analiz edilene kadar -20°C'de saklanmıştır. Toplam genomik DNA konsantrasyonu, Synergy HTX multimod okuyucu (BioTek Instruments, Inc) kullanılarak A260nm / A280nm ölçüleriyle belirlenmiştir.

Primer setlerinin belirlenmesi ve Real-Time PCR

Çakalburnu Lagünü'nden elde edilen sediment örneklerindeki, Genel Arke (ARC), Metanojenik Arke (MCRA), Anaerobik Metan Oksidasyonu yapan Arkeler (ANME 1, ANME 2a, ANME 2c), Genel Bakteri (BAC) ve Sülfat İndirgeyen

Bakterilerin (SRB2) seviyelerinin tespit edilebilmesi için gruplara özgü primer setleri literatürlerden seçilmiştir (Tablo 1). ANME'lerde üç farklı metanotrofik grup tanımlanmıştır: ANME-1 (alt gruplar a ve b), ANME-2 (alt gruplar a, b ve c) ve ANME-3. ANME-1 grubu Methanomicrobiales ve Methanosarcinales ile ilişkilidir. ANME-2, Methanosarcinales'in kültüre edilebilir üyeleriyle ilişkilidir ve ANME-3, daha çok *Methanococcoides* spp. ile ilişkilidir. ANME grupları birbirleriyle monofiletik değildir ve alt gruplar arasındaki filogenetik mesafe büyüktür, 16S rRNA gen dizisi benzerliği sadece %75-92'dir. ANME-2a ve ANME-2b alt grupları, ANME-2c'den ayırt edilen ve bu nedenle sıklıkla birlikte ANME-2a / b olarak gruplanan tutarlı bir küme oluşturur (Timmers vd., 2017). Sediment örneklerine uygulanan Real-time q-PCR analizleri, LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) kullanılarak, LightCycler 96 (Roche) Q-PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

ANME 1, ANME 2a, ANME 2c, MCRA ve SRB2 gruplarının tespiti için Q-PCR analizlerinde uygulanan koşullar; preincubation x 1 döngü (95°C – 300 saniye), 3 step amplification x 45 döngü (95°C – 10 saniye, 53°C – 15 saniye, 72°C – 15 saniye), melting x 1 döngü (95°C – 5 saniye, 65°C – 60 saniye, 97°C – 1 saniye), cooling x 1 döngü (40°C- 10

saniye) şeklindedir. BAC ve ARC gruplarının tespiti için Q-PCR analizlerinde uygulanan koşullar ise; preincubation x 1 döngü (95°C – 300 saniye), 3 step amplification x 45 döngü (95°C – 10 saniye, 50°C – 15 saniye, 72°C – 10 saniye), melting x 1 döngü (95°C – 5 saniye, 65°C – 60 saniye, 97°C – 1 saniye), cooling x 1 döngü (40°C- 10 saniye) şeklindedir.

Tablo 1. Real-time PCR analizlerinde kullanılan primerler
Table 1. The primers of Real-time PCR analyses

