

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEVRESEL DNA (eDNA) ANALİZİ KULLANILARAK
KIZILIRMAK NEHRİ'NDE BENTİK ORGANİZMALARIN
DAĞILIMININ BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Enise DOĞAN**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Özlem FINDIK**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Ağustos 2023

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEVRESEL DNA (eDNA) ANALİZİ KULLANILARAK
KIZILIRMAK NEHRİ'NDE BENTİK ORGANİZMALARIN
DAĞILIMININ BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Enise DOĞAN**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Özlem FINDIK**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Ağustos 2023

Prof. Dr. Özlem FINDIK danışmanlığında Enise DOĞAN tarafından hazırlanan "**Çevresel DNA (eDNA) Analizi Kullanılarak Kızılırmak Nehri'nde Bentik Organizmaların Dağılımının Belirlenmesi**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.../.../20..

JÜRİ

Başkan : Prof. Dr. Zeliha LEBLEBİCİ

Üye : Prof. Dr. Özlem FINDIK (Danışman)

Üye : Dr. Öğrt. Üyesi İbrahim KÜÇÜKBASMACI

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../.../20...

Doç. Dr. Cemal ÇARBOĞA
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin akademik ve etik standartlara uygun olarak elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda, bu çalışmanın özünü oluşturmayan tüm materyalleri ve sonuçları bu kurallara ve davranışa uygun olarak eksiksiz olarak alıntıladığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

Enise DOĞAN



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütölmesi sırasında, zor sorularla beni sürekli düşünmeye ve araőtırmaya teşvik eden, bu çalışmanın yürütölmesinde her fırsatta yanımda olan, tüm ince ruhuyla nezaketini gösteren ve desteğini esirgemeyen danıőmanım Sayın Prof. Dr. Özlem Fındık'a, bu süreçte konuya hakim olmasa bile özellikle sevgisini eksik etmeyen başta sevgili annem Fatma Doğan olmak üzere tüm aileme, arazi çalıőmalarım için ekipman temininde ve bu süreçte gece gündüz bana destek olan ve her türlü yardıma hazır olan arkadaşlarıma, tez sürecindeki zorlandığım veya zorlanmadığım her anda her türlü yanımda olan ve desteğini bir an bile esirgemeyen arkadaşşıma, teşekkürlerimi bir borç bilirim.

ÇEVRESEL DNA (eDNA) ANALİZİ KULLANILARAK KIZILIRMAK NEHİRİNDE BENTİK ORGANİZMALARIN DAĞILIMIN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Enise DOĞAN

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2023

ÖZET

Günümüzde, biyoçeşitlilik araştırmalarında, eDNA metoduyla yapılan çalışmaların artmakta olduğunu ve makrobentik topluluklar için çevresel DNA (eDNA) tabanlı metabarkodlama yaklaşımlarının uygun olduğunu gösteren çalışmalara rastlanmaktadır. Nehirlerde ve göllerde biyolojik izleme çalışmalarında, çevresel değişkenlere verdikleri tepkiler ve biyoindikatör özellikleri sebebiyle, makroomurgasızlar kullanılan biyolojik elemanlardan biridir. Bu çalışmada, makroomurgasız çeşitliliğini belirlemede hem morfolojik yöntem hem de sudan elde edilen DNA'nın kullanıldığı eDNA yöntemi kullanılmıştır. Kızılırmak nehrinin Nevşehir ili sınırları içerisinde kalan bölümünden 4 istasyon seçilmiş ve toplamda 8 örnekte eDNA analizi gerçekleştirilmiştir. Morfolojik örnekleme için örnekler el kepçesi ile (10dk) toplanmış, eDNA için su örnekleri dip suyu olacak şekilde alınmıştır. Ayrıca istasyonlardan su örneği alınmış ve bazı fizikokimyasal analizler yapılmıştır. Sudan DNA örnekleri santrifüjleme ve sonrasında izolasyon ile elde edilmiştir. Metabarkodlama için 18S rRNA gen bölgesi olarak V3 – V4 bölgeleri kullanılmıştır. Ayrıca morfolojik yöntem için alınan bentik örneklerin etil alkolde saklanan kaplarından örnek altı sularından da örnekler alınmış ve onlara da eDNA yöntemi uygulanmıştır. Takson sayısı; eDNA analizinde (16), morfolojik örneklemeden (11) daha yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca örnek altı suyu ve su örneği arasında da belirlenen gruplar açısından farklılıklar gözlemlenmiştir. Örnek altı suyu için gerçekleştirilen analiz sonucunda ise toplam 13 takson bulunmuştur. Sudan alınan eDNA sonuçları karşılaştırıldığında istasyonların sıralaması 3=2>1>4 şeklindedir. Nehirdeki makrobentik organizmaların birey sayılarına bakıldığında, Arthropoda, Insecta ve Annelida gruplarından atanamamış bireyler olduğu görülmektedir. İstasyonlardan alınan örnekler içerisinde Odonata, Hemiptera ve Spongilla grupları morfolojik ve dip suyu analizlerinde gözlemlenmemiş fakat örnek altı suyu analizlerinde tespit edilmiştir. Fizikokimyasal analizlerde Gülşehir istasyonunda düşük oksijen seviyesi (2,99 mg/l) ölçülmüştür. Çalışma sonucunda nehirdeki kirlilik düzeyinin kayda değer ölçüde fazla olduğu görülmektedir. Çalışma, önemli bir biyoçeşitlilik elemanı olan bentik organizmaların izleniminde eDNA analizi yönteminin kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler -Bentik organizma; eDNA; Metabarkodlama; Takson; Biyoçeşitlilik

Danışman: Prof. Dr. Özlem FINDIK

**DETERMINATION OF THE DISTRIBUTION OF BENTHIC ORGANISMS IN
THE KIZILIRMAK RIVER USING ENVIRONMENTAL DNA (eDNA)
ANALYSIS**

(MSc Thesis)

Enise DOĞAN

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF
NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

August 2023

ABSTRACT

In recent years, it is considered that the studies conducted with the eDNA method in biodiversity researches are increasing. It is found that environmental DNA (eDNA) based metabarcoding approaches are appropriate for benthic macrobenthic communities. Benthic macroinvertebrate are preferred biological elements in biological monitoring studies in rivers and lakes due to their responses to environmental variables and bioindicator properties. In this study, both the morphological method and eDNA from water method were used to determine biodiversity for this reason, 4 stations and eDNA analysis was performed from a total of 8 samples, were selected from the part of the Kızılırmak river within the borders of Nevşehir province. For morphological method, samples were taken by hand net (10-minute kick) collection has taken place water samples were taken as bottom water for eDNA. DNA samples from the water were obtained by centrifugation and subsequent isolation. V3 – V4 regions were used as 18S rRNA gene region for metabarcoding. In addition, the eDNA method was applied to the sample water from the containers stored in ethyl alcohol of the benthic samples taken for the morphological method Number of taxa; It was found to be higher in eDNA analysis (16) than in morphological sampling (11). In addition, there are differences between the sample groundwater and the water sample in terms of the determined groups. As a result of the analysis carried out for the sample groundwater, a total of 13 taxa were found. When the eDNA results from the water are compared, the order of the stations is 3=2>1>4. There are individuals who could not be assigned from Arthropoda, Insecta and Annelida groups based on the individual numbers of macrobenthic organisms in the river. Among the samples taken from the stations, Odonata, Hemiptera and Spongilla groups were not observed in the morphological and bottom water analysis, but were detected in the sample groundwater analysis. In physicochemical analyzes, low oxygen level (2.99 mg/l) was measured at Gülşehir station. As a result of the study, it is seen that the pollution level in the river is considerably higher. The study showed that the eDNA analysis method can be used in the monitoring of benthic organisms, which are an important biodiversity element.

Keywords- Benthic Organism; eDNA; Metabarkoding; Taxon; Biodiversity

Supervisor: Prof. Dr. Özlem FINDIK

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1.BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2.BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	3
2.1 Bentik Organizmalar Hakkında Genel Bilgiler.....	3
2.1.1 Diptera.....	3
2.1.2 Platyhelminthes.....	3
2.1.3 Heteroptera.....	3
2.1.4 Oligochaeta	4
2.1.5 Gammaridae	4
2.1.6 Gastropoda	4
2.1.7 Nematoda	5
2.1.8 Bivalvia	5
2.2 Çevresel DNA	5
2.2.1 Çevresel DNA'nın ortaya çıkışı.....	6

2.2.2 DNA barkodlama	6
2.2.3 DNA metabarkodlama	7
2.2.4 Metagenom.....	7
2.2.5 18S rRNA.....	8
2.3 Literatür Özeti	8
2.3.1 Çevresel DNA (eDNA) çalışmaları	8
2.3.2 Bentik organizma çalışmaları.....	11
3.BÖLÜM	
MATERYAL – YÖNTEM	14
3.1 Çalışma Alanı.....	14
3.2 İstasyonlardan Örneklerin Alınması	17
3.3 Laboratuvar Çalışmaları.....	17
3.3.1 Bentik omurgasızların morfolojik olarak incelenmesi.....	17
3.3.2 eDNA için analizler	18
3.3.2.1 DNA izolasyonu.....	18
3.3.2.2 PCR.....	21
3.3.2.3 DNA dizi analizleri	23
3.3.4 İndeks PCR	24
3.3.4.1 Data kalitesi kontrolü (FastQC)	26
3.3.5 Biyoinformatik analizde kullanılan bazı araçlar	27
3.3.5.1 QIIME2	27
3.3.5.2 DADA2	28
4.BÖLÜM	
BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1 İstasyonlara Ait Fizikokimyasal Parametreler	29
4.2 Geleneksel Yöntemle Alınan Bentik Organizmalar.....	31

4.3 eDNA Analiz Sonuçları	33
4.3.2 Operasyonel taksonomik ünitelerin genel dağılımı.....	40
4.3.3 Operasyonel taksonomik ünitelerin istasyonlara göre dağılımı	41
4.3.4 Operasyonel taksonomik ünitelerin nehir dip suyu analizlerinin karşılaştırılması	42
4.3.5 Operasyonel taksonomik ünitelerin örnek altı suyu analizlerinin karşılaştırılması	42
4.5 Morfolojik ve eDNA Analizlerinin Karşılaştırılması	43
4.3.4 Metagenom analizleri içerisinde bulunan diğer organizmalar	49
5.BÖLÜM	
SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	67

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1	Örnekleme noktalarına ait bilgiler (Koordinat ve yükseklikleri).....	17
Tablo 3.2	PCR aşamasında kullanılan malzemeler.....	22
Tablo 3.3	İndeks PCR kullanılan malzemeler.....	25
Tablo 4.1	İstasyonların Fizikokimyasal Özellikleri.....	29
Tablo 4.2	Yerüstü Su Kütlelerinde Bazı Parametreler İçin Çevresel Kalite Standartları.....	30
Tablo 4.3	İstasyonların morfolojik ön grup ayrımı.....	32
Tablo 4.4	DNA dizilerinin uzunlukları ve kalite değerleri.....	35
Tablo 4.5	DADA2 formatı ile okuma verilerinin kesme işlemleri.....	39
Tablo 4.6	Morfolojik, Nehir suyu ve Örnek altı suyu analizlerinin birbirleriyle karşılaştırılması.....	44
Tablo 4.7	eDNA Analiziyle Bulunan Bentik Organizmaların Yoğunlukları.....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1.	Nevşehir Kızılırmak Örnekleme İstasyonları.....	14
Şekil 3.2.	Gülşehir İstasyonu.....	15
Şekil 3.3.	Sulusaray İstasyonu.....	15
Şekil 3.4.	Sarıhıdır İstasyonu.....	16
Şekil 3.5.	Avanos İstasyonu.....	16
Şekil 3.6.	DNA Santrifüjleme İşlemi.....	18
Şekil 3.7.	Amplicon PCR sonuçları.....	23
Şekil 3.8.	İndeks PCR Sonuçları.....	24
Şekil 3.9.	eDNA Analiz Adımları.....	25
Şekil 4.1.	Gülşehir İstasyonu Nehir Dip Suyuna Ait FastQC Sonuçları.....	35
Şekil 4.2.	Sulusaray İstasyonu Nehir Dip Suyuna Ait FastQC Sonuçları.....	36
Şekil 4.3.	Sarıhıdır İstasyonu Nehir Dip Suyuna Ait FastQC Sonuçları.....	36
Şekil 4.4.	Avanos İstasyonu Nehir Dip Suyuna Ait FastQC Sonuçları.....	36
Şekil 4.5.	Gülşehir İstasyonu Örnek Altı Suyuna Ait FastQC Sonuçları.....	37
Şekil 4.6.	Sulusaray İstasyonu Örnek Altı Suyuna Ait FastQC Sonuçları.....	37
Şekil 4.7.	Sarıhıdır İstasyonu Örnek Altı Suyuna Ait FastQC Sonuçları.....	37
Şekil 4.8.	Avanos İstasyonu Örnek Altı Suyuna Ait FastQC Sonuçları.....	38
Şekil 4.9.	eDNA analizinde atanan bentik organizmaların yüzde dağılımları.....	40
Şekil 4.10.	eDNA Analizinde bulunan örneklerin istasyonlara göre çeşitlilik dağılımları.	41
Şekil 4.11.	eDNA analizi nehir dip suyu örneklerinin istasyonlara göre dağılımı.....	42
Şekil 4.12.	eDNA analizi örnek altı suyu örneklerinin istasyonlara göre dağılımı.....	43
Şekil 4.14.	Gülşehir İstasyonu Nehir Dip Suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları.....	49
Şekil 4.15.	Sulusaray İstasyonu Nehir Dip Suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları.....	50
Şekil 4.16.	Sarıhıdır İstasyonu Nehir Dip Suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları.....	51
Şekil 4.17.	Avanos İstasyonu Nehir Dip Suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları.....	51

Şekil 4.18.	Gülşehir İstasyonu Örnek Altı Suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları.....	52
Şekil 4.19.	Sulusaray İstasyonu Örnek Altı Suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları.....	53
Şekil 4.20.	Sarıhıdır İstasyonu Örnek Altı Suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları.....	53
Şekil 4.21.	Avanos İstasyonu Örnek Altı Suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları.....	54



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	Santigrad derece
ABD	Amerika Bileşik Devletleri
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
eDNA	Environmental DNA
COI	Mitokondriyal Sitokrom C Oksidaz I
NGS	Next-Generation Sequencing
rRNA	Ribosomal RNA
YND	Yeni Nesil Dizileme
ITS	Internal Transcribed Spacer
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
mL	Mili Litre
L	Litre
BMWP	Biyolojik İzleme Çalışma Grubu Biyotik indeksi
BOİ	Biyolojik Oksijen İhtiyacı
pH	pH değeri
USEPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu
CO	Çözünmüş Oksijen
M	Metre
Cm	Santimetre
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
µl	Mikrolitre
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
ng	Nanogram
dNTP	Nükleozit Trifosfat
nM	Nanometre
FastQC	Fasta Kalitesinin Kontrolü
FastQ	Fasta Kalitesi
AfterQC	Kalite Kontrol Öncesi
QIIME2	Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2

Tsv	Ayrılmış Değerler
OTU	Operasyonel Taksonomik Üniteler
DADA2	Bölümsel Amplikon Gürültü Azaltma Algoritması 2
ASV	Amplikon Dizi Varyantı
NDS	Nehir Dip Suyu
OAS	Örnek Altı Suyu
Bp	Baz çifti



1.BÖLÜM

GİRİŞ

Türkiye; 3 tarafı denizlerle çevrili kara parçasına ilave olarak jeolojik ve jeomorfolojik özelliklerine göre içerisinde bol sayıda akarsu, göl ve nehirleri bulunduran bir alana yayılmıştır. Su kaynaklarının olması ülkemiz açısından, endüstri-sanayi, tarım-ziraat alanları bakımından avantajlı oluşturmaktadır. Su kaynakları özellikle canlılar için yaşamsal faaliyetleri ve bununla ilgili gereksinimlerini gidermek adına doğrudan ve dolaylı olarak çok büyük bir öneme sahiptir [1].

Canlı yaşamını sürdürebilmesi için vazgeçilmez bir unsur olan su, ekosistem üzerinde çok önemli bir yere sahiptir. Su kaynaklarının kalitesinin düşmesiyle aktif bir şekilde kullanılmayan su ve ayrıca; organik, inorganik ve radyoaktif kirletici varlığı su kirliliğinin göstergesidir. ABD Çevre Koruma Örgütü'nün kaynaklarına göre su kirliliği, suya farklı miktar ve yoğunlukta yabancı maddelerin karışımı ile suyun kalitesinin düşmesi şeklindedir. Su kirliliğinde, kirletici ortama ne kadar fazla şekilde nüfuz ederse suyun yapısının bozulması o kadar fazla olmaktadır. Su kirliliği tüm canlıları etkileyen bir durum olmakla birlikte, besin zincirinde yok olmalar kaçınılmazdır [2].