No	Primer Kodu	Hedef Grup	Fonksiyon	Sekans (5 → 3')	Kaynaklar
1	ARC -787F	Arke	Q-PCR - Forward primer	ATT AGA TAC CCS BGT AGT CC	(Yu vd.,2005; Vigneron vd., 2013)
2	ARC -1059R	Arke	Q-PCR - Reverse primer	GCC ATG CAC CWC CTC T	(Yu vd.,2005; Vigneron vd., 2013)
3	MCRA_Mreductase - subunit-mcra genes	Metanojenik Arke	Q-PCR - Forward primer	GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA	(Steinberg ve Regan, 2009)
4	MCRA_rev	Metanojenik Arke	Q-PCR - Reverse primer	CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT	(Steinberg ve Regan, 2009)
5	ANME 1 – 337F	Anaerobik Metan Oksidasyonu yapan Arke	Q-PCR - Forward primer	AGG TCC TAC GGG ACG CAT	(Timmers vd., 2017)
6	ANME 1 – 724R	Anaerobik Metan Oksidasyonu yapan Arke	Q-PCR - Reverse primer	GGT CAG ACG CCT TCG CT	(Timmers vd., 2017)
7*	ANME 2a – 426F_1	Anaerobik Metan Oksidasyonu yapan Arke	Q-PCR - Forward primer	TGT TGG CTG TCC GGA TGA	(Timmers vd., 2015)
8*	ANME 2a – 426F_2	Anaerobik Metan Oksidasyonu yapan Arke	Q-PCR - Forward primer	TGT TGG CTG TCC AGA TGA	(Timmers vd., 2015)
9*	ANME 2a – 426F_3	Anaerobik Metan Oksidasyonu yapan Arke	Q-PCR - Forward primer	TGT TGG CTG TCC AGA TGG	(Timmers vd., 2015)
10	ANME 2a-1242R	Anaerobik Metan Oksidasyonu yapan Arke	Q-PCR - Reverse primer	AGG TGC CCA TTG TCC CAA	(Timmers vd., 2015)
11	ANME 2c_F	Anaerobik Metan Oksidasyonu yapan Arke	Q-PCR - Forward primer	TCG TTT ACG GCT GGG ACT AC	(Timmers vd., 2017)
12	ANME 2c_R	Anaerobik Metan Oksidasyonu yapan Arke	Q-PCR - Reverse primer	TCC TCT GGG AAATCT GGT TG	(Timmers vd., 2017)
13	BACT -1369F	Bakteri	Q-PCR - Forward primer	CGG TGA ATA CGT TCY CGG	(Vigneron vd., 2013; Suzuki vd., 2000)
14	BACT -1492R	Bakteri	Q-PCR - Reverse primer	GGW TAC CTT GTT ACG ACT T	(Vigneron vd., 2013; Suzuki vd., 2000)
15	SRB2 -649F	Sülfat Redükleyen Bakteri	Q-PCR - Forward primer	ACT TGA GTA CCG GAG AGG GA	(Timmers vd., 2015)
16	SRB2 -808R	Sülfat Redükleyen Bakteri	Q-PCR - Reverse primer	CCT AGT GCC CAT CGT TTA GG	(Timmers vd., 2015)

BULGULAR

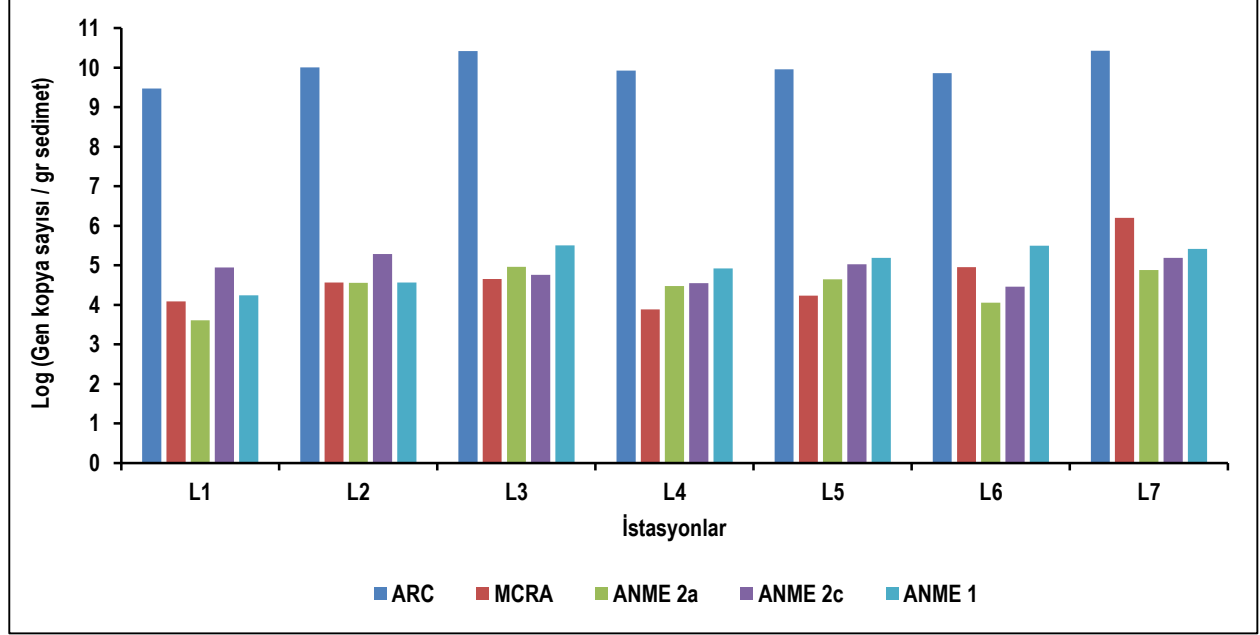
Çakalburnu Lagünü'nde belirlenen 7 istasyondan elde edilen sediment örneklerinden, ekstrakte edilen toplam genomik DNA'nın, Genel Arke (ARC), Metanojenik Arke (MCRA), Anaerobik Metan Oksidasyonu yapan Arke (ANME 1, ANME 2a, ANME 2c), Genel Bakteri (BAC) ve Sülfat İndirgeyen Bakteriler (SRB2)'in 16S rRNA genlerinin sayıca