Ülkemizde bulunan çok sayıda su kaynaklarında yaşamlarını sürdüren birçok mikro ve makro organizmalar mevcuttur. Tatlı ve tuzlu su kaynaklarında yaşayan binlerce sucul canlı türü vardır. Bunlardan bir tanesi de bentik organizmalardır [3].

Su ekosistemindeki besin zincirinin fitoplanktonik ve zooplanktonik canlılardan sonraki üçüncü halkasını bentik organizmalar oluşturmaktadır. Sucul habitatların dip kısımlarında yaşayan bentik organizmalar sediment, makrofitler, ipliksi algler üzerinde veya tamamen toprakta gömülü olarak yaşarlar. 0,5 mm'den büyük hayvan grupları olarak tanımlanmakla birlikte, erken larva dönemlerini geçiren bazı bentik makroomurgasızlar 0,5 mm'den daha küçük olduğu bilinmektedir [4].

Biyoidikatör olarak kullanılan bentik organizmalar; mevsimsel değişimler, biyomas değerleri, tür kompozisyonları ile değerlendirilerek su kirliliğinin veya su kalitesini

ortaya çıkarmakta büyük rol oynarlar [5]. Bunu bazı özellikleri yardımıyla biyoindikatör olarak kullanılmaları sayesinde yaparlar.

Sedimentlerde yaşıyan ve özellikle olumsuz ortam şartlarından kaçabilme yeteneği çok sınırlı veya hiç olmayan bentik organizmalar; kirliliğin etkilerine en olumsuz şekilde maruz kalıp, kirlilik düzeyini çabuk gösteren canlılardır. Özellikle bir bölgedeki sucul canlı faunasının kirlilik tehdidi bilinmesi adına belirli zamanlarda kontrol edilmesi gerekmektedir. Bentik makroorganizmalar, sucul ekosistemimdeki kirlilikten dolayı komünite ve çeşitliliğinin etkilenmesini en iyi şekilde gösteren canlılardır [6].

Ülkemizde bulunan Kızılırmak Nehri'de birçok sucul canlıya ev sahipliği yapmaktadır. Kızılırmak Nehri Türkiye topraklarından doğarak yine, Türkiye topraklarından denize dökülen en uzun akarsu olup, uzunluğu 1.355 km'dir [7].

Bu çalışmada biyoindikatör olarak kullanılan bentik organizmalar aracılığıyla, evresel DNA (eDNA) yöntemi kullanılarak Kızılırmak Nehri'nin kirlilik düzeyini incelemek ve özellikle ülkemizde yaygın olarak kullanılmayan evresel DNA yöntemiyle canlıortamına zarar vermeden, bentik organizmalar hakkında bilgi almak amaçlanmıştır.

2.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1 Bentik Organizmalar Hakkında Genel Bilgiler

Bu bölümde morfolojik olarak alanda tespit edilen gruplara ait genel bilgiler ve çalışma hakkında bilgiler verilecektir.

2.1.1 Diptera

Diptera, yaygın olarak sinekler/gerçek sinekler olarak bilinen tek bileşikli böceklerin bir takımıdır. İkinci bir kanat çifti bir dambıl halindedir. Çoğu küçük veya orta büyüklüktedir. Biyolojik açıdan bakıldığında, çok çeşitli böcekleri içeren çok geniş bir takımdır. Diptera sınıfına bağlı 150.000 tür tanımlanmıştır. Bazı türlerin beslenme alışkanlıkları bilinmemekle beraber Diptera üyelerinin çoğu çeşitli beslenme formunu içerirler [8].

2.1.2 Platyhelminthes

Platyhelminthes filumunun bazıları serbest yaşarlar ve diğer türler omurgalılarla parazitik ilişkileri vardır. Bu filumun ana özellikleri triploblastik hayvanlardır, vücutları iki taraflı simetri, acoelomatlar ve dorsoventral olarak yassı bir şekli vardır. Sindirim sisteminin tek açıklığı ağızdır. Boşaltım sistemi protonephridialdir ve işlevi esas olarak ozmotik düzenlemedir ve boşaltım ürünleri esas olarak vücudun yüzeyi tarafından elimine edilir [9]. Bu filumun bazı parazitleri trematoda sınıfına dahildir. Bu sınıftaki solucanlar, asalak yaşam için adaptasyonlara sahiptir ve bunlardan bazıları, vantuz, koruyucu kütikül ile deri, duyu organlarının yokluğu ve büyük miktarlarda yumurta üretimi gibi yapılarla sahiptir [10].

2.1.3 Heteroptera

Heteroptera, 7 alt takıma ve 75-89 aileye ayrılmış, dünya çapında tanımlanmış yaklaşık 42.300 türe sahip oldukça çeşitli bir böcek taksonudur [11]. Vücut boyutları 1 mm'den 10 cm'ye kadar değişir. Heteroptera birçok farklı kaynakla beslenir (örneğin, böceklerin

hemolimfi, eğrelti otları, çoğunlukla dikotiledonlar, algler, tohumların endospermi, bitki poleni). Heteropteranlar, Antarktika, yağmur ormanı, okyanusun açık yüzeyinde, şiddetli ve durgun nehirlerde, aphotik mağaralarda, yağmur havuzlarından ve bitkilerdeki su dolu küçük boşluklardan büyük göllere kadar neredeyse tüm karasal ve su ekosistemlerinde yaşarlar [12].

2.1.4 Oligochaeta

Deniz, nehir ve tatlı su gibi habitatlarda yaşamını sürdüren oligochaeta, hem sucul hem de karasal ortamlarda bulunurlar. Her iki ortamda da yaşayan bu canlı türlerin, yaklaşık olarak, 5.000 türün üçte ikisi toprak solucanlarına ait olup, geri kalan üçte biri sucul olarak belirlenmiştir [13]. Oligochaeta uzuvlarının vücut yapısı genellikle bölünmüş, iki taraflı simetrik, geniş sölömlü ve hermafrodittir. Kesitleri genellikle silindriktir. Peristalsis dışında, her segmentin belirgin sert kıl demetleri, dorsal ve dorsum vardır. Kıllar dermal kökenlidir ve kitin ve protenoidlerin parçalarını içerir. Setalar Oligochaeta grubunun temel özelliklerinden biridir ve hareket sağlar. Sistemik olarak vücut bölümlerinin sayısı ve yapısı ile kılların şekli, sayısı ve konumu önemlidir [14].

2.1.5 Gammaridae

Nehir, akarsu, göl ve denizlerde yaşayan Gammaridea türleri; bu kaynaklara ek olarak da yeraltı suları, kuyu suları ve çeşme yalaklarında dahi görmek mümkün olmaktadır. Genellikle verimli sularda, diğer canlılardan saklanabilecekleri bitki örtüsü arasında, kayaların, kumun, çakılların altında, ölü canlıların arasında vb. yerlerde yaşarlar [15].

2.1.6 Gastropoda

Gastropoda türleri halk arasında salyangozlar olarak da bilinir. Fiziksel özelliklerinde en ayırt edici olanı, kabuklarının kıvrık bir yapıda olmasıdır. Gastropod larvaları erken evrelerde iki taraflı simetriktir. Bununla birlikte, larva büyüdükçe sindirim sistemi, anüs ağza yakın olana kadar aşağı ve öne doğru eğilir. Tüm iç kütle daha sonra 180 derece döner ve vücudun önünde başın arkasına yerleşir. Bu taraftaki iç organların çoğu (genellikle sol taraf) körelir ve asimetric olarak büyümeye devam ederek karakteristik bir spiral oluşmasına neden olur [16].

2.1.7 Nematoda

Nematod türleri böcekler ve diğer omurgasızlarla parazit bir ilişkisi olduğu yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır ve bu çalışmalarla birlikte 30 nematod familyası tanımlanmıştır [17]. Nematodların; ağız, anüs ve spirakıl denilen 3 adet doğal açıklıkları bulunur [18]. Nematodların vücut yüzeyini kaplayan kutikula tabakası, çevresel etkenlere karşı koruyan özel bir yapı bulunmaktadır. Bu özel bölge, epikütula, kortikal bölge (cortical zone), median bölge (median zone) ve basal bölge (basal zone) olmak üzere 4 bölümden oluşmaktadır [19].

2.1.8 Bivalvia

Bivalvia, makrobentik türleri arasında en çok karşılaşılan canlılardan biridir. Besin zincirinin önemli kısmında yer alan balıklar ve kuşlar başta olmak üzere birçok canlı için önemli bir besin maddesidir [20]. Su kirliliği çalışmalarında bivalvia familyasına ait birçok kabuklu türü sucul ekosistemde bol bulunması, metalleri yüksek yoğunluklarda biriktirip, bunları uzun bir süre bünyelerinde tutmalarından dolayı nedeniyle tercih edilmektedir [21].

Bentik organizmalar, özellikle kirlilik etmenlerine çok çabuk şekilde yanıt vererek, kirlilik belirteci olarak çok sık kullanılır. Habitatlarında hareketleri kısıtlı bir şekilde yaşayan bu canlılar birçok araştırma için ilgi kaynağı olmaktadır. Tatlı su ekosisteminde sürekli bulunmaları, besin zincirinde aktif rol oynamaları, ayrıca çevreye bıraktıkları; döküntüler sayesinde, göz önünde bulunmasalar bile çevresel DNA analizleriyle saptanabilecek canlılardır.

2.2 Çevresel DNA

Günümüz koşullarında; araştırma alanında, hedef türleri, biyoçeşitliliği tür yoğunluğunu ve nesli tükenmekte olan canlıları araştırma alanına zarar vermeden belirleyebilmek için geliştirilmiş yeni bilimsel araştırmalar söz konusudur. Özellikle geleneksel yöntemlere göre hedef türün tespiti, zaman, maliyet ve iş gücü yönünden dezavantaj yaratırken bu açılardan avantajlı olan ve kısa sürede hedef türleri belirleyebilen moleküler yöntemler geliştirilmiştir [22]. Bu yeni gerçekleştirilen moleküler yöntemlerden biri olan Çevresel DNA (eDNA) yöntemi, çevresel ortamdan (su, toprak, hava ve sediment gibi) alınan DNA'nın ekstrakte edilmiş halidir. eDNA morfolojik yönden birbirleriyle ilişkili türleri

kolayca ayırt edebilmesi açısından son derece ümit verici moleküler yöntemlerden biri olarak ele alınmaktadır [23]. Ayrıca eDNA nadir bulunan, gözle görülemeyecek ve ayırt edilemeyecek düzeydeki türlerin tespitinde son zamanlarda kullanılan en yaygın yöntemdir. Gerçekleştirilen son çalışmalarda eDNA'nın diğer geleneksel yöntemlere göre daha az maliyetli, yüksek oranda tür tespiti, hassas değerlendirmeleriyle birlikte araştırılan bölge için daha detaylı veri gösterebilmektedir [24].

2.2.1 Çevresel DNA'nın ortaya çıkışı

Çevresel DNA, ilk olarak 1987 yılında Ogram ve arkadaşları tarafından, nükleik asitler doğrudan çevresel ortamdan alınarak kullanılmıştır [25]. Fakat 2000'li yılların başlarında aktif bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Çevresel ortamdan (su, toprak, vb.) alınan örneklerin organizmaya ihtiyaç duymadan bıraktıkları kalıntılar aracılığıyla tespit edilen DNA örneklerinin (canlı vücudundaki gibi kompleks halde olmayan), canlılar hakkında bilgi vermesi birçok çalışmanın başarılı sonuçlanmasını sağlamıştır [26]. Son yıllarda geliştirilen eDNA yöntemleriyle birlikte literatüre birçok çalışma kazandırılmıştır. Günümüzde DNA temelli çalışmaların başında DNA Barkodlama yöntemi, standart moleküler belirteç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca farklı düzeylerde kullanılan; ekometagenetik, ekogenomik, çevresel barkodlama veya DNA metabarkodlama yöntemleri PCR temelli çalışma olmakla birlikte birden çok taksonun belirlenmesinde kullanılmaktadırlar [27].

2.2.2 DNA barkodlama

Moleküler tür tanımlaması olarak da bilinen DNA Barkod terimi ilk olarak 1993 yılında literatüre kazandırılmıştır. Sanger metodundan bile önce bulunan DNA barkodlama yöntemi, 2003 yılında kullanılmaya başlanmıştır [28]. Kısa DNA dizilerinin kullanımını esas alan DNA barkodlama yöntemi temelde canlı farketmeksizin tür seviyesinde farklılıklarıyla tanımlanmasını sağlayarak biyolojik barkod oluşturmaktadır. Biyolojik barkod veri tabanında kaydedilen DNA dizilerinin, tanımlanamayan türler ile karşılaştırılmasıyla tanımlamalar gerçekleştirilir ve tür tanımlarının temelini oluşturmaktadır [29]. DNA Barkodlama yönteminde gerçekleştirilecek belli aşamalar; canlılardan elde edilen örneklerin DNA'ları izole edilip, hedeflenen bölgenin çoğaltılması işlemi olan PCR kullanılarak, ardından DNA dizi analizleri yapıldıktan sonra yeni

bulunan türlerin barkod veri tabanına kaydedilmesi veya veri tabanında bulunan dizilerle, örnek dizilerin karşılaştırılmasıyla tür tanımlanması esasına dayanmaktadır [30].

DNA barkod hedeflenen bölgeleri; (COI) geni, ribuloz 1,5-bifosfat 4 karboksilaz (rbcL) ve maturaz K (matK) genleri, ITS geni ve 16S - 18S ribozomal RNA (rRNA) genidir [31].

2.2.3 DNA metabarkodlama

DNA Barkodlamanın keşfinin hemen ardından DNA Metabarkodlama geliştirilmiştir. Geleneksel yöntemler örnekleri teker teker dizileyebilir fakat özellikle daha fazla tür tayini gerektiren yöntemler için yeterli olmamaktadır. Belirli bir çevreden alınan örneklerin içeriğinde bulunan DNA'ların aynı zamanda elde edilebilmesi için DNA'lara çoklu okuma yapılmaktadır ve ayrıca Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemi geleneksel Sanger yöntemine göre daha fazla avantaj sağlamaktadır [32]. DNA Barkodlama tek bir türün tanımlanmasında kullanılan bir yöntem olmakta olup; DNA Metabarkodlama, birden fazla türün eş zamanlı olarak taksonlar halinde tanımlanmasında kullanılan bir yöntemdir. Yeni Nesil Dizileme (NGS) ile birlikte tek bir reaksiyon ile birden fazla türün aynı anda metabarkodlaması gerçekleşmektedir [33]. Sucul ve karasal ekosistemlerdeki tür tayini, biyoçeşitlilik gözlemlenmesinde başarılı ve uygulanması kolay olduğu eDNA Metabarkodlama yönteminin sonuç verdiği çalışmalar ile desteklenmiştir. Bistra ve ark. (2017) yaptıkları eDNA çalışmasında metabarkodlama yöntemiyle belirlenen biyoçeşitliliğin mevsimsel dağılımının geleneksel yöntemle belirlenen biyoçeşitliliğinin mevsimsel dağılımıyla benzer olduğu görülmüştür.

2.2.4. Metagenom

Metagenomik terimi ilk olarak 1988'de Jo Handelsman grubu tarafından karışık çevresel DNA türlerinin işlev temelli analizine atıfta bulunarak kullanılmıştır. Pace ve arkadaşları (1991), bir çevresel örnekteki mikroorganizmaların çeşitliliğini kültür yapmadan tanımlamak için ortamdaki 5S ve 16S rRNA gen dizilerinin doğrudan analizini kullanmışlardır. Bu, toplu DNA'nın çevresel bir örnekten izole edilmesi ve klonlanmasıyla ilgili ilk çalışma olarak ortaya konmuştur [34].

Metagenomik, saf kültürler elde etmeye gerek kalmadan mevcut mikroorganizmalar topluluğunu incelemek için çevresel örneklerden elde edilen DNA'yı analiz etmek için kullanılan moleküler bir araçtır. Metagenomik, spesifik olarak, uygun büyüklükte DNA fragmanlarının üretilmesini ve fragmanların uygun bir klonlama vektörüne bağlanmasını

içeren metagenomik kütüphanelerin yapımını ifade eder [35]. Metagenomik analizler yeni nesil dizileme (YND) yöntemleriyle hızlı ve yüksek doğrulukla yapılır. Bu teknoloji ile bitki, bakteri, maya, küf, virüs gibi mikroorganizmaların genomlarını başarılı şekilde dizilenir. Günümüzde popüler olarak, Illumina Genome Analyzer, Complete Genomics, Applied BioSystem SOLID, Helios ve IonTorrent gibi Yeni Nesil Dizileme araçları kullanılır [36]. Metagenomiklerin Sanger sonrası dizileme ile birlikte kullanılması, mikrobiyal toplulukları hızlı bir şekilde tanımlama, karakterize etme ve ayrıntılı olarak anlama yeteneği sunmaktadır [37]. Metagenomik amplikon ve shotgun dizileme olmak üzere iki şekilde analiz yöntemi kullanılmaktadır. Örnekteki toplam mikroorganizmaların DNA izolasyonu yapıp belirli gen bölgeleri hedeflenir. Bunlar, yüksek oranda korunmuş ve taksonomik bilgi veren 16S rRNA, 18S rRNA ve ITS gibi genlerdir [38]. Hedeflenen metagenomikleri gerçekleştirmek için, çevresel DNA ekstrakte edilir ve ilgili gen için en büyük sekans çeşitliliğini çoğaltmak üzere tasarlanmış primerler kullanılarak PCR amplifiye edilir. Çoğaltılan gen bölgeleri yeni nesil dizileme metodu ile tanımlanır [39].

2.2.5 18S rRNA

Metagenom çalışmalarıyla mikrobiyal analiz 2 farklı DNA bölgesiyle gerçekleştirilmesi benimsenmiştir. Kullanılan en yaygın yöntem, bakteriyel genomun 16S rRNA ve ökaryotik genomun 18S rRNA gen kodlama bölgesinin analizidir. Prokaryot ve ökaryot türler arasında 16S ve 18S rRNA, yüksek derecede korunmuştur, fakat türlerin tanımlanması için yararlanılabilen dokuz hiper değişken bölge (V1-V9) içermektedirler [40].

2.3 Literatür Özeti

2.3.1 Çevresel DNA (eDNA) çalışmaları

Dejean ve arkadaşları (2012), Takahara ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmalarda, daha önce havuzlarda geleneksel yöntemler kullanılarak tanımlanan hedef türlerin eDNA yöntemleri kullanılarak da tanımlandığını belirtmişlerdir. Ayrıca daha önce keşfedilmemiş hedef türlerin eDNA yöntemi ile tespit edilebilmesi, yöntemin çok daha hassas olduğunu kanıtlamaktadır. Ancak bazı durumlarda eDNA analizi başarı oranı her zaman %100 olmayabilir. Araştırma ilerledikçe, eDNA tabanlı tanımlama yöntemlerinin başarı oranının artması beklenmektedir [41-42].

Rees ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışmada sucul türlerin eDNA metodolojisiyle tespiti ve bu yöntemin ekolojideki yeri gözden geçirilmiştir. eDNA analizi, su numunesinin toplanması, eDNA'nın ekstraksiyonu ve hedef organizma için PCR adımının kuvvetlendirilmesini içerir. DNA ekstraksiyonu ve gerçek zamanlı PCR birkaç saat içinde yapılabilir, dolayısıyla bu teknik bir hedef türün varlığını tespit etmek için hızlı bir yöntemdir. Yeni nesil dizileme yönteminin kullanımı, su numunelerinde tüm faunanın tespit edilebileceğini göstermiştir. Farklı ortamlar için farklı örnekleme metodolojilerine sahip olmak önemli olsa da verilerin daha iyi karşılanabilmesi için laboratuvar prosedürlerinin standartlaştırılabilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada kullanılan su numuneleri laboratuvar tankları da dahil olmak üzere deneysel, yapay ve doğal göletler ve göller; lagünler, akarsular, nehirler ve deniz suyundan alınmıştır. Numune miktarları 15 mL (laboratuvar tanklarında, doğal göletlerden veya göllerden, akarsulardan ve deniz suyundan) ile 10 L (nehirden) arasında değişmektedir. Akarsulardan, nehirlerden, lagünlerden ve deniz suyundan alınan standart numune miktarı normalde 1-2 L'dir. Dört farklı DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak su numunelerinden eDNA ekstraksiyonu için birçok yöntem tanımlanmıştır. Ekstrasyon adımından önce su numunelerinin işlenmesinde önemli farklılıklar vardır. Numune koruma, filtrasyon ve DNA izole etme yöntemleri numune tipine göre değişiklik göstermekte olup farklı işleme yöntemlerinin eDNA üzerindeki etkilerini izlemek için bu yöntemlerin doğrudan karşılaştırılmasının yararlı olacağını bildirmişlerdir [43].

Türkiye'de gerçekleştirilen ilk eDNA çalışması olarak kayda geçen çalışma, Keskin (2014a) tarafından istilacı balık türleri üzerinde yapılmıştır. Geleneksel yöntemlerle tespit edilemeyen istilacı tür çalışma sonuçlarını; tatlı sularda yaşayan istilacı türlere odaklı eDNA metoduyla belirlediği tür sonuçlarıyla karşılaştırmıştır. Ayrıca yaptıkları çalışma ile, geleneksel yöntemlerle tespit edilemeyen istilacı balık türlerinden olan *Pseudorasbora niloticus*'un tespiti yapılmış ve literatüre kazandırılmıştır [44].

Keskin (2014b) tarafından yapılmış olan diğer bir çalışmada; çevresel DNA (eDNA) kullanılarak Acıgöl'e ait endemik ve risk altındaki *Aphanius transgrediens* türünün göle dökülen hangi kollarda bulunduğu ve tehlike altına girmelerinde etkili olduğu düşünülen göle taşınan istilacı *Gambusia affinis* türünün etkisi araştırılmıştır [45].

Düzenli biyolojik araştırmaların, tatlı su ekosistemlerinin bilinçli yönetimi için gerekli olduğunu belirten Shaw ve arkadaşları (2016), mevcut morfolojiye dayalı biyoçeşitlilik çalışmaların zaman alıcı ve finansal açıdan pahalı olabileceğini belirtmişlerdir. Son zamanlarda alternatif zaman ve maliyet etkin biyolojik araştırma aracı olarak çevresel DNA (eDNA) dizileme yöntemini önermişlerdir. Bununla birlikte, eDNA araçlarının doğal ekosistem deneylerine dayalı doğrulamayı gerektirdiğini söyleyerek; çalışmada, iki kompleks ve kuraklığa eğilimli nehir sistemlerinde, eDNA metabarkodlamasıyla elde edilen balık popülasyonu verilerini ve geleneksel avcılık yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Ayrıca nadir bulunan ve tehdit altındaki balık türlerini tespit etmek için farklı eDNA örnekleme stratejileri ve genetik belirteçleri karşılaştırarak, tehlikeli ve invaziv türler de dahil olmak üzere, uygun örnekleme stratejileri kullanılarak geleneksel yöntemle yakalanan türlerin % 100' ünü eDNA ile tespit etmişlerdir. Spesifik olarak, istasyon başına iki adet 1 l'lik su numunesinin daha az bireye sahip popülasyonları saptamak için yetersiz olduğunu; bununla birlikte, istasyon başına beş adet 1 l'lik numuneler alındığında % 100 tespit etme oranı elde ettiklerini ortaya koymuşlardır. Dahası eDNA örneklemesinin su sütunundansa sedimentten yapılmasının daha etkili olarak görüldüğünü bildirmişlerdir. Sekansların biyoinformatik analizleri mantıksal çıkarsama ya da yerel bilgi olmaksızın, hatalı sonuçlara yol açabileceğinden, eDNA verisinin dikkatle yorumlanmasının çok önemli olduğuna dikkat çekmişlerdir [46].

Aygalas ve arkadaşları (2016) yaptığı bir çalışmada, metabarkod çalışmaları ile aynı ortamda yapılan morfolojik analizlerdeki eksik olan türlerin tespit edildiği bildirilmiştir [47].

Klymus ve arkadaşları (2017), mitokondriyal 16S rRNA genlerine dayalı olarak Laurentia Gölü ve çevresindeki sulardaki istilacı çift kabuklular ve gastropodlar üzerinde eDNA metabarkodlama çalışmaları yürütmüş ve sonuçlar metabarkodlama yönteminin yumuşakça türlerinin tanımlanmasında morfolojik analizden daha etkili olduğunu göstermiştir [48].

Blackman ve arkadaşları (2017) eDNA metabarkodlama yöntemiyle yaptıkları çalışmada İngiltere nehirlerinde yoğun olarak gözlenen, *Gammarus fossarum* türünü tanımlamışlardır. Bu çalışmada metabarkodlama yöntemiyle, morfolojik yöntem karşılaştırılmıştır. Metabarkodlamada COI gen bölgesi kullanılmış ve çalışma sonucunda

doğal yaşam alanlarındaki istilacı türleri tespit etmede eDNA metabarkodlama yönteminin önemli bir araç olabileceği gösterilmiştir [49].

Bista ve arkadaşları (2017), makroomurgasızların hedef tür olarak seçildiği bir eDNA çalışmasında; eDNA'nın biyoçeşitliliği tespit etmedeki etkinliği ve eDNA'nın zaman içindeki mevsimsel çeşitliliği izlemedeki kalıcılığı, metabarkodlama yöntemiyle denenmiştir. Bir yıl boyunca göl sisteminden alınan su örneklerinin (eDNA) sonuçlarının klasik taksonomide tanımlanan mevsimsel sonuçlarla paralellik gösterdiği ve hatta birçok yeni türün varlığını ortaya koyduğu sonucuna varılmıştır. Çalışma, tatlı sudan alınan eDNA yönteminin biyolojik izleme ve biyolojik çeşitlilik gibi ekosistem fonksiyonlarının ilişkisine yönelik gelecekteki araştırmalar için ekolojik olarak önemli olduğu bulgusuna dikkat çekmektedir [50].

Fernandez ve arkadaşları (2018)'nin Nola Nehri'nin üst bölgesi boyunca 6 istasyonda yaptıkları çalışmada dip suyu örneği toplamışlar ve bu örneklerin 18S metabarkodlama ile araştırılması sonucu bentik faunayı azalan bolluğa göre Nematoda > Porifera > Arthropoda > Cnidaria olarak gruplandırdıklarını bildirmişlerdir [51].

Mi-Jung Bea ve arkadaşları (2021) yapmış oldukları çalışmada; Nakdonggand Nehri yakınlarında bulunan terk edilmiş bir maden ocağının bentik organizmalar üzerine olası ağır metal etkilerini araştırmışlardır ve bunu gerçekleştirmek için nehirde makroomurgasız izlemesi yapmışlardır. Surber net ve eDNA yönteminin karşılaştırıldığı çalışmada 12 bentik makroomurgasız belirlediklerini bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca 8 bentik cinsin her iki yöntemde de tespit edildiğini belirtmişlerdir [52].

2.3.2 Bentik organizma çalışmaları

Dügel ve Kazancı (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, Türkiye'nin güneybatısındaki Büyük Menderes Nehri'nin 17 bölgesindeki su kalitesi, megazoan bentik ve fizikokimyasal veriler kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, hafif, orta ve ağır organik kirliliğin, Büyük Menderes Nehri boyunca çeşitli topluluklarda megazoan bentik organizmaların birikimlerini bulduğunu göstermiştir [53].

Kara ve Çömlekçioğlu (2004), Karasay Nehri'ndeki kirlilik seviyelerini belirlemek için nehir boyunca üç noktadan numune topladığı bir çalışma yürütmüştür. Sonuçlar, nehrin endüstriyel, tarımsal ve evsel atıklardan kaynaklanan ciddi kirlilikle karşı karşıya

olduğunu göstermektedir. Ayrıca Kara ve Çömlekçioğlu, 3'üncü numune alma istasyonunun nehrin en kirli bölgesi olduğunu ve bu nedenle bölgede su yaşamının az olduğunu belirtmiştir [54].

Kalyoncu ve Zeybek (2009), Ağlasun ve Isparta kaynakları ile ilgili yaptıkları çalışmada, suyun fizikokimyasal analizi için sudan numuneler almışlar ve taban omurgasızlarını toplamışlardır. Elde edilen sonuçlara göre 1 takson Oligochaeta elde edilmiştir [55].

Varnos Fadelany ve arkadaşları (2010), bir yıllık bir süre boyunca Zayandeh Rud Nehri'ndeki sekiz bölgede makroomurgasız topluluklarını analiz etmişler ve 42 bentik organizma grubu tespit ettiklerini ve BMWP (Biyolojik İzleme Çalışma Grubu Biyotik indeksi) indeksinin bu nehrin su kalitesini tahmin etmek için kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Nehrin aşağı tarafının yukarı kısmına göre daha kirli olduğunu kaydetmişlerdir [56].

Lock ve arkadaşları (2011) Bulgaristan'da İskar nehrinin makroomurgasız topluluğunu 15 istasyonda analiz ederek su kalitesi değerlendirmesi yapmışlardır. Kimyasal ve biyolojik veriler, nehrin Sofya şehrine kadar ki üst bölümünün alt bölümüne (büyük arıtma tesisine rağmen) kıyasla daha temiz olduğunu göstermiştir [57].

Adeogun ve Fafioye (2011), Nisan 2007 ile Mayıs 2008 arasında 4 istasyonda Awba Nehri ve rezervuarının fizikokimyasal parametrelerini ve makro-omurgasız çeşitliliğini incelemişlerdir. İkinci istasyonda amonyak nitrojeni ve çözünmüş karbondioksit yüksek, çözünmüş oksijen, düşük bulunmuştur. Çinko ve mangan değerleri Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu (USEPA) değerlerinden yüksek çıkmıştır. 2. istasyonundaki makroomurgasızların popülasyonu diğer istasyonlara göre yoğunlukları daha fazla bulunmuş ve makroomurgasız grupları içerisinde Chironomidae familyasının %94 oranında baskın olduğu bildirilmiştir [58].

Flores ve Zafaralla (2012), Filipinler'deki Mananga Nehri'ndeki makroomurgasız çeşitliliği ve su kalitesi koşullarını karşılaştırdıkları çalışmalarını Şubat 2006 ve Aralık 2006 tarihleri arasında yapmışlardır. Aşağı akış yatağı derinliği, genişliği ve yapısındaki değişikliklerin akışı azalttığını ya da akışı artırdığını bulmuşlardır. Bu değişikliklere yanıt olarak, askıda katı madde miktarı, sıcaklık ve BOİ (biyolojik oksijen ihtiyacı) seviyelerinin arttığını, buna karşın pH ve çözünmüş oksijen seviyelerinin düştüğünü

kaydetmişlerdir. Bu bağlamda, fizikokimyasal faktörlerdeki değişikliklerin makroomurgasızların kompozisyonunu ve çeşitliliğini etkilediğini bildirmişlerdir. Toplam 37 aile tespit edilmiş, bunun %58,6'sının suda yaşayan böcekler (hexapoda) ve %39,9'unun gastropodlar (gastropoda) olduğunu bildirmişlerdir. Fiziko-kimyasal ve makro-inversiyon çeşitlilik indeksi sonuçlarını kullanarak, nehrin membasındaki istasyonların orta derecede kirli olduğunu, mansabındakilerin ise çok kirli olduğunu bulmuşlardır [59].

Akaahan (2014) Nijerya'nın Makurdi bölgesinin Benue Nehri'nde Temmuz 2011-Haziran 2013 tarihleri arası 5 istasyonda çalışmışlar ve makroomurgasız çeşitliliğini belirlemişlerdir. Sediment örneklemede Van Veen grap kullanmışlardır. Ortalama 4451 birey/m² tespit etmiştir. Toplamda 21 takson bulduklarını ve istasyon 2 ve 3'ün kirli olduğunu bildirmişlerdir. Zira bu istasyonlarda biyolojik çeşitliliğin çok az olduğunu ve nehrin insan yoluyla organik kirliliğe maruz kaldığını belirtmişlerdir [60].

Ojija ve Laizer (2016), Tanzanya'daki Nzovwe Nehri'ni Kasım 2015'ten Şubat 2016'ya kadar 2 haftalık aralarla yaptıkları çalışmada bentik ve su örneği almışlardır. Bentik omurgasız nehirde ortalama 584 birey sayısı/m² olarak belirlemişlerdir. Bulunan familya sayısı 22 olmak üzere en yaygın taksonlar %35.6 ile Odonata, %25.51 ile Hemiptera, %18.49 ile Coleoptera ve %12.84 ile Diptera takımlarına aittir. BMWP 115 indeks değeri ile çok temiz olarak bulunmasına rağmen, Nzovwe Nehri'nin orta derecede kirli olduğu ve birçok kaynaktan kirlendiğine dikkat çekmişlerdir. Çalışma sonucunda yetkili makamın nehri sürekli olarak izlemesi ve kirlilik kaynaklarını kontrol etmesi tavsiye edilmiştir [61].

Aras ve Fındık (2023) Kızılırmak nehrinin aynı bölgesinde yaptıkları çalışmada çalışmanın örneklerini 2013-2014 yıllarında almışlar ve çalışma sonucunda 10 taksonomik gruba ait 18166 birey bulduklarını belirtmişlerdir. Gastropoda grubunun %81,5 ile en yüksek temsil edilen grubu oluşturduğunu, bunu %9,8 ile Gammaridae ve %6,2 ile Oligochaeta grubunun takip ettiğini belirtmektedirler [62].