bolluğunun Real-time PCR analiz sonuçları Şekil 2, 3 ve 4 ile Tablo 2'de verilmiştir.

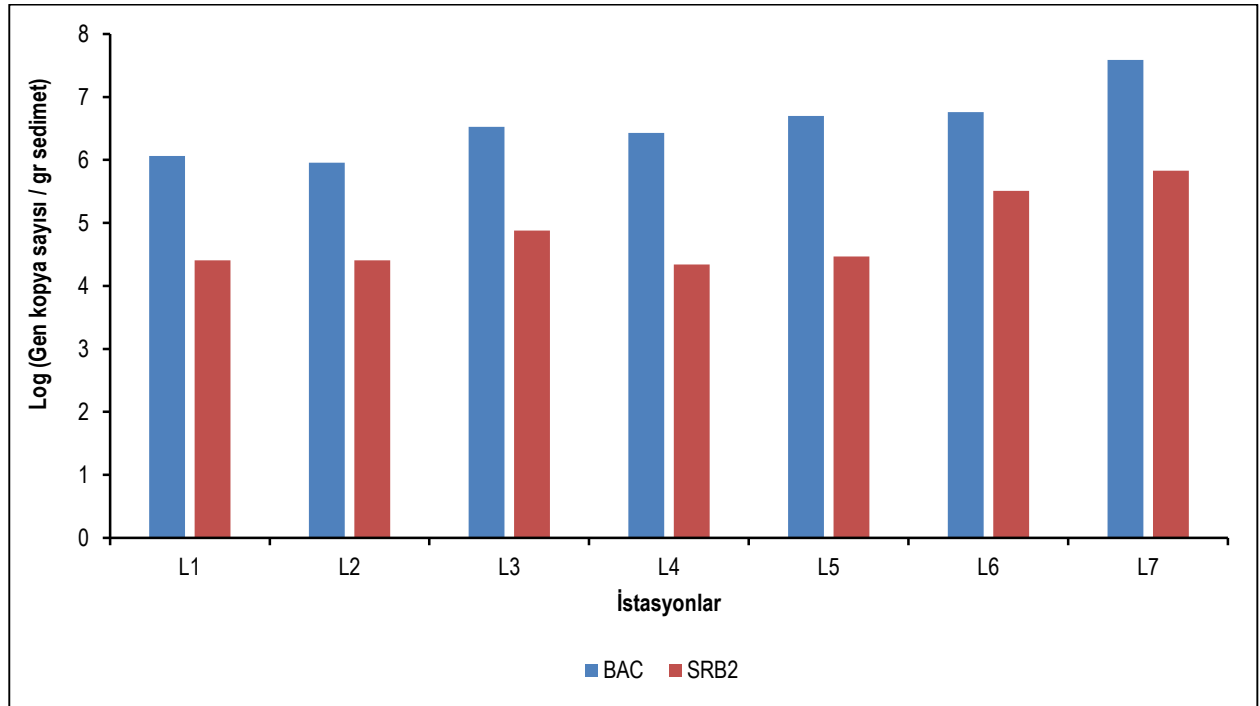
Tablo 2'de Çakalburnu Lagünü sedimentlerinde incelenen mikrobiyal bollukların değerleri belirtilmiştir. Bu değerlendirmeye göre incelenen arke ve bakteri bollukların maksimum değerleri sırasıyla $2,66 \times 10^{10}$ gen kopya sayısı/gr ve $3,89 \times 10^7$ gen kopya sayısı/gr olarak belirlenmiş olup, bu çalışmada lagün sedimentlerinde arkeal bolluğun yoğun

olduğu görülmüştür. ANME grupları kendi içinde değerlendirildiğinde, grupların bollukları arasında büyük bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca incelenen mikrobiyal bollukta