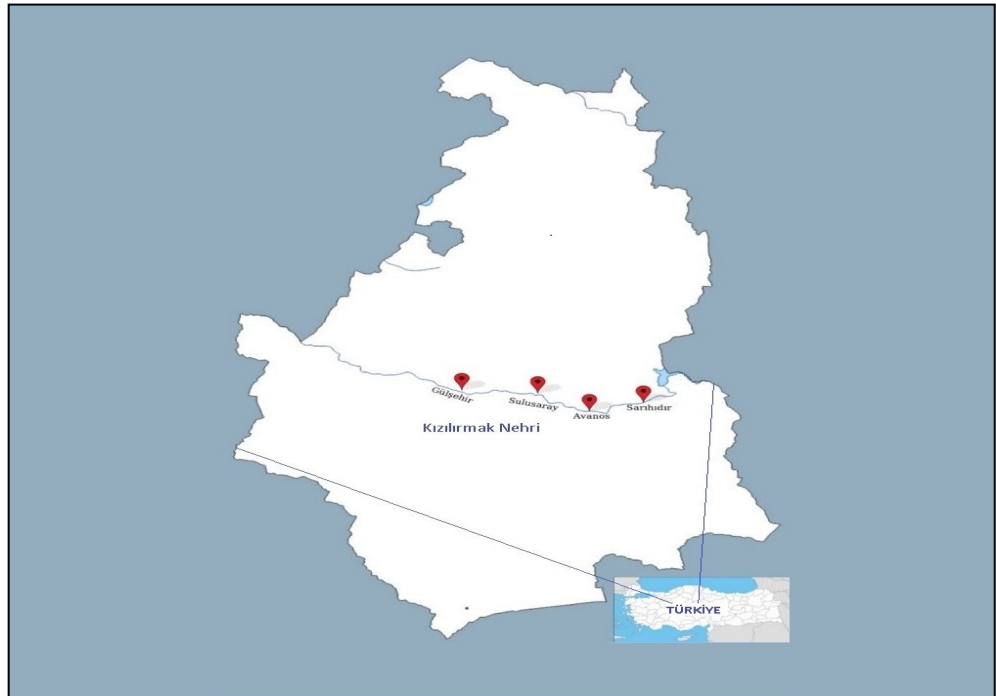
3.BÖLÜM

MATERYAL – YÖNTEM

3.1 Çalışma Alanı

Kızılırmak Nehri, Türkiye ‘de doğan ve yine Türkiye sınırları içerisinde denize dökülen 1.355 km (841 mil) uzunluğu ile Türkiye’nin en uzun nehridir. Nehir Sivas İmranlı ilçesinde bulunan Kızıldağ eteklerinden başlayıp, Samsun Bafra ilçesinden Karadeniz’e dökülmektedir [63]. Kızılırmak, Nevşehir ilinde yer alan Avanos ve Gülşehir ilçelerinden geçmektedir. Bölgede ayrıca Damsa Çayı ve Acıgöl Deresi bulunmakta olup, sulamada bu kaynaklardan faydalanılmaktadır. Çalışma alanı olarak; Nevşehir Kızılırmak Bölgesi’nde sıklıkla rapor edilen bentik organizma faunası baz alınmıştır. Kızılırmak çevresinde Gülşehir ilçesi, Sulusaray Köyü, Sarıhıdır Köyü ve Avanos ilçesi olarak 4 istasyon belirlenmiştir.

Nehre ait örnekleme noktaları Şekil 3.1’de gösterilmektedir. İstasyonlara ait bilgi ve fotoğraflar Şekil 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5’de ve Tablo 3.1 ‘de verilmiştir.



Şekil 3.1. Nevşehir Kızılırmak Örnekleme İstasyonları



Şekil 3.2. 1. İstasyon (Gülşehir İstasyonu)

Gülşehir istasyonu nehrin genişlediği, çevresinde tarım alanlarının olduğu bölgede yer almaktadır. Aynı zamanda istasyon yerleşim bölgesindedir.



Şekil 3.3.2. İstasyon (Sulusaray İstasyonu)

Sulusaray istasyonu Kızılırmak Nehri'nin bir koludur. Nehrin dar olan bu kolundaki istasyonun etrafında yerleşim yeri çok azdır ve çevresinde genellikle araziler bulunur.



Şekil 3.4. 3. İstasyon (Sarıhıdır İstasyonu)

Sarıhıdır istasyonu Kızılırmak Nehri'nin en geniş olduğu yerlerden biridir. Çevresinde araziler, tarım alanları ve yer yer köyler bulunmaktadır.



Şekil 3.5. 4. İstasyon (Avanos İstasyonu)

Avanos istasyonu Kızılırmak'ın orta derecede geniş olduğu istasyondur. Örnekleme noktası yerleşim yeri içerisinde kalmakta ve bölge aynı zamanda yoğun turist alan bölgedir.

Tablo 3.1. Örnekleme noktalarına ait bilgiler (Koordinat ve yükseklikleri)

İstasyon Adı	Koordinatlar	Yükseklik (m)
1. İstasyon Gülşehir	38°45'23'' K 34°36'55''D	900
2. İstasyon Sulusaray	38°42'7'' K 34°43'9''D	990
3. İstasyon Sarıhıdır	38°44'7'' K 34°55'48''D	940
4. İstasyon Avanos	38°43'1'' K 34°51'21''D	920

3.2 İstasyonlardan Örneklerin Alınması

Belirlenen 4 farklı istasyondan tek mevsim olacak şekilde su ve sediment olmak üzere toplam 8 örnek (negatif kontroller hariç) alınmıştır. Bentik organizmaların belirlenebilmesi amacıyla özellikle ergin döneme geçiş ve larva aşamalarının son evrelerinde olabilecekleri dönem düşünülerek arazi çalışması ilkbahar sonu yaza geçiş dönemi olacak şekilde arazi çalışması planlanmış ve haziran ayının ilk haftası olarak örnekleme gerçekleştirilmiştir. Örnekleme yapılacak noktaları belirleyebilmek amacıyla daha önce bir ön arazi çalışması yapılmış ve istasyonların lokasyonları belirlenmiştir. Su örneklerinin alınmasında Ficetola vd., 2008'de belirtilen yöntem kullanılmıştır. Su örneklerinin alınmasında 500 ml'lik steril şişeler kullanılmış olup dip suyu olacak şekilde su örnekleri alınmıştır. Ayrıca su örneği alınan noktalardan morfolojik tanımlama için bentik organizma örnekleri alınmıştır. Belirlenen istasyonlardan alınan dip suyu örneklerine 33 ml saf etanol eklenmiş ve örnekler DNA İzolasyonu işlemine kadar -20 °C'de saklanmıştır. Bölgenin yaşamsal parametrelerinin incelenmesi adına örnekleme yapılan istasyonlarda ph, çözülmüş oksijen, iletkenlik ve suyun sıcaklık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bentik organizmaların bulunduğu su örnekleri bekletilmiş ve bekletilen su örnekleri içinde DNA izolasyonu sağlanmıştır.

3.3 Laboratuvar Çalışmaları

3.3.1 Bentik omurgasızların morfolojik olarak incelenmesi

Araziden getirilen sediment örnekleri, içinde su bulunan büyük beyaz, sıg bir kaba boşaltılmış ve ön eleme işlemi yapılmıştır. Sediment örneklerinin bir kısmı özellikle incelenmesi adına büyük kaptan petri kabı veya daha küçük kaba aktarılarak mikroskop altında incelenmiş ve bulunan bentik organizmalar farklı su dolu petri kabına aktarılarak

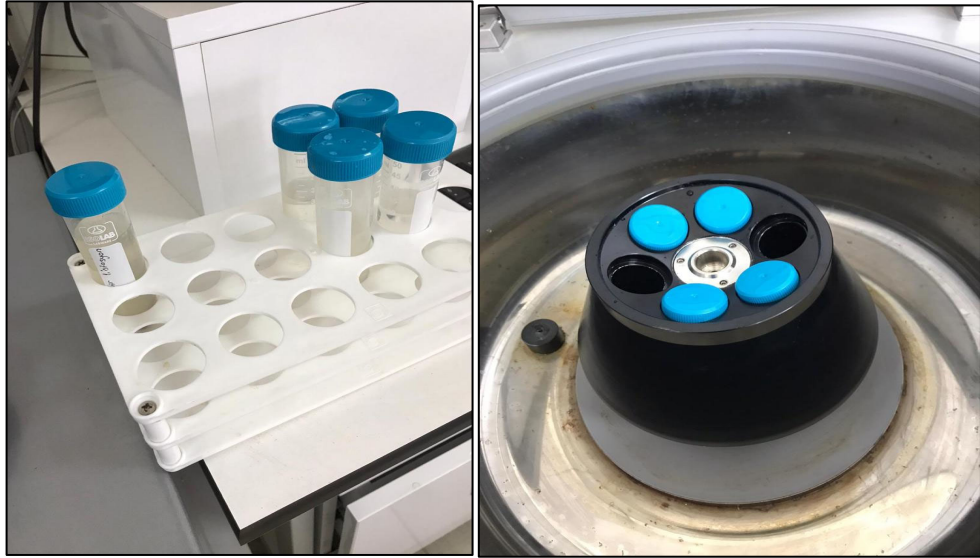
grup ayrımları yapılmıştır. Tanımlanan gruplar kavanozlara aktarılarak içerisine %70'lik etil alkol konularak saklanmıştır. Örneklere, örnekleme yeri, zamanı ve organizmaların adını içeren etiketler yerleştirilmiştir. Grup tanımlamaları için Campaioli ve diğerleri (1994) ve Campaioli ve Carchini (1999)'dan yararlanılmıştır [64-65].

3.3.2 eDNA için analizler

eDNA analizi için alınan su örneklerine uygulanan işlemler aşağıda ayrıntılı başlıklar içerisinde belirtilmiştir. Bu aşamada izolasyon, dizi analizleri ve metabarkodlama işlemleri hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu öncesinde örneklere Ficotela, (2008)'de belirtilen yöntemle göre santrifüj işlemi uygulanmıştır. Laboratuvar ortamı eDNA yapısı açısından kontaminasyon riski yüksek olduğu için steril duruma getirilmiştir. Hazırlanan örnekler ilk etapta 50 cm'lik santrifüj tüplerine aktarılarak 2 dk boyunca 4000 rpm devirde santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen pelet yeni santrifüj tüplerinde toplanmıştır. İzolasyon, hem standart doku veya kandan DNA izolasyonu kitleri hem de sudan DNA izolasyonu için tasarlanmış kitler kullanılarak, üretici firmanın belirlediği protokole göre gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6: DNA Santrifüjleme İşlemi

Çalışma boyunca pozitif örneklerde temas, malzeme veya taşıma durumunda kontaminasyon riskine karşın, her istasyondan 3 adet örnek toplanmıştır. Bunlar her istasyon da 2 negatif, 1 pozitif kontrol olacak şekildedir [66]. Hedef türlerin yaşamadığı bölgelerden alınan örneklerinde, asıl örneklerle birebir aynı işlemlerden geçirilmesi sağlanmıştır.

Öncelikle -20°C’de saklanan örnekler 24 saat laboratuvarında çözdürülmüştür. Çözdürülen her bir örnek için 50 ml’lik steril falkon tüplere boşaltılarak santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Santrifüjlenen örnekler yeni falkon tüplere aktararak etiketleme işlemi yapılmış olup, eDNA izolasyonu için yeniden -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Literatürde bulunan çeşitli eDNA izolasyon protokollerinden; ön çalışmalar sonrasında, araştırmamızın eDNA izolasyonu kısmı şekillendirilmiştir. Örneklerin DNA izolasyonu, EurX GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA Pürifikasyon kiti kullanılarak, kit üretici firmanın prosedürüyle gerçekleştirilmiştir. eDNA izolasyon protokolü aşağıda belirtilen şekilde uygulanmıştır.

DNA bağlama döndürme sütunları aktivasyonları için;

Döndürme sütununa 40 µl aktivasyon Tamponu T uygulanmıştır ve lizatı döndürme sütununa aktarana kadar oda sıcaklığında belenmiştir.

Tampon T'nin reçinenin merkezine eklenmesi, zarların tamamen ıslanmasını ve DNA'nın maksimum düzeyde bağlanmasını sağlamıştır. İzolasyon işlemine başlamadan önce membran aktivasyonu yapılması önemlidir. Örnek hazırlama için;

200 µl sıvı numuneye 2 µl RNase A eklenmiştir.

Not 1: 200 µl'den düşük numune hacimleri için, hacmi 200 µl'ye ayarlamak için PBS eklenmiştir.

Tüpü vorteksleyerek iyice karıştırılmıştır.

Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.

10 µl Proteinaz K eklenmiştir.

DNA izolasyonu için;

200 µl tampon Sol T (D. Sıvı dokular, E. Kültürlü hücreler) veya 350 µl tampon Sol T eklenmiştir ve vorteksleyerek iyice karıştırılmıştır. 70°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. 200 µl %96'lık etanol eklenmiştir.

Tüpü vorteksleyerek iyice karıştırılmıştır.

1 dakika 12000 rpm'de santrifüjlenmiştir.

Toplama tüpüne yerleştirilen döndürme kolonuna tüm lizati veya 600 µl süpernatanı aktarılmıştır.

1 dakika 12000 rpm'de santrifüjlenmiştir.

Not 1: Lizatin tamamı kolondan geçmezse 14000 rpm'de santrifüjlemeye devam edilmesi önemlidir.

Döner kolon çıkarılarak, akışı atılmış ve döner kolonu tekrar yuvaya yerleştirilmiştir. Döndürme kolonuna 500 µl Wash TX1 tamponu eklenmiştir ve 1 dakika 12000 rpm'de santrifüjlenmiştir.

Yeniden, döner kolon çıkarılmıştır, akış atılmış ve döner kolonu toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.

Döndürme kolonuna 500 µl Wash TX2 tamponu eklenmiştir ve 12000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir.

Döndürme kolonunu yeni bir toplama tüpüne (1,5-2 ml) yerleştirilmiş ve 50-200 µl Elüsyon tamponu eklenmiştir.

Döner kolon çıkarılmıştır, akış atılmış ve döner kolonu tekrar yuvaya yerleştirilmiştir. (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) bağlı DNA'yı elüte etmek için 70 °C'ye ısıtılmıştır.

Elüsyon tamponunun doğrudan reçinenin merkezine eklenmesi DNA verimini artırmıştır. Spin-kolonlar arasında DNA izlerinin aktarılmasını önlemek için, spin-kolon duvarlarına mikropipet ile dokundurulmamıştır.

Döndürme kolonu/toplama tüpü tertibatını oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir.

1 dakika 12000 rpm'de santrifüjlenmiştir.

Elüsyon bir kez daha tekrarlanmıştır.

Bu adım, kolondan DNA geri kazanımı yapılmıştır. İlk elüatın seyreltilmesini önlemek için yeni bir toplama tüpü kullanılmıştır.

Döndürme kolonu elüat ile temas ederek DNA kontaminasyonuna neden olacağından, tek bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne elüsyon yapmak için 200 µl'den fazlası kullanılmamıştır.

Döner kolonu atılmış, toplama tüpünün kapağını kapatılmıştır. Genomik DNA, analiz için hazır hale getirilmiştir.

Protokole göre hazır hale gelen Genomik DNA, -20 °C'de saklanmıştır.

3.3.2.2 PCR

Metagenomik çalışmalar, bir numunedeki DNA miktarının ve kalitesinin belirli kriterleri karşılamasını gerektirir. Çalışmada DNA miktarının tayini, flüoresan çift sarmallı pikoyeşil boya kullanılarak bir Victor 3 florometre üzerinde gerçekleştirilmiştir. Picogreen boyası yalnızca çift sarmallı DNA'ya bağlanır. Rutin spektroskopide normalden daha yüksek konsantrasyonlara neden olan genomik DNA, kalıntı RNA veya diğer kirletici maddeler dışında, Picogreen ile etkileşime girmez ve daha doğru sonuçlar verir. DNA örnekleri için beklenen konsantrasyon 50 ng/µL'dir. Literatürde PCR, qPCR ve RT-PCR gibi yöntemler kullanılmakla birlikte, bu çalışmada PCR yöntemi olarak indeks PCR yöntemi kullanılmıştır. PCR yöntemi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, bentik organizmaların tamamı için spesifik primer tasarlanmıştır. Yeni nesil dizileme okumasından önce amplikon kütüphanesi hazırlığı amacıyla 18S ribozomal RNA geninin yaklaşık 460 bazlık bir bölgesi alttaki primer çifti ile çoğaltılmıştır.

PCR aşamasında kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir:

1- 18S Amplicon PCR Forward Primer = 5'18S-566F:

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGCAGCCGCGGTAATTC
C

2- 18S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'18S- 1200R:

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCGTGTGAGTCAAAT
TAAGC

Primerler, özellikle eDNA çalışmalarının tamamında olduğu şekilde DNA barkod oluşturmak amacıyla yaklaşık 250 baz çiftlik bölgesi için tasarlanmıştır. Primerlerin, çoğalttıkları bölgenin uzunluğu, erime sıcaklıkları, döngü koşulları ve reaksiyon hacimleri verilmiştir. Ayrıca PCR koşulları ve kullanılacak malzemeler Tablo3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.2: PCR aşamasında kullanılan malzemeler

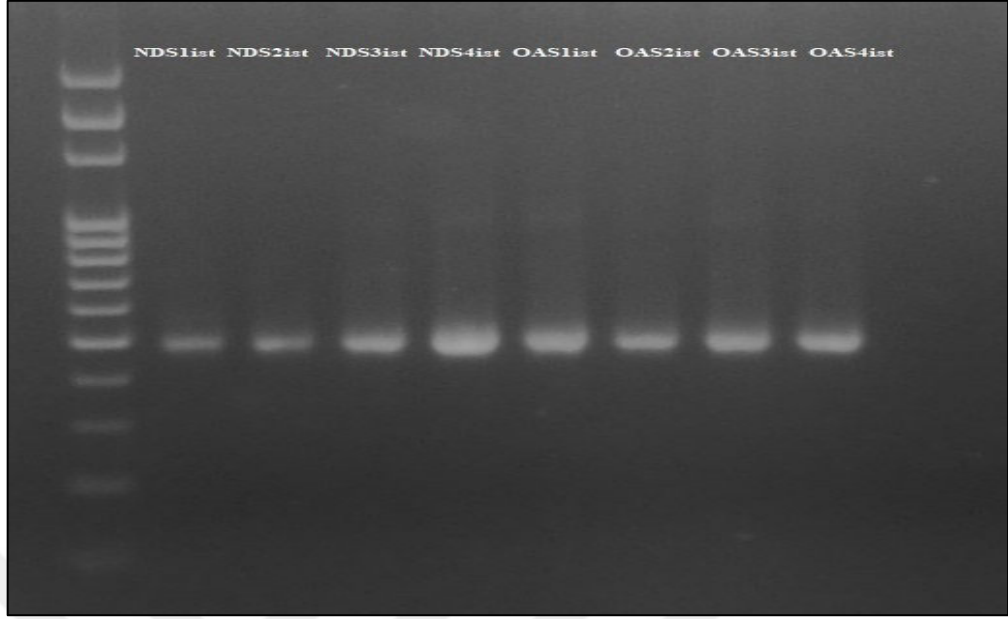
	Hacim
Microbial DNA (5 ng/μl)	2.5 μl
Forward Primer 1 μM	5 μl
Reverse Primer 1 μM	5 μl
2X KAPA HotStart PCR Mix	12.5 μl
TOPLAM	25 μl

PCR koşulları:

Toplam 250 baz çiftlik DNA için;

- 1) 95 ° C’de 3 dakika
- 2) Takip eden 25 döngü için
 - 95 ° C’de 30 saniye
 - 55 ° C’de 30 saniye
 - 72 ° C’de 30 saniye
- 3) 72 ° C’de 5 dakika
- 4) 4 ° C’de örnekler saklanmıştır.

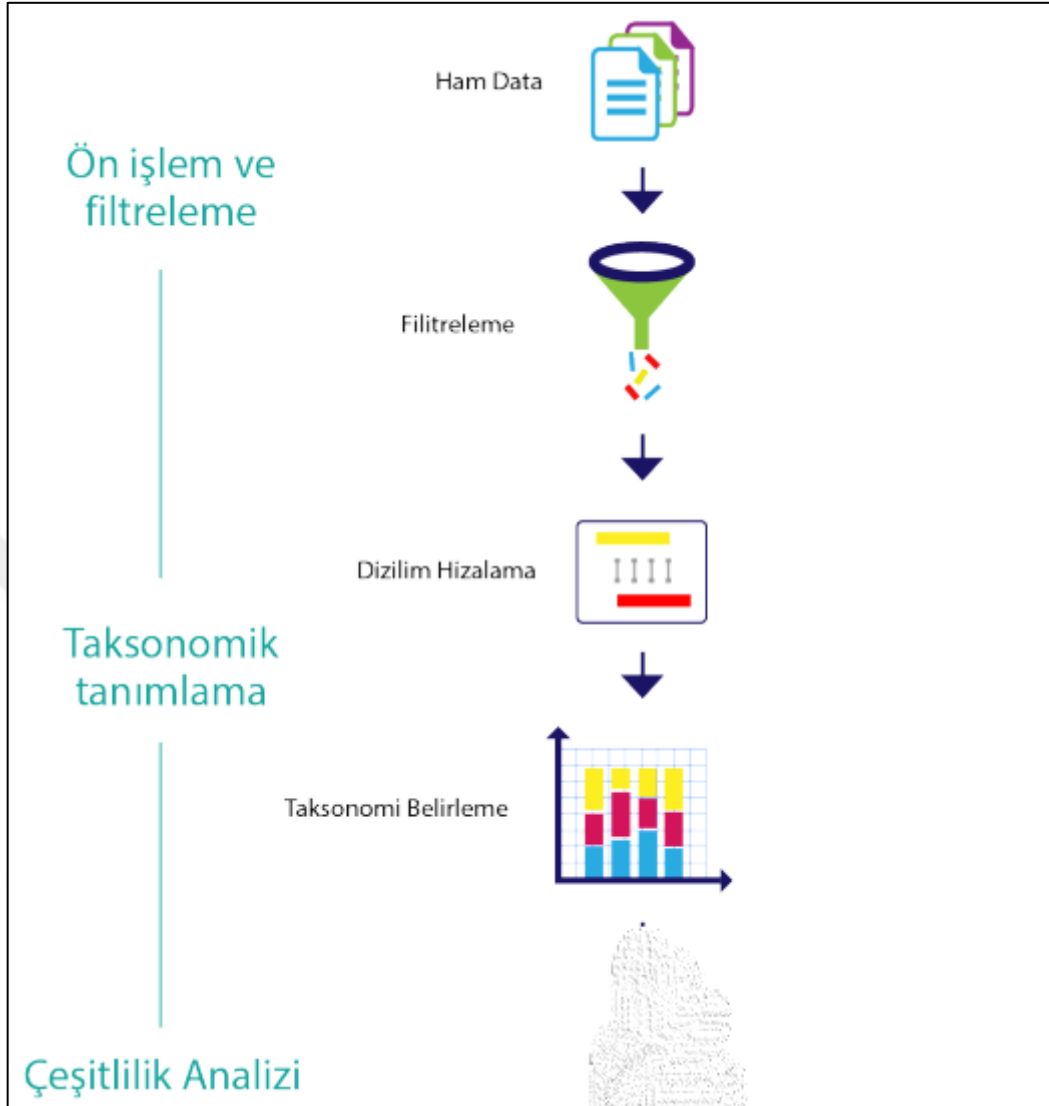
PCR analizi sonucunda elde edilen DNA miktarlarının istasyonlara göre ampliconları Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7: Amplikon PCR sonuçları

3.3.2.3 DNA dizi analizleri

DNA Dizi Analizi çok hassas bir yöntem olmakla profesyonel DNA analizleri yapılan laboratuvarlarda yapılması gerektiği hesaplanmıştır. Laboratuvarımızda otomatik sekans cihazı bulunmamasından kaynaklı, işlemler hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Hizmet alımı için, DNA dizi analizi yapılan laboratuvarlar araştırılmış olup, firmaya örnekler yüksek korumalı kutulara konularak gönderilmiştir. PCR yapan ve DNA dizi analizi yapan firma aynı olduğundan, PCR’da kullanılan primerler, üretici firma tarafından önerilen protokol takip edilerek gerçekleştirilen adımlar sonucunda, hedeflenen bölgelerin nükleotid dizileri başarıyla ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 3.8. eDNA Analiz Adımları

3.3.4 İndeks PCR

Kütüphaneyi oluşturmak için eDNA analizlerinde genellikle kullanılan adımlardan biri olan indeks PCR kullanılmıştır. Hizmet alımı yapılan firma tarafından 18S rRNA geni, spesifik primerlerle çoğaltılmış ve ardından saflaştırılmıştır. Bu adımda, indeks kiti kullanılarak illumina ikili indeksleri ve adaptörleri eklenmiş ve daha sonra saflaştırılmıştır.

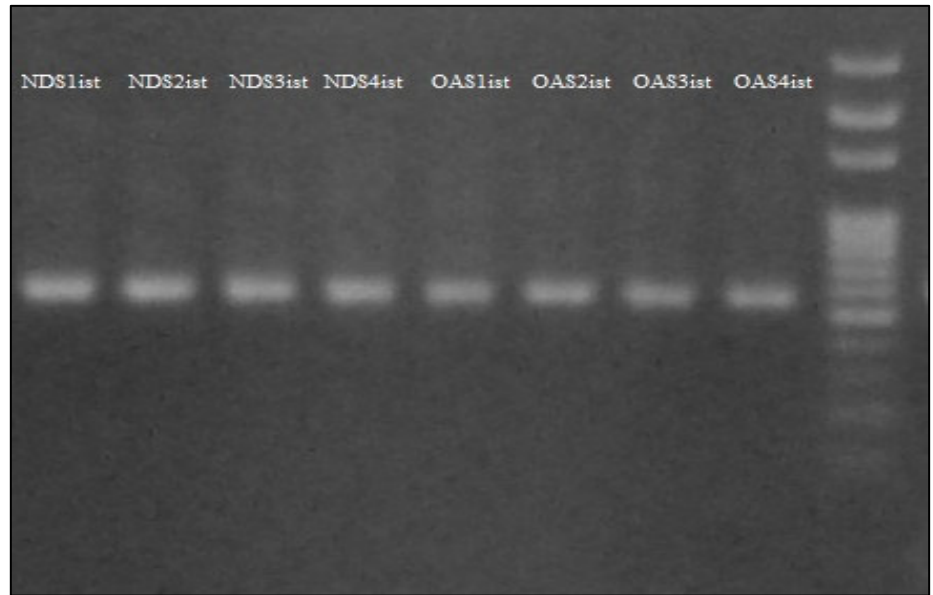
Ayrıca Yeni nesil dizileme okunurken farklı örneklerin ayırt edilebilmesi ve birden fazla örneğin aynı anda aynı sonuçları verebilmesi için PCR ürünlerine "indeks barkod" görevi gören özel baz dizileri eklenmiştir. Salt okunur dizileme ve "adaptörler", ürünlerin PCR ile yeni nesil dizileme ekipmanında spesifik oligo bağlama bölgelerine bağlanmasına izin

verir. İndeks kiti kullanılarak yapılan bu işlemde her örneğe 2 indeks barkod bölgesi, aşağıdaki kısa PCR koşullarında bağlanmıştır.

Tablo 3.3. İndeks PCR kullanılan malzemeler

	Hacim
DNA	5 µl
Nextera XT İndeks Primer 1(N7xx)	5 µl
Nextera XT İndeks Primer 2 (S5xx)	5 µl
2X KAPA HotStart PCR Mix	25 µl
Su	10 µl
TOPLAM	50 µl

- 1) 95 ° C’de 3 dakika
- 2) Takip eden 8 döngü için
95 ° C’de 30 saniye
55 ° C’de 30 saniye
72 ° C’de 30 saniye
- 3) 72 ° C’de 5 dakika
- 4) 4 ° C’de örnekler saklama yapılır.



Şekil 3.9. İndeks PCR Sonuçlarına DNA Yoğunlukları

PCR ürün temizliği için üretici firmanın kullanım protokolüne göre, manyetik boncuklar kullanılarak, primer dimerler ve serbest primerler uzaklaştırılmıştır. Bu aşama iki adımda gerçekleştirilmiştir. Illumina NovaSeq 6000 cihazından yüksek kalitede veri elde etmek için, cihazdaki her akışkan hücre üzerinde optimum kümelenmeyi sağlamak gerekmektedir. Bu yüzden kütüphane miktar tayininin daha hassas tespiti için, Qubit™ 4 Fluorometer kullanılmaktadır. Normalizasyon adımı, birleştirilmeden önce eşit kitaplıkları temsil etmek için manyetik boncuklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Manyetik parçacıklar kitaplığa benzer bir bağlanma yeteneğine sahip olduğundan, kitaplıklar birleştirildiğinde her örnek eşit oranlarda olacaktır. NovaSeq 6000 cihazında akış hücresine birleştirme kütüphanesi eklenmiştir. Akış hücresinde, yüzey adezyon oligoları, kitaplıktaki bağdaştırıcı dizileri tamamlayıcı dizilerdir ve amplifikasyonu köprüleyerek, her bir fragman farklı kümeler halinde amplifiye edilmiş ve klonlanmıştır. Sentez tamamlandığında, örnek DNA dizileme için hazır hale gelmiştir. Illumina'nın "Sequencing by Synthesis" teknolojisi ile her bir baz, dizileme sırasında DNA örneğine eklendikçe tespit edilmiştir. Sıralamada kullanılan dNTP'ler, sonlandırıcıya bağlı özel tersinir dNTP'lerdir. Bu dNTP'ler, her dizileme döngüsünde spesifik kimyasal yapıları nedeniyle hata oranlarını ve yanlış baz ekleme olasılığını azaltmaktadır. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar her temelde oldukça doğrudur. Aynı zamanda, şablon DNA üzerindeki tekrarlayan bölgeler veya homopolimer DNA dizileri, diğer dizileme tekniklerinde okumalara veya yanlış okumalara yol açmaktadır. Bu özel dNTP'ler ile homojen DNA dizileri veya tekrar bölgeleri kolayca okunmaktadır. Gerçek zamanlı PCR ile üretilen kitaplıkların konsantrasyonları ölçülmüş ve 4 nM'ye seyreltme yoluyla normalleştirilmiştir. Normalleştirilmiş örnekler sentetik yöntemle birleştirilmiştir. Kütüphane hazırlığından sonra, dizileme senteziyle her yeni bir dNTP eklendiğinde, eklenen bazın floresansı gözlemlenmiş ve optik olarak kaydedilmiştir. Sıralamadan sonra üretilen veriler, analiz için ham verilere (FASTA formatı) dönüştürülmüştür. Bu işlemler de hizmet alımı yapılan firma tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.1 Data kalitesi kontrolü (FastQC)

Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojisi klinik uygulamalarda daha geniş bir şekilde kullanılması sebebiyle dizileme veri kalite kontrolü önemli hale gelmektedir [67]. FastQC analizi adımları Rideout ve arkadaşları (2014)'nda şu şekilde verilmiştir. AfterQC, FastQ

dosyalarını gruplar halinde işlemek için tasarlanır, tipik olarak farklı numuneler için bir sıralama çalışmasının verileri olan tüm FastQ dosyalarını (tek uçlu veya çift uçlu çıktı olabilir) içeren bir klasörden geçer ve her FastQ dosyasını veya çiftini KK ve filtreleme boru hattına iletir. AfterQC, veri kalitesi profili oluşturmaya dayalı olarak otomatik okuma düzeltmesi yapacaktır. Her bir okuma kabarcık filtresi, polyX filtresi, kalite filtresi ve üst üste binme analizi filtreleri tarafından filtrelenir, bu filtreleri geçemeyenler kötü okumalar olarak atılır. Ayrıca, çift uç dizileme verileri için örtüşen analize dayalı bir hata düzeltmesi uygulanır ve son olarak, AfterQC iyi okumaları depolar, filtreleme sonrası KK profillemesi gerçekleştirilir ve HTML raporları oluşturulur [68].

3.3.5 Biyoinformatik analizde kullanılan bazı araçlar

Amplikon veri dizilemelerinde en sık kullanılan araçlar, QIIME2, MOTHUR ve MG-RAST olmaktadır. Çift uçlu (Paired end) dizileme sonucu oluşan R1 (ileri) ve R2 (geri) okumaları birleştirilerek kontigler oluşturulmasını gürültü oluşturan okumaları filtrelemeyi, replikaları (tekrarları azaltmayı), kimerik dizileri kaldırmayı ve marjinal dizilerdeki hataları düzeltmeyi sağlamaktadır.

3.3.5.1 QIIME2

Öncelikle verilerin QIIME2 programına dosya formatında aktarılması ve örnekte farklı sekanslar varsa, verilerin ayrıştırılması (demultiplex) gerekmektedir. Ayrıca bu işlem, barkodlar veri okumalardan ayrılmış ve ayrı bir dosyada ise “q2demux” fonksiyonu, eğer barkodlar veri okumalarının üzerinde ise “cutadapt” eklentisi ile gerçekleştirilebilir. Analizlere başlamadan önce verilerin tsv (sekme ile ayrılmış değerler) formatında olması ve çalışmaya özel metadata dosyasının hazırlanması gerekmektedir. Metadata veri üzerinde haritalamayı göstermektedir.