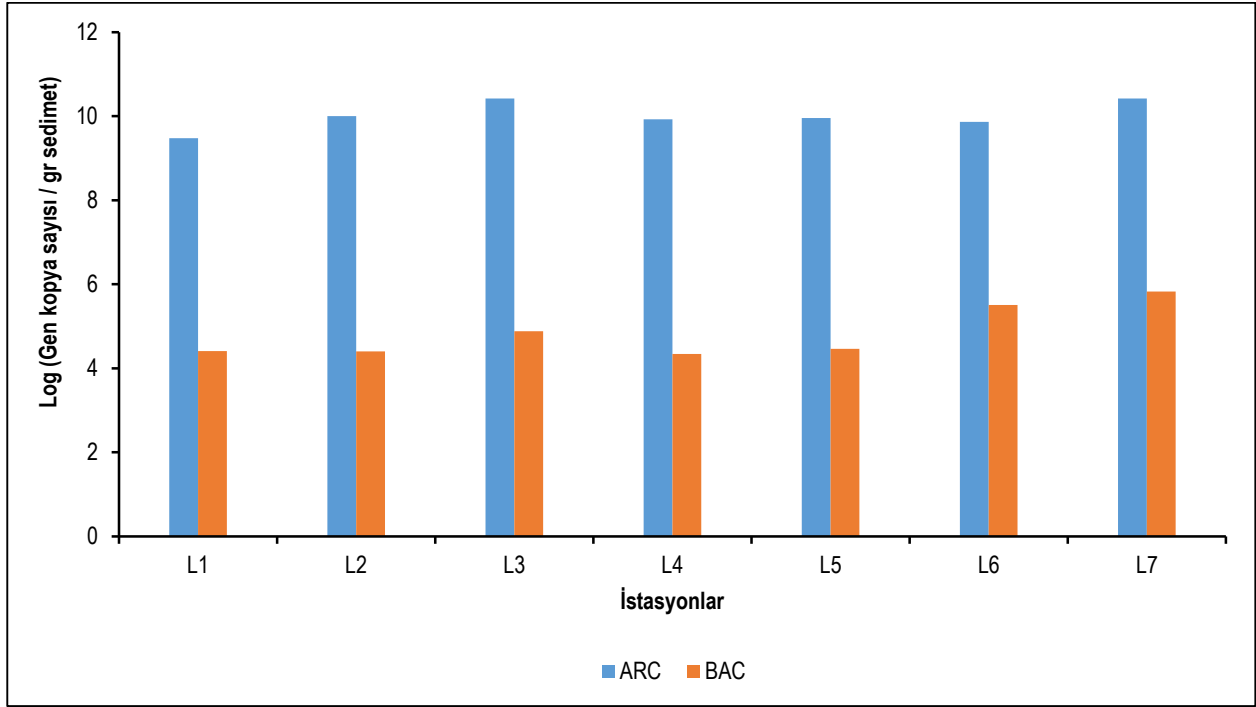
arkeal gruplar için minimum değer $4,06 \times 10^3$ gen kopya sayısı/gr iken bakteriyel gruplar için bu sayı $2,18 \times 10^4$ gen kopya sayısı/gr olarak tespit edilmiştir.



Şekil 2. Çakalburnu Lagünü sedimentlerinin arke bolluğu
Figure 2. Archeal abundance of Çakalburnu Lagoon sediments



Şekil 3. Çakalburnu Lagünü sedimentlerinin bakteriyel bolluğu
Figure 3. Bacterial abundance of Çakalburnu Lagoon sediments



Şekil 4. Çakalburnu Lagünü sedimentlerinin genel arke ve bakteri bolluğunun karşılaştırılması
Figure 4. The comparison of general archaea and bacterial abundance of Çakalburnu Lagoon sediments