Dizilerin filtrelenmesi ve kırılmasından sonra, operasyonel taksonomik birimler (OTU'lar) halinde kümelenmesiyle gerçekleştirilir [69]. Amplikon dizi hatalarını düzelten OTU tabloları harici küçük farklılıkları çözen yüksek çözünürlüklü amplikon dizi varyantları üreten daha iyi kalite kontrol yöntemleri oluşturulmuştur. QIIME2' nin güncel olarak kullandığı DADA2 (q2- dada2) aracılığıyla temizleme (denoised) bu yöntemlerdendir. DADA2, kalite kontrol işlem akışı boyunca paired end okumaların birleştirilmesini içerir ve bu nedenle daha kolay olmaktadır. [70].

3.3.5.2 DADA2

DADA2 (Bölümsel Amplikon Gürültü Azaltma Algoritması 2), okumalardan gerçek biyolojik dizi çıkarımı için parametrik bir model kullanmaktadır. Bu model, okuma veri girdilerinin fazlalığı ve aralarındaki mesafeyi baz almaktadır. DADA2 daha az bolluktaki okumaları, "hatadan türetilmiş" okumadan daha bol bulunan, "doğru" bir diziye atayıp atamamaya karar vermek için bir olasılık eşiği kullanmaktadır [71]. DADA2 paired end sekanslarını birleştirmeyi, filtrelemeyi, kimeraların ortamdan uzaklaştırmayı oluşturmaktadır. Bu işlemlerin sonucu olarak klasik OTU tablolarına benzer ASV tablolarını oluşturmaktadır. Ayrıca, DADA2 programını diğer programlardan farklı kılan şey, ileri ve geri okumaları birbirinden bağımsız olarak belirlenen işlemleri uygulamaktadır [72]. İleri ve geri okumalara uygulanan temizleme işleminden sonra oluşturulan ASV'ler, "removeChimeraDenovo" komutu ile kimerik dizilerin ASV'lerden uzaklaştırılmasından önce birleştirilmektedir [73].

4. BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışma sonuçları istasyonlara ait fiziko-kimyasal parametreler, geleneksel metot bentik örnekleme sonuçları ve eDNA sonuçları şeklinde aşağıda verilmiştir.

4.1 İstasyonlara Ait Fizikokimyasal Parametreler

Çalışmada örnek alınan 4 istasyon ait fizikokimyasal parametreler Tablo 4.1 de verilmiştir.

Tablo 4.1. İstasyonların Fizikokimyasal Özellikleri

İstasyon Adı	Su Sıcaklığı (°C)	Çözünmüş Oksijen (mg/l)	pH	İletkenlik (µS/cm)	Derinlik (cm)
1. istasyon (Gülşehir)	19,1	2,99	6,80	1772	65
2.istasyon (Sulusaray)	18,9	6,91	8,10	1244	15
3.istasyon (Sarıhıdır)	15,4	4,01	8,02	1814	75
4.istasyon (Avanos)	17,9	6,44	8,1	1805	45

Ölçümü gerçekleşen istasyonlardaki su sıcaklık değerinin 19.1°C ile en fazla Gülşehir istasyonunda, en az ise 15.4°C ile Sarıhıdır istasyonunda görülmektedir. İstasyonlar arasındaki sıcaklık değerlerinde belirgin bir farklılık bulunmamaktadır. Çözünmüş oksijen miktarının Sulusaray istasyonunda 6.91 mg/l oranla en fazla, Gülşehir istasyonunda ise 2.99 mg/l oranla en az olduğu ölçülmüştür. Kızılırmak'taki istasyonlar arasında Gülşehir istasyonunun 6.80 pH değeriyle daha düşük, diğer istasyonların ise daha yüksek pH değerine sahip olduğu görülmektedir. En yüksek pH değeri 8.10 oranıyla Sulusaray istasyonudur. Elektriksel iletkenlik ölçümlerinin istasyonlarda 1244 µS/cm ile 1814 µS/cm arasında değiştiği ve en yüksek iletkenliğin 1814 µS/cm ile Sarıhıdır

istasyonunda ölçülmüştür. Aras ve Fındık'ın 2018'de yaptıkları bir çalışmada Kızılırmak Nehri'nde bazı fizikokimyasal parametrelere bakmışlar ve çalışılan alanı I.sınıf kalite su olarak değerlendirmişlerdir, yaptıkları çalışmada ortalama sıcaklık (17,8°C), pH (8,12) ve çözünmüş oksijen (9,4 mg/lt) değerleri olarak tespit etmişlerdir [74].

Tablo 4.2.Yerüstü Su Kütlelerinde Bazı Parametreler İçin Çevresel Kalite Standartları [75]

Su kalitesi Parametleri	Su Kalitesi Sınıfları			
	I (Çok iyi)	II (İyi)	III (Orta)	IV(Zayıf)
Sıcaklık (°C)	≤ 25	≤ 25	≤ 30	≤ 30
Renk	RES 426 nm ≤ 1,5 RES 525 ≤ 1,2 RES 620 nm ≤ 0,8	RES 426 nm:3 RES 525 nm: 2,4 RES 620 nm: 1,7	RES 426 nm: 4,3 RES 525 nm: 3,7 RES 620 nm: 2,5	RES 426 nm >4,3 RES 525 nm >3,7 RES 620 nm >2,5
pH	6,5-8,5	6,5-8,5	6,0-9,0	6,0-9,0 dışında
İletkenlik (µS/cm)	<400	400-1000	1000-3000	>3000
Çözünmüş Oksijen (mg/lt)	>8	6-8	3-6	<3

Tablo 4.2'de Türkiye için belirlenmiş su kalite standartları verilmiştir. Verilen bilgilere göre, Gülşehir istasyonu; çözünmüş oksijen 3'ten küçüktür, iletkenlik, pH ve sıcaklığa istinaden III. kalite su olarak (orta) olarak değerlendirilmiştir. Sulusaray istasyonu; su kalitesi parametrelerine göre II. kalite (iyi) su olarak değerlendirilmiş, Sarıhıdır istasyonu; III. sınıf (orta) kalitededir. Son olarak Avanos istasyonu, II. sınıf (orta) olarak değerlendirilmiştir. Kızılırmak Nehri'nde 2022 yılında yapılan başka bir çalışmada; sıcaklık 7,2-24,8°C, pH 7,12-8,89, elektriksel iletkenlik 1350-2060 µS/cm, çözünmüş oksijen 5,1-9,1 mg/L, bulanıklık 14,2-21,9 olarak belirlenmiş ve veriler ulusal ve uluslararası standartlara göre değerlendirilmiştir. Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği kıta içi su kaynaklarının sınıflarına ve kalite kriterlerine göre Kızılırmak nehrinin su kalitesi I. ve II. Sınıf olarak değerlendirilmiştir [76]. Önceki yapılan çalışmalara göre su kalitesinin düştüğü gözlemlenmiştir.

4.2 Geleneksel Yöntemle Alınan Bentik Organizmalar

Laboratuvara getirilen sediment örnekleri tür tayini için hazırlanmıştır. Öncelikle ortam steril hale getirilmiştir. Her istasyona ait sediment örnekleri büyük bir kaba boşaltılıp üzerine bir miktar saf su eklenmiştir. Büyük kaptan alınan sediment örnekleri, steril tahta kaşık yardımıyla petri kabına az miktarda konulmuştur. Petri kaplarının içerisini bir miktar saf su konularak büyük mercek yardımıyla incelenmiştir ve bulunan bentik canlılar sırasıyla farklı bir petri kabına aktarılmıştır. Mercek yardımıyla bulunamayan bentik organizma varlığı olması karşın petri kapları tekrardan mikroskop kullanılarak yeniden incelenmiştir. Her biri farklı kavanozlara aktırılan bentik canlıların morfolojik ön grup ayrımları yapılmıştır ve içerisinde %70'lik alkol aktarılarak saklanmıştır.

Geleneksel yöntem kullanılarak toplanan bentik organizmalar aşağıda listelenmiştir.

Filum: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: **Diptera**

Familya: **Chironomidae**

Alt familya: **Orthocladinae**

Alt familya: **Tanypodinae**

Takım: Hemiptera

Alt takım: **Heteroptera**

Familya: Micronectidae

Cins: **Micronecta sp.**

Sınıf: Malacostraca

Üsttakım: Peracarida

Takım: Isopoda

Familya: Asellidae

Cins: **Asellus sp.**

Takım: Amphipoda

Familya: **Gammaridae**

Cins: *Gammarus* sp.

Filum: Annelida

Sınıf: Clitellata

Altsınıf: **Oligochaeta**

Altsınıf: **Hirudinae**

Filum: **Nematoda**

Filum: Mollusca

Sınıf: **Gastropoda**

Sınıf: **Bivalvia**

Grupların istasyonlara göre dağılımları Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Morfolojik yöntemle belirlenen bentik makroomurgasız gruplarının istasyonlara göre dağılımları

İstasyon Adı	Gülşehir İstasyonu	Sulusaray İstasyonu	Sarıhıdır İstasyonu	Avanos İstasyonu
Grup Tayini	Chironomidae Gammaridae Oligochaeta Nematoda Gastropoda Heteroptera <i>Micronecta</i> sp.	Chironomidae Nematoda Oligochaeta Diptera	<i>Asellus</i> sp. Oligochaeta Gastropoda Bivalvia Chironomidae Orthocladinae Tanypodinae Hirudinae	<i>Asellus</i> sp. Gammaridae Hirudinea Gastropoda

Tablo 4.3’de belirtilen verilerle birlikte en fazla grup bulunan istasyon, 9 canlı grubuyla Sulusaray istasyonudur. Ayrıca Sarıhıdır istasyonunda bulunan gruplardan, Orthocladinae ve Tanypodinae grupları diğer istasyonlarda bulunamamıştır. Geleneksel yöntem ile toplanan bentik organizmalarda ise en az bulunan istasyon 4 grup ile Sulusaray ve Avanos istasyonlarıdır. Avanos ve Sulusaray istasyonlarının her ikisinde farklı gruplar gözlemlenmiştir. Chironomidae grubu Avanos istasyonu hariç tüm istasyonlarda gözlemlenmiştir. Topkara ve ark (2018), Karagöl’de kıyı ve açıklarından geleneksel yöntemlerle makroomurgasızları toplamış ve Chaoboridae, Oligochaeta ve Chironomidae gruplarının baskın olduğunu belirlemişlerdir [77]. Denizli iline bağlı Işıklı Gölü bölgesinde 2015 yılında yapılan başka bir çalışmada, 7 farklı istasyondan örnek toplanmış ve en yoğun grupların sırasıyla Insecta, Gastropoda ve Oligochaeta grubu olduğunu

belirtmişlerdir [78]. Kırkağaç ve Köksal (2005), bentik makroomurgasız gruplarından Chironomidae ve Oligochaeta üyelerinin kirlenmeye karşı toleranslı gruplar olarak kirlenmenin yoğun olduğu bölgelerde görüldüklerini belirtmektedirler [79].

Çalışmamızda 4 istasyondan toplanan bentik makroomurgasızlardan Chironomidae, Oligochaeta ve Gastropoda grupları en yoğun taksonlar olarak belirlenmiştir.

4.3 eDNA Analiz Sonuçları

Makroomurgasız topluluklarını belirleyebilmek amacıyla eDNA metabarkodlama kullanılmasının potansiyel avantajları vardır. Örneğin, geleneksel örnekleme, nehir tabanına erişimin zor olduğu, düşük veya mevcut olmayan akım olmaması sebebiyle makroomurgasızları bir ağ ile yakalamanın pratik olmadığı bazı bölgelerde sınırlamalara sahiptir, ancak aksine, eDNA örnekleme yalnızca su örneklerini almayı gerektirir; tekme örnekleme yöntemiyle makroomurgasızları toplamaktan çok daha kolaydır. Son olarak, metabarkodlama yaklaşımı her numuneyi değerlendirmek için taksonomi uzmanlığına dayanmamaktadır [80]. Bu çalışmada, Illumina MiSeq sistemi kullanılarak fastq ve qual formatında elde edilen dizilerin metagenomik analizi QIIME2 versiyonu kullanılarak yapılmıştır. Bentik organizmaları belirlemek için yapılan eDNA analiz çalışmalarında çoğunlukla 18S rRNA geni ya da COI geni ile kullanılmaktadır. COI gen bölgesinin kullanıldığı çalışmalar daha çoğunluktadır. Örneğin Fernandez ve arkadaşlarının (2018) yaptığı bir çalışmada, COI geni bir belirteç olarak kullanıldığında, 18S rRNA gen işaretleri ve Surber ağ örnekleme gibi geleneksel saha araştırması kullanılarak saptananlarla karşılaştırıldığında daha fazla bentik makroomurgasız türü saptadığını kaydetmiştir [81]. Fakat, 18S rRNA'nın V4 fragmanını seçen Lejzerowicz ve arkadaşları, daha kısa ve Illumina teknolojisini kullanarak PCR amplifikasyonu ve sıralaması daha kolay olduğunu vurgulamıştır. Bununla birlikte, V4 bölgesinin çözünürlüğünün, tür düzeyinde atamalar için sınırlı olduğunu ve COI bölgesinin daha az doğru çeşitlilik tahminleri sağladığını belirtmişler ve bazı önemli türlerin yalnızca 18S rRNA işaretçisi kullanılarak tespit edilebileceğini göstermişlerdir [82]. Ayrıca, bentik makroomurgasızlar için, COI belirteci, hedef olmayan (protozoa, fitoplankton, mantarlar, bakteriler) amplifikasyon olasılığını azaltabileceği öne sürülmüştür fakat COI gen bölgesi için 18S rRNA gen bölgesi kadar araştırmalar yapılmamış olduğunu belirten Othman ve arkadaşlarının eDNA belirteçleri için yaptığı çalışmada; eski araştırmalarda,

130 bp içeren COI gen bölgesinin geniş bir takson aralığını kapsayacak şekilde korunmamış olduğunu bildirilmiştir. COI ile mini barkod primerlerinin sınırlandırılmasının zor olduğunu ve 18S rRNA bölgesinin birçok türün taksonomik tanımlaması için referans veri tabanı olabileceği kabul edildiğinden bahsedilmiştir. Sonuç olarak sistematik araştırma verileri, araştırmacıların eDNA metabarkodlama için işaretçi seçimi konusunda karar vermelerine yardımcı olabilir. eDNA çalışmalarında COI ve 18S rRNA belirteçlerinin kullanılabilirliğini belirtmişlerdir. Ancak, her bir markörün potansiyeli ve sınırlaması hedeflenen türe göre değiştiğinden, markörlerin validasyonunun yapılmasını savunmuştur [83].

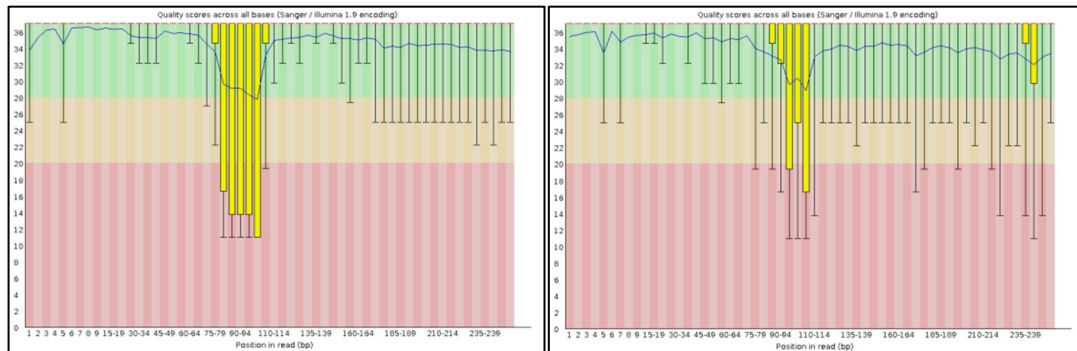
eDNA analiz sonuçlarının metabarkodlama yöntemiyle oluşturan yeni nesil dizilemedeki kalite okumaları, ileri geri okumadan sonraki nükleotitlerin ayrıştırılması ve yeniden birleştirme sonucu son dizileme oluşturulması ve son olarak operasyonel taksonomik ünitelerin atanması işlemlerine ait sonuçlar aşağıda ayrı bölümler halinde sunulmuştur.