TARTIŞMA VE SONUÇ

Elde edilen sonuçlara göre, sediment örnekleri arkeal ve bakteriyel bolluk açısından değerlendirildiğinde ARC ($2,66 \times 10^{10}$ gen kopya sayısı/gr), MCRA ($1,60 \times 10^6$ gen kopya sayısı/gr), BAC ($3,89 \times 10^7$ gen kopya sayısı/gr) ve SRB2 ($6,75 \times 10^5$ gen kopya sayısı/gr) grupları için en yüksek değerlere sahip olan istasyonun, L7 no'lu istasyon olduğu belirlenmiştir. Bu istasyon lagün içerisinde sucül bitkilerin yoğun olarak bulunduğu bir bölgede olup, sediment yapısı siyah renkli çamur şeklinde gözlenmiştir. Bu durumda en yüksek anaerobik sediment yapısı bu bölgede tespit edilmiştir ve sucül bitkilerin varlığının sülfat redükleyen bakteriyel oluşumu ile desteklediği öngörülmektedir. ANME 2a ve ANME 1 grupları için en yüksek değerlerin $9,13 \times 10^4$ gen kopya sayısı/gr ve $3,21 \times 10^5$ gen kopya sayısı/gr olarak elde edildiği

istasyonun L3, ANME 2c için ise $1,93 \times 10^5$ gen kopya sayısı/gr ile L2 istasyonu olarak belirlenmiştir. L3 istasyonun lagünün dışında bulunan deniz sedimentlerinde, L2 istasyonun ise lagün ile deniz bağlantısında bulunması ve sediment yapılarının (kumlu-çakıllı) benzerlik göstermesi; ANME grubu organizmalar için denizel girdinin önemli olduğunu işaret etmektedir.

Ayrıca, elde edilen verilere değerlendirildiğinde; lagün sedimentleri genel arke ve genel bakteri açısından karşılaştırıldığında; Şekil 4'te de görülebileceği üzere mikrobiyal bolluk açısından Arke düzeyi, Bakterilerin yaklaşık 10^4 katı üzerinde olup, sedimentteki baskın topluluğu oluşturmaktadır. Bu bakımdan lagün sedimentlerinin arkeal profilinin belirlenmesi oldukça önem taşımaktadır.

Tablo 2. Lagün sedimentlerindeki Real-time PCR sonuçlarının minimum ve maksimum değerleri
Table 2. The minimum and maximum values of Real-time PCR results from lagoon sediments

Primerler	Minimum (gen kopya sayısı/gr*)	Maksimum (gen kopya sayısı/gr*)	Ortalama (gen kopya sayısı/gr*)	Varyasyon Katsayısı
ARC	$2,97 \times 10^9$	$2,66 \times 10^{10}$	$1,29 \times 10^{10}$	73,08
MCRA	$7,70 \times 10^3$	$1,60 \times 10^6$	$2,58 \times 10^5$	229,30
ANME 2a	$4,06 \times 10^3$	$9,13 \times 10^4$	$4,19 \times 10^4$	76,66
ANME 2c	$2,90 \times 10^4$	$1,93 \times 10^5$	$9,45 \times 10^4$	64,57
ANME 1	$1,72 \times 10^4$	$3,21 \times 10^5$	$1,69 \times 10^5$	76,39
BAC	$9,05 \times 10^5$	$3,89 \times 10^7$	$8,24 \times 10^6$	165,29
SRB2	$2,18 \times 10^4$	$6,75 \times 10^5$	$1,68 \times 10^5$	148,13

* kuru ağırlık sediment

Torres-Alvarado vd. (2016), La Mancha Lagünü, Veracruz, Meksika Körfezi'nde 2016 yılında yaptığı benzer bir çalışmada, kuru ve yağışlı mevsimde metanojenik arke ve sülfat redükleyen bakterilerin sayıca bolluğunu, çevresel etmenler aracılığıyla incelemiştir. Sonuçlarında, kuru ve yağışlı mevsimlerde büyük değişiklikler tespit etmişlerdir. Sülfat redükleyen bakterilerin ve metanojenik arke, La Mancha Lagün sedimentlerinde organik maddenin mineralizasyonunda rol oynadığını, kuru mevsimde (kapalı giriş) sülfat redüklenmesi ve yağışlı mevsimde (açık giriş) ise metanojenizin ön plana çıktığını ortaya koymuşlardır. Bu lagündeki yağış ve nehir girdisindeki değişiklikler, sedimentlerdeki sülfat redükleyen bakterilerin ve metanojenik arke dinamiklerini düzenleyen ana faktörler olan tuzluluk ve sülfat içeriğini önemli ölçüde etkilediği yönünde görüş bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda yaz aylarında gerçekleştiğinden metanojenik arke ortalama bolluğu, sülfat redükleyen bakterilerin ortalamasından daha yüksek oluşu ile metanojenizin ön plana çıktığını görüşünü desteklemektedir.