4.3.1 DNA dizi kalite okuması

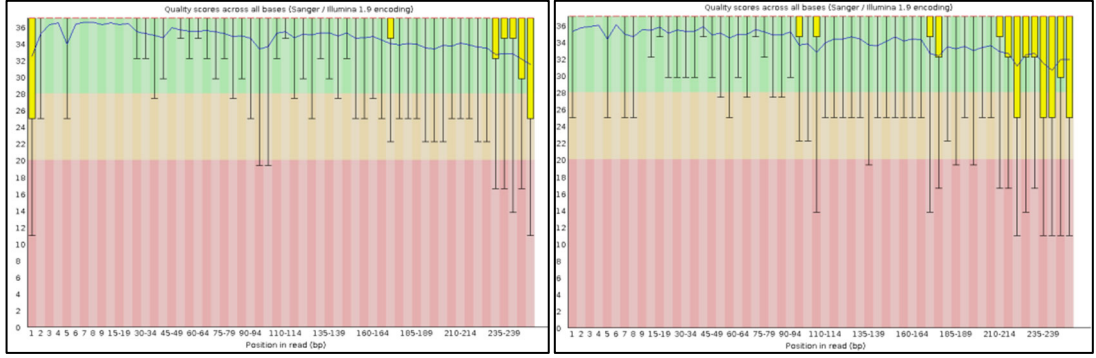
eDNA analizi için alınan su örneklerinden dizileme analizleri sonucu elde edilen ham veriler FastQC aracı ile analiz edilmiştir. 18S rRNA dizilerine ait ortalama kalite skorları (Phred skor) 33-35 aralığında bulunmuştur. Skor değerler skalası incelendiğinde %99,9 baz arama doğruluğuna erişilmiştir. Ayrıca GC içerikleri %43-%63 aralığında değişkenlik göstermiştir. Broman ve Elias 2022 yılında yaptıkları bir çalışmada, deniz tabanındaki mikroorganizmaların DNA'larını izole etmiş ve FastQC ile kalite değerlerini ölçmüştür. 33-36 arası değişen Phred değerleri ile 137 bp'lik 47,01 milyon okuma yapmışlardır. [84] FastQC analiz sonuçları Tablo 4.4'de verilmiştir. Reverse (Geri) ve Forward (İleri) dizilerinin kalite okumalarına ait grafikler Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8 verilmiştir.

Tablo 4.4. DNA dizilerinin uzunlukları ve kalite değerleri

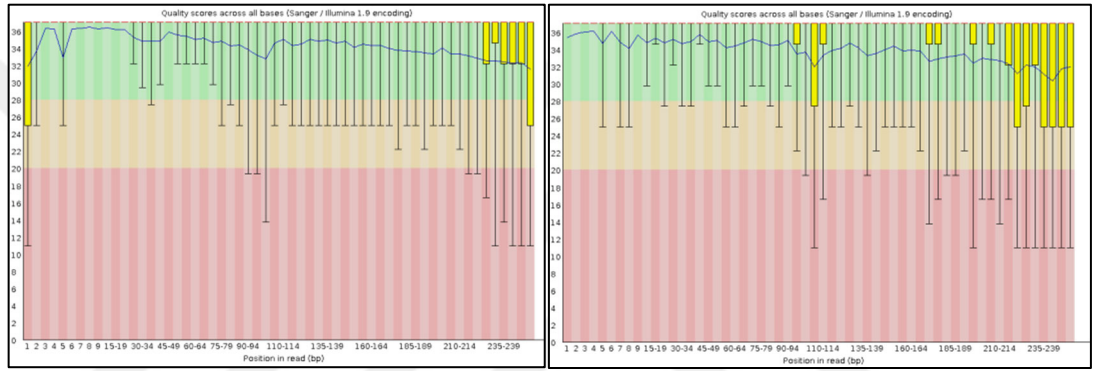
Örnek kodu	Ham veri (bp)	Dizi uzunluğu (bp)	GC Değerleri (%)	Kalite değerleri (Phred skor)
Gülşehir Nehir Dip Suyu	127801	250	%60	34
Sulusaray Nehir Dip Suyu	57437	250	%51	34
Sarıhıdır Nehir Dip Suyu	53258	250	%50	34
Avanos Nehir Dip Suyu	143053	250	%62	33
Gülşehir Örnek Altı Suyu	66277	250	%43	33
Sulusaray Örnek Altı Suyu	62016	250	%46	35
Sarıhıdır Örnek Altı Suyu	61839	250	%44	34
Avanos Örnek Altı Suyu	50617	250	%45	33



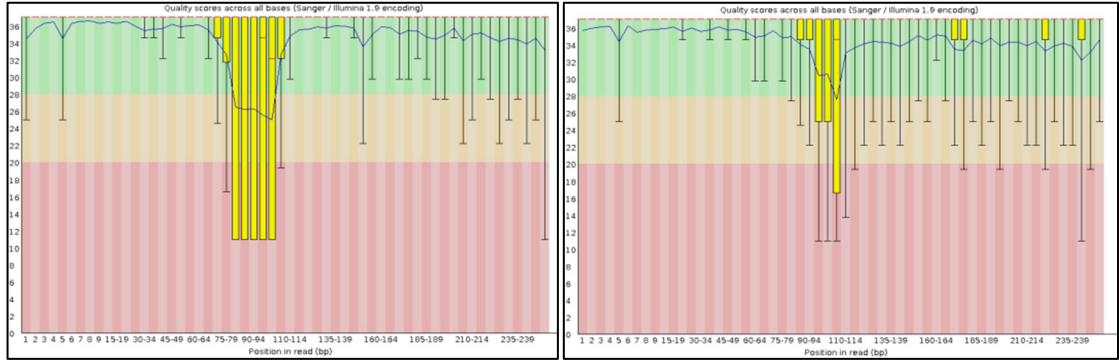
Şekil 4.1. Gülşehir İstasyonu Nehir Dip Suyuna Ait FastQC Sonuçları



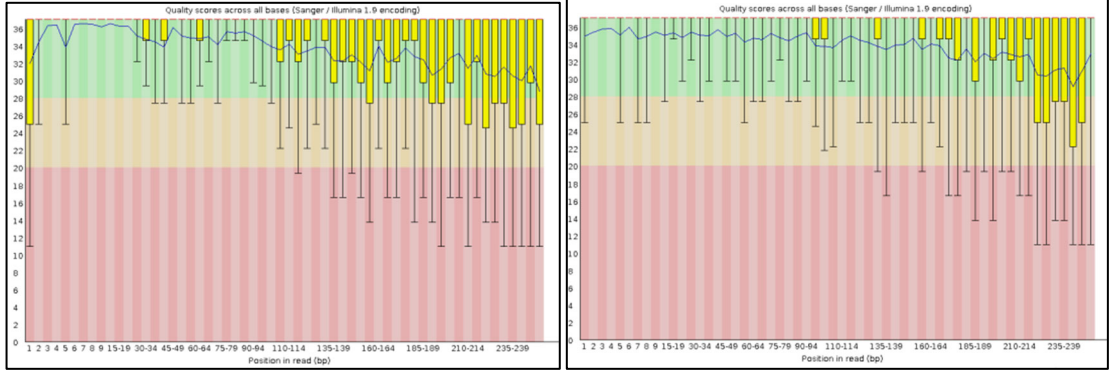
Şekil 4.2. Sulusaray İstasyonu Nehir Dip Suyuna Ait FastQC Sonuçları



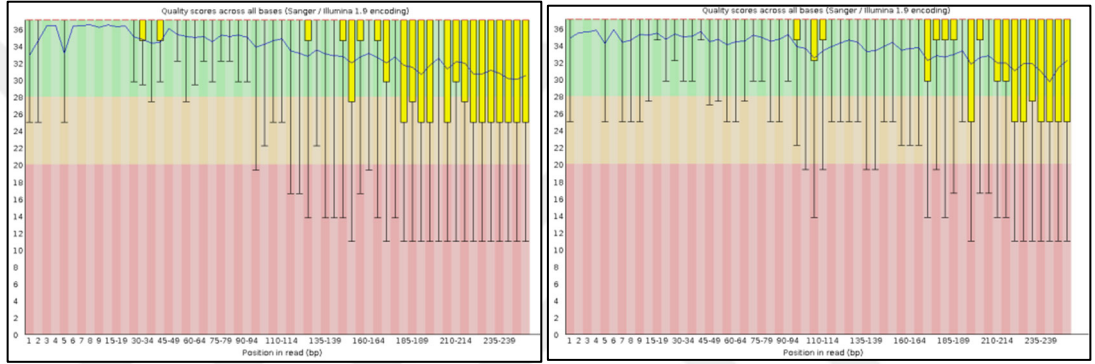
Şekil 4.3. Sarıhır İstasyonu Nehir Dip Suyuna Ait FastQC Sonuçları



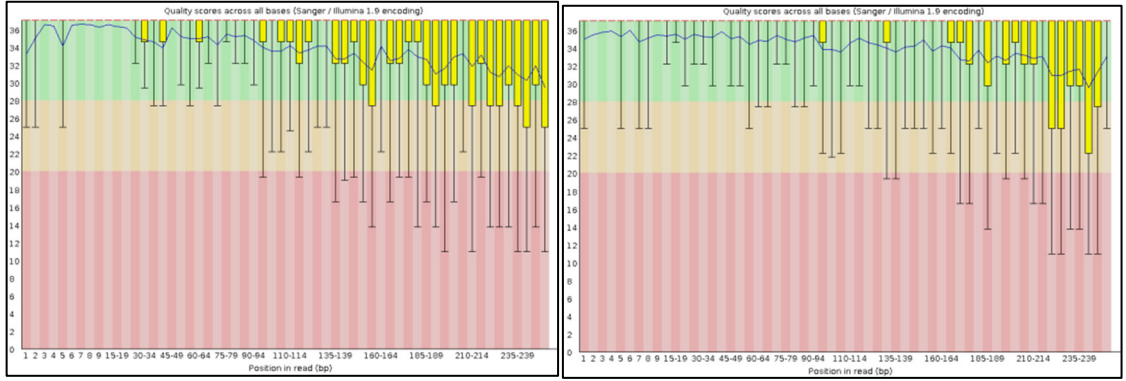
Şekil 4.4. Avanos İstasyonu Nehir Dip Suyuna Ait FastQC Sonuçları



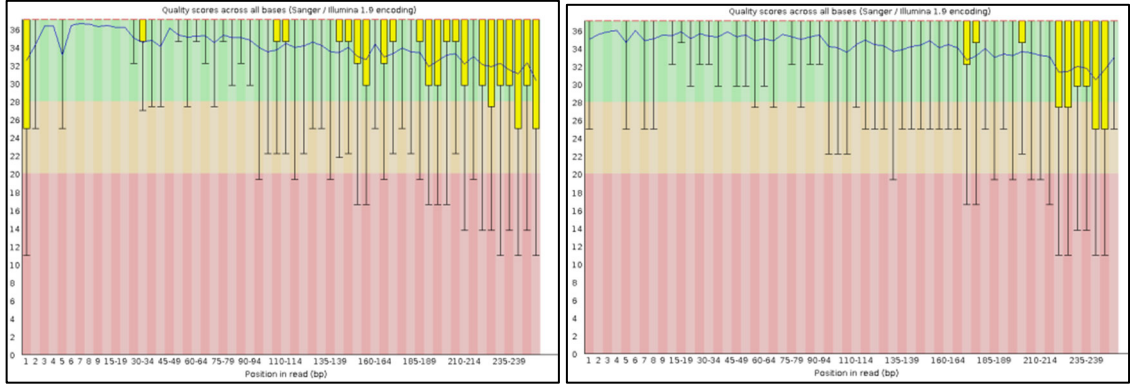
Şekil 4.5. Gülşehir İstasyonu Örnek Altı Suyuna Ait FastQC Sonuçları



Şekil 4.6. Sulusaray İstasyonu Örnek Altı Suyuna Ait FastQC Sonuçları



Şekil.4.7. Sarıhıdır İstasyonu Örnek Altı Suyuna Ait FastQC Sonuçları



Şekil 4.8. Avanos İstasyonu Örnek Altı Suyuna Ait FastQC Sonuçları

FastQC kalite grafiklerine göre 7 örnek için (Gülşehir Nehir Dip Suyu, Sulusaray Nehir Dip Suyu, Sarıhıdır Nehir Dip Suyu, Gülşehir Örnek Altı Suyu, Sulusaray Örnek Altı Suyu, Sarıhıdır Örnek Altı Suyu, Avanos Örnek Altı Suyu) y ekseninde gözlenen kalite değerleri normal iken; Avanos nehir dip suyuna ait örneğin bazı bölümlerinde ise kalite oranının düştüğü görülmektedir. Kalitenin düşük olmasının sebebi, ortamda bozulmuş DNA'nın varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu örnek serisi için 18S reverse okumalarının kalitesi ortalama 210 bp'den sonra düştüğü için sonraki bazlar kesilmiştir.

Örneklerin kalite okuması yapıldıktan sonra, elde edilen veri, DADA2 formatı ile biyolojik olmayan nükleotidler (primer, adaptör, bağlayıcı) ve kalitesi düşük diziler, ham veriden arındırılmıştır. İleri okuma sırasında parçalanmış olan dizi, nükleotidlerin eşleştirilmesiyle birleştirilmiştir. Kimerik olan veriler saplandıktan sonra ayrıştırılmış ve nükleotidler yeniden birleştirilmiş ve operasyonel taksonomik ünitelere atanmıştır (OTU) işlemine hazır hale gelmiştir. Taksonominin belirlenebilmesi için ilk olarak benzer sekanslar kümelenmiştir, kümeleme işlemi için sınıflama (Cluster) analizi uygulanmıştır. Sonrasında ait oldukları operasyonel taksonomik ünitelere (OTU) atanmıştır. Elde edilen her dizi için OTU saptaması gerçekleştirilmiştir. Kesilen ve arındırılarak yeniden birleştirilen okuma verileri, Tablo 4.5'te belirtilmiştir.

Tablo 4.5. DADA2 formatı ile okuma verilerinin kesme işlemleri

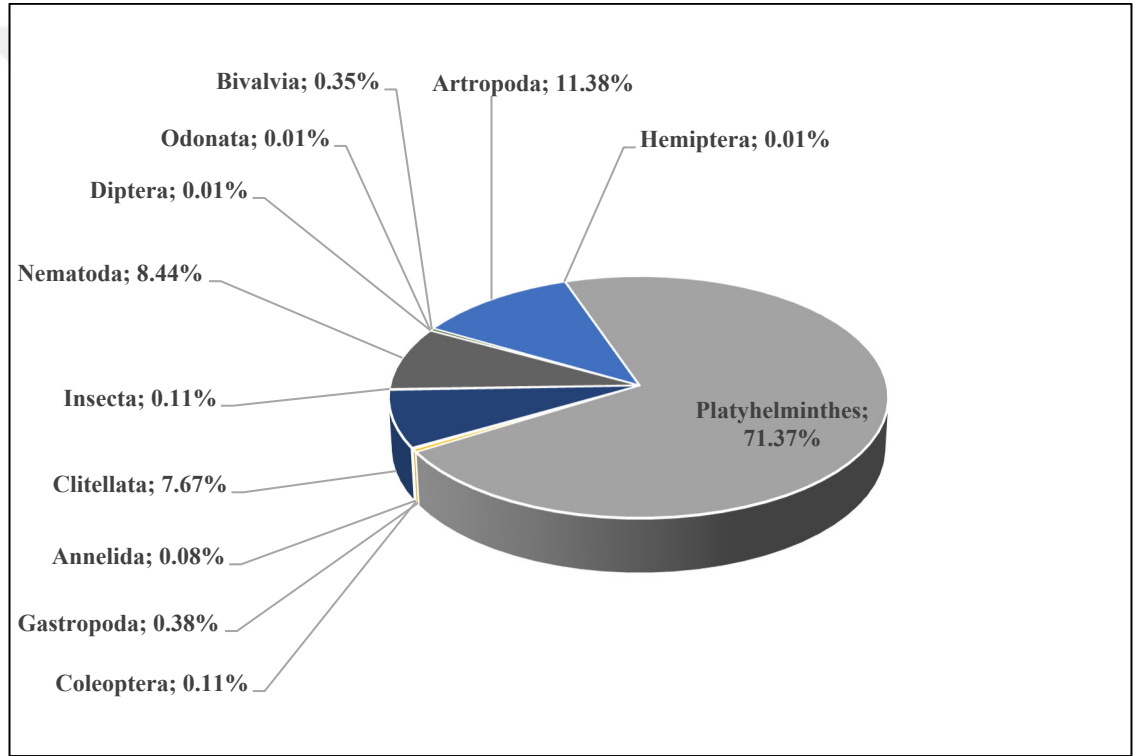
Örnek kodu	Ham veri	Filtrelenmiş veri	Filtrelenmiş yüzdesi	Arındırılmış veri	Kimerik olmayan veri	Kimerik olmayan veri yüzdesi
Gülşehir Nehir Dip Suyu	127801	99573	77.91	98471	97598	76.37
Sulusaray Nehir Dip Suyu	57437	49614	86.38	48825	47653	82.97
Sarıhıdır Nehir Dip Suyu	53258	43121	80.97	41250	40695	76.41
Avanos Örnek Altı Suyu	143053	108906	76.13	107886	106140	74.01
Gülşehir Örnek Altı Suyu	66277	45574	68.76	44973	43284	65.31
Sulusaray Örnek Altı Suyu	62016	42705	68.86	40690	39392	63.52
Sarıhıdır Örnek Altı Suyu	61839	43283	69.99	42835	41497	67.1
Avanos Örnek Altı Suyu	50617	37805	74.69	37017	36287	71.69

DADA2 formatıyla gerçekleştirilen işlemde ham verilerin yoğunlukta olduğu 127801 ve 143053 baz çiftiyle sırasıyla Avanos istasyonu nehir dip suyu ve Gülşehir istasyonu nehir dip suyuna ait olduğu görülmektedir. Filtreleme işlemleriyle arındırılmış veri oranı en az olan örnek 37017 oranıyla Avanos istasyonu örnek altı suyuna aittir. Kimeriklerden arındırılan verilerin en yüksek yoğunluğuna %82,97 oranıyla Sulusaray istasyonu nehir dip suyu örneğinde rastlanılmıştır. Gaspar (2018), FastQC tarafından analiz edilen 18S rRNA okumalarının kalite puanlarının 20'den büyük (>20) olduğunda biyoinformatik analizler için uygun aralıkta olduklarını belirtir. Yaptığı çalışmada, 18S rRNA dizisinin ters okumasının kalitesi 180 bp'den sonra 20 bp'nin altında düşmeye başladığında bu kısımdan sonrası için kesme yapmış ve 18S rRNA için amplifiye edilecek bölge 390 veya 226 bp olduğundan, DADA2 paketi için gereken 20'den büyük (>20) nükleotit sayısının yeterli olduğuna karar vermiştir. Bunun sonucunda 300 bp'lik çift uçlu dizileme, 18S

rRNA için 210 bp'lik tüm hedef bölgeyi kapsayan bölgelerle örtüşmeyle sonuçlanmıştır. Çift uçlu dizileme sonucunda oluşan R1 ve R2 dizileri, tüm hedef DNA bölgesini kapsayabilen tek bir dizi halinde birleştirilerek doğru okuma bölgesi tespiti ve hata düzeltilmesi sağladıklarını belirtmişlerdir [85]. Çalışmamız da analiz edilen 18S rRNA için tek dizi ile doğru okumalar yapılması başarıyla gerçekleştirilmiştir.