Obi vd. 2016 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada ise, Nijerya'da bulunan Lagos Lagünü sedimentlerinde mikrobiyal toplulukların belirlenmesi açısından incelenmiştir. Mikrobiyal topluluklar, Illumina sekanslama metoduna dayanarak 16S rRNA genleri ile araştırdıkları bu çalışmada, toplam 565 bakteriyel operasyonel taksonomik birim (OTU) (amplikonların % 97'si) ve 17 arkeal OTU (amplikonların % 3'ü) tanımlanmıştır. Apapa ve Eledu istasyonlarından alınan sedimentlerde mikrobiyal çeşitlilik (tür zenginliği) Ofin bölgesinininkine kıyasla daha az olduğu ve her iki ikisinin de topluluklarına Helicobacteraceae (Epsilonproteobacteria) ailesine atanan tek bir OTU'nun hakim olduğunu tespit etmişlerdir. Ofin sedimentlerinde, Epsilonproteobacteria küçük bileşenleri kapsarken, büyük gruplar ise Apapa ve Eledu sedimentlerinde Siyanobakteriler, Bacteroidetes ve Firmicutes olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda bu gruplar genel bakteri primeri kullanılarak değerlendirildiğinden OTU sekansları'ndaki

gibi bir ayırım belirlenmemiştir. Ancak genel bakterilerin ortalama bolluğu 10^6 gen kopya sayısı/gr olarak tespit edilmiş ve bu oranın sedimentteki genel bakteriyel bolluğun da düşük olmayan düzeylerde olduğunu işaret etmektedir.

Tirez Lagünü'nde (İspanya), Montoya vd.'nin (2011) gerçekleştirdiği çalışma ile, su kolonundaki ve yüksek sülfatlı sedimentteki mevsimsel mikrobiyal çeşitlilik, hem moleküler hem de konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak rapor edilmiştir. Lagün sedimentinin, Alfa ve Deltaproteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria ve Arkeler açısından yüksek bir zenginlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yine bizim çalışmamızda da arkeal ve bakteriyel bolluğun ve çeşitliliğin yüksek olduğu sonuçlar açısından bakıldığında, ortaya konmuştur.

Sonuç olarak, kıyasal bölgelerde, sedimentler biyojeokimyasal döngülerde önemli bir rol oynamaktadır (Pomeroy vd., 1965; Zeitzschell, 1980). Lagüner sedimentler detritik malzeme havuzu ve mineral besin kaynağı olarak hareket ederler (Lijklema, 1986). Sediment sistemlerinde sülfat redükleyen bakteriler ile metanojenik arkelerin biyokimyasal süreçlerdeki etkinlikleri de sıklıkla tespit edilmektedir (Montoya vd., 2011). Real-time PCR analizleri gerçekleştirilen fonksiyonel gen primerleri, Çakalburnu Lagünü sedimentlerinde bulunan mikrobiyal çeşitliliğinin bir tahminini sağlayabilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ve literatürde gerçekleştirilen araştırmalarda da belirtildiği üzere lagün sedimentlerinde mikrobiyal çeşitliliğin tespiti, lagün ortamının daha detaylı aydınlatılması açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, lagün sedimentleri gibi hassas ekosistemlerde, ekolojik ve mikrobiyolojik dengenin korunması ile biyojeokimyasal döngülerin belirlenmesine yönelik çalışmalara sağlayacağı katkılar nedeniyle, bu ortamların düzenli (mevsimsel) olarak izleme programlarına dahil edilmesi önerilmektedir.

KAYNAKÇA

- Al Amoudi, S. (2016). *Bioprospecting Sediments from Red Sea Coastal Lagoons for Microorganisms and Their Antimicrobial Potential*. King Abdullah University of Science and Technology Thuwal, Kingdom of Saudi Arabia, PhD thesis. DOI: [10.3390/md14090165](https://doi.org/10.3390/md14090165)
- Behera, P., Mohapatra, M., Kim J.Y. & Rastogi, G. (2020). Benthic archaeal community structure and carbon metabolic profiling of heterotrophic microbial communities in brackish sediments. *Science of the Total Environment*, 706, 135709. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.135709](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135709)
- Caumette, P. (1986). Phototrophic sulfur bacteria and sulfate-reducing bacteria causing red waters in a shallow brackish coastal lagoon (Prevost Lagoon, France). *FEMS Microbiology Ecology*, 38, 113-124. DOI: [10.1016/0378-1097\(86\)90148-5](https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90148-5)
- Esbah, H. (2004). Agricultural land loss due to urbanization. *Proceedings of Agro-Environ*, (pp. 231-238), Udine, Italy.
- Glud, R.N. (2008). Oxygen dynamics of marine sediments. *Marine Biology Research*, 4, 243-289. DOI: [10.1080/17451000801888726](https://doi.org/10.1080/17451000801888726)
- Jørgensen, B.B. & Bak, F. (1991). Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 847-856. DOI: [10.1128/AEM.57.3.847-856.1991](https://doi.org/10.1128/AEM.57.3.847-856.1991)
- Kara, B. (2019). Agrarian and wetland areas under metropolitan threats: learning from the case of Inciralti, Izmir (Turkey). *Applied Ecology and Environmental Research* 17(6), 15087-15102. DOI: [10.15666/aeer/1706_1508715102](https://doi.org/10.15666/aeer/1706_1508715102)
- Li, W., Dou, Z., Cui, L., Zhao, X., Zhang, M., Zhang, Y., Gao, C., Yang, Z., Lei Y. & Pan X. (2020). Soil fauna diversity at different stages of reed restoration in a lakeshore wetland at Lake Taihu, China. *Ecosystem Health and Sustainability*, 6(1), 1722034. DOI: [10.1080/20964129.2020.1722034](https://doi.org/10.1080/20964129.2020.1722034)
- Lijklema, L. (1986). Phosphorus accumulation in sediments and internal loading. *Aquatic Ecology*, 20, 213-224. DOI: [10.1007/BF02291164](https://doi.org/10.1007/BF02291164)
- Manini, E., Fiordelmondo, C., Gambi, C., Pusceddu, A. & Danovaro, R. (2003). Benthic microbial loop functioning in coastal lagoons: a comparative approach. *Oceanologica Acta*, 26, 27-38. DOI: [10.1016/S0399-1784\(02\)01227-6](https://doi.org/10.1016/S0399-1784(02)01227-6)
- Montoya, L., Lozada-Chavez, I., Amils, R., Rodriguez, N. & Marin, I. (2011). The sulfate-rich and extreme saline sediment of the ephemeral Tirez Lagoon: a biotope for acetoclastic sulfate-reducing bacteria and hydrogenotrophic methanogenic archaea. *International Journal of Microbiology*, 2011, 753758, 22. DOI: [10.1155/2011/753758](https://doi.org/10.1155/2011/753758)