4.3.2 Operasyonel taksonomik ünitelerin genel dağılımı

Operasyon taksonomik ünitelere atanan bentik organizmaların yüzde oranları Şekil 4.9'da verilmiştir.

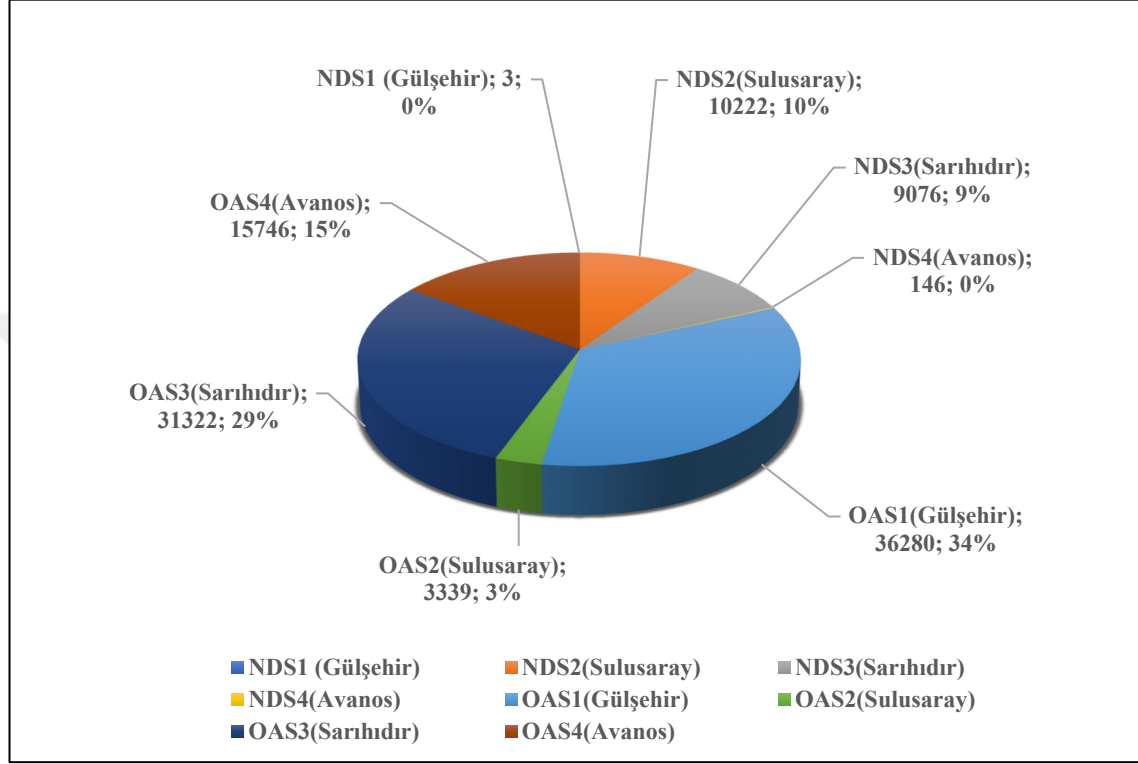


Şekil 4.9. eDNA analizinde atanan bentik organizmaların yüzde dağılımları

eDNA analizi yapılan 4 istasyona ait toplam 8 örnek değerlendirildiğinde Platyhelminthes grubunun %72 oranıyla en fazla DNA yoğunluğuna sahip olduğu görülmektedir. Arthropoda grubu %11 oranıyla en fazla DNA yoğunluğuna sahip 2. Grup olarak belirlenmiştir. Nematoda grubunun %9 oranında, Clitellata grubunun %8 oranında DNA yoğunluğuna sahip oldukları saptanmıştır. Gastropoda (0.38), Bivalvia (0.35), Coleoptera (0.11), Insecta (0.11), Annelida (0.08), Odonata (0,01), Hemiptera (0,01) ve Diptera (0,01) gruplarının yoğunluklarının %1'in altında olduğu görülmektedir.

4.3.3 Operasyonel taksonomik ünitelerin istasyonlara göre dağılımı

Örnek alımı yapılan 4 farklı istasyondan toplam 8 örneğe ait karşılaştırma grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir.

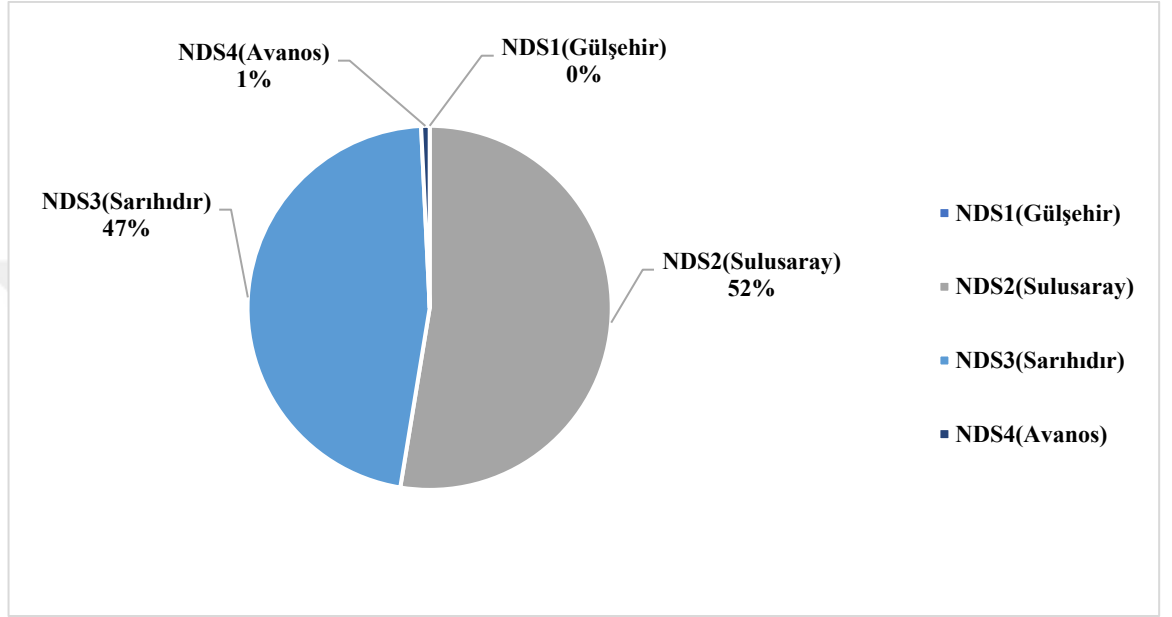


Şekil 4.10. eDNA Analizinde bulunan örneklerin istasyonlara göre çeşitlilik dağılımları

Örneklerin istasyonlara göre dağılımına bakıldığında, en fazla örneğe Gülşehir istasyonu örnek altı suyunda (OAS1) rastlanılmıştır (%34). Sırasıyla bunu %29 ile Sarıhıdır istasyonu örnek altı suyu (OAS3), %15 ile Avanos istasyonu örnek altı suyu (OAS4) ve %10 ile Sulusaray istasyonu nehir dip suyu (NDS2) izlemektedir. En az örneğe ise Gülşehir (NDS1) ve Avanos (NDS4) nehir dip suyunda rastlanılmıştır. Grafikte örnek altı sularında eDNA analizi ile belirlenen örnek sayısının, nehir dip sularının sonuçlarına göre daha fazla çeşitlilik gösterdiği gözlemlenmektedir. Örnek altı suyu analizlerinde en az çeşitlilik bulunan %3 oranıyla OAS2 Sulusaray istasyonudur. Gülşehir istasyonundaki nehir dip suyu örneği %0 iken, örnek altı suyu analizinde, %34 ile daha fazla çeşitlilik olduğu görülmüştür. Sulusaray istasyonunda nehir dip suyu %10 oranında çeşitlilik görülmüşken, örnek altı suyu analizinde %3 olduğu görülmüştür. Sarıhıdır istasyonunda nehir dip suyu %10 iken, örnek altı suyunun %29 oranıyla daha fazla çeşitlilik gösterdiği görülmüştür.

4.3.4 Operasyonel taksonomik ünitelerin nehir dip suyu analizlerinin karşılaştırılması

4 farklı istasyondan alınan nehir dip suyu örneklerinin yoğunluk karşılaştırılması Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

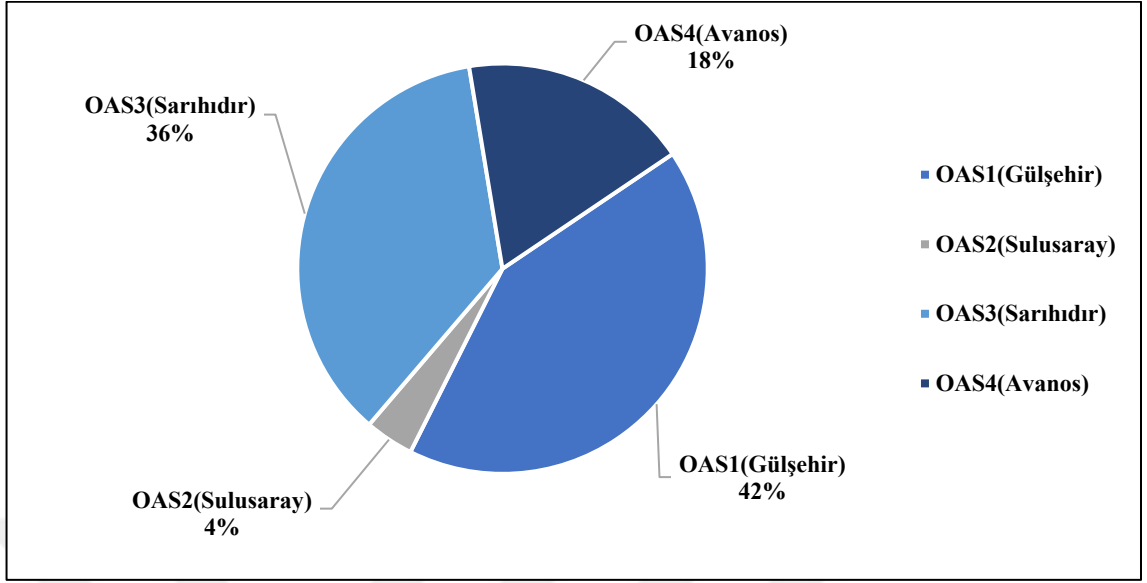


Şekil 4.11. eDNA analizi nehir dip suyu örneklerinin istasyonlara göre dağılımı

Nehir dip suyu analizlerinin birbirleriyle karşılaştırılmasında en fazla çeşitlilik %52 oranında Sulusaray istasyonunda görülmektedir. Sarıhıdır istasyonu %47 oranı ile 2. Sırada yer almaktadır. Gülşehir istasyonu nehir dip suyu eDNA analizinde en az yüzdeye sahiptir.

4.3.5 Operasyonel taksonomik ünitelerin örnek altı suyu analizlerinin karşılaştırılması

4 farklı istasyondan alınan örnek altı suyu örneklerinin yoğunluk karşılaştırılması Şekil 4.12’de belirtilmiştir.



Şekil 4.12. eDNA analizi örnek altı suyu örneklerinin istasyonlara göre dağılımı

İstasyonların örnek altı suyu analizlerine göre, en fazla çeşitlilik Gülşehir istasyonunda bulunmaktadır. Ardından %36 oranıyla Sarıhıdır istasyonu, %18 oranıyla Avanos istasyonu gelmektedir ve %4 oranıyla Sulusaray istasyonu en az çeşitliliğe sahip istasyon olarak görülmektedir. Hajibabaei ve arkadaşlarının (2019), Waterloo Şehrindeki sığ akarsulardaki 6 istasyon olarak belirlediği örnekleme noktalarından aldığı örneklerde eDNA analizini gerçekleştirmiş ve Arthropoda grubu taksonlarının dikkate değer ölçüde fazla bulunduğunu ve 4. İstasyon olarak belirlediği örnekleme noktasında daha yoğun bulduklarını belirtmiştir [86]. Lanzen ve Anders'in (2021) Norveç'te yaptıkları başka bir çalışmada 11 adet istasyondan, morfolojik analizlerde tespit edilen baskın gruplar sırasıyla Annelidae, Echinodermata, Arthropoda ve Cnidaria olarak bulunmuş fakat 18S rRNA belirteci ile yaptığı eDNA analiz sonuçlarına göre ise baskın gruplar Nematoda, Annelidae, Chaetognatha ve Arthropoda olarak tespit edilmiştir [87].

4.5 Morfolojik ve eDNA Analizlerinin Karşılaştırılması

4 farklı istasyondan alınan tüm örneklerin birbirleriyle karşılaştırılması Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Morfolojik, Nehir suyu ve Örnek altı suyu analizleriyle belirlenen bentik makroomurgasızların karşılaştırılması

<u>Taksonomik Gruplar</u>	<u>1.İSTASYON (Gülşehir)</u>			<u>2.İSTASYON (Sulusaray)</u>			<u>3.İSTASYON (Sarlıdır)</u>			<u>4.İSTASYON (Avanos)</u>		
	<u>Morfolojik Örnekleme</u>	<u>Su Örneği (eDNA)</u>	<u>Örnek Altı Suyu (eDNA)</u>	<u>Morfolojik Örnekleme</u>	<u>Su Örneği (eDNA)</u>	<u>Örnek Altı Suyu (eDNA)</u>	<u>Morfolojik Örnekleme</u>	<u>Su Örneği (eDNA)</u>	<u>Örnek Altı Suyu (eDNA)</u>	<u>Morfolojik Örnekleme</u>	<u>Su Örneği (eDNA)</u>	<u>Örnek Altı Suyu (eDNA)</u>
Insecta											X	
Arthropoda		X	X		X	X		X	X		X	X
Collembola						X						
Platyhelminthes		X	X		X	X		X	X		X	X
Gastropoda	X		X			X	X	X	X	X		
Coleoptera								X				
Annelida									X			
Clitellata			X						X			X
Arhynchobdellida			X						X			X
Nematoda	X			X	X	X		X	X			
Diptera				X				X				
Odonata						X						
Spongilla						X						
Chironomidae	X			X			X					
Peracarida			X						X			
Gammaridae	X									X		
Oligochaeta	X			X			X					
Heteroptera	X					X						
Asellus sp							X			X		
Bivalvia							X		X			X
Hirudinae							X			X		

Morfolojik, nehir dip suyu analizi ve örnek altı suyu analizlerinin birbirleriyle karşılaştırılmasıyla, atanamamış fakat Insecta grubuna dahil olduğu görülen bilinmeyen tür/türler morfolojik ve örnek altı suyu analizinde bulunmazken sadece Avanos istasyonunda nehir dip suyu analizinde tespit edilmiştir. Arthropoda grubuna dahil olan bazı atanamamış tür/türler ayrı olarak verilmiş olup tüm istasyonlarda örnek altı suyu ve nehir dip suyu eDNA analizlerinde bulunmuştur