- Obi, C.C., Adebusoye, S.A., Ugoji, E.O., Ilori, M.O., Amund, O.O. & Hickey, W.J. (2016). Microbial Communities in Sediments of Lagos Lagoon, Nigeria: Elucidation of Community Structure and Potential Impacts of Contamination by Municipal and Industrial Wastes. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1213. DOI: [10.3389/fmicb.2016.01213](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01213)
- Oueslati, W., Velde, S., Helali, M.A., Added, A., Aleya, L. & Meysman F.J.R. (2019). Carbon, iron and sulphur cycling in the sediments of a Mediterranean lagoon (Ghar El Melh, Tunisia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 221, 156–169. DOI: [10.1016/j.ecss.2019.03.008](https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.03.008)
- Pomeroy, L.R., Smith, E.E. & Grant, C.M. (1965). The exchange of phosphate between estuarine water and sediments. *Limnology and Oceanography*, 10, 167-172. DOI: [10.4319/lo.1965.10.2.0167](https://doi.org/10.4319/lo.1965.10.2.0167)
- Pusceddu, A., Serra, E., Sanna, O. & Fabiano, M. (1996). Seasonal fluctuations in the nutritional value of particulate organic matter in a lagoon. *Chemistry and Ecology*, 12, 199–212. DOI: [10.1080/02757549608039082](https://doi.org/10.1080/02757549608039082)
- Ramsar Convention Bureau. (1992). Ramsar Convention, Slimbridge, England.
- Reindl A.R. & Bolalek, J. (2017). Biological factor controlling methane production in surface sediment in the Polish part of the Vistula Lagoon. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 46(2), 223-230. DOI: [10.1515/ohs-2017-0022](https://doi.org/10.1515/ohs-2017-0022)
- Ribeiro, C., Ribeiro, A.R. & Tiritan, M.E. (2016). Occurrence of persistent organic pollutants in sediments and biota from Portugal versus European incidence: a critical overview. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51, 143–153. DOI: [10.1080/03601234.2015.1108793](https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1108793)
- Steinberg, L.M. & Regan, J.M. (2009). McrA-targeted real-time quantitative PCR method to examine methanogen communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (13), 4435–4442. DOI: [10.1128/AEM.02858-08](https://doi.org/10.1128/AEM.02858-08)
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T. & DeLong, E.F. (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed 50- microbial populations via nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4605–4614. DOI: [10.1128/AEM.66.11.4605-4614.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4605-4614.2000)
- Takii, S. & Fukui, M. (1991). Relative importance of methanogenesis, sulfate reduction and denitrification in sediments of the lower Tama river. *Bulletin of the Japanese Society of Microbial Ecology*, 6, 1-8. DOI: [10.1264/microbes1986.6.9](https://doi.org/10.1264/microbes1986.6.9)
- Timmers, P.H.A., Gieteling, J., Widjaja-Greefkes, H.C.A., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., Lens, P.N.L. & Meulepas, R.J.W. (2015). Growth of anaerobic methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in a high-pressure membrane capsule bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1286-1296. DOI: [10.1128/AEM.03255-14](https://doi.org/10.1128/AEM.03255-14)
- Timmers, H.A., Welte, C.U., Koehorst, J.J., Plugge, C.M., Jetten, M.S.M. & Stams A.J.M. (2017). Reverse Methanogenesis and Respiration in Methanotrophic Archaea. *Peer. Archaea*, 2017, 1654237, 22. DOI: [10.1155/2017/1654237](https://doi.org/10.1155/2017/1654237)
- Torres-Alvarado, M.R. Calva-Benítez, L.G., Álvarez-Hernández, S. & Trejo-Aguilar, G. (2016). Anaerobic microbiota: spatial-temporal changes in the sediment of a tropical coastal lagoon with ephemeral inlet in the Gulf of Mexico. *International Journal of Tropical Biology*, 64(4), 1759-1770. DOI: [10.15517/rbt.v64i4.22449](https://doi.org/10.15517/rbt.v64i4.22449)
- Vigneron, A., Cruaud, P., Pignet, P., Caprais, J.C., Cambon-Bonavita, M.A., Godfroy, A. & Laurent, T. (2013). Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *ISME Journal*, 7, 1595–1608. DOI: [10.1038/ismej.2013.18](https://doi.org/10.1038/ismej.2013.18)
- Yin, H. (2003). The Thoughts of Wetland Conservation in China. *Wetland Science*, 1, 68–72.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J. & Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(6), 670-679. DOI: [10.1002/bit.20347](https://doi.org/10.1002/bit.20347)
- Yucel-Gier, G., Kacar, A., Gonul, L.T., Pazi, I., Kucuksezgin, F., Erarslanoglu, N. & Toker, S.K. (2018). Evaluation of the relationship of picoplankton and viruses to environmental variables in a lagoon system (Çakalburnu Lagoon, Turkey). *Chemistry and Ecology*, 34 (3), 211–228. DOI: [10.1080/02757540.2018.1427230](https://doi.org/10.1080/02757540.2018.1427230)
- Zeitzschell, B. (1980). Sediment-water interaction in nutrient dynamics. In: Tenore, K.R., & Coull, B.C. (Edit.), *Marine Benthic Dynamics*. University of South Carolina, Columbia., pp 195-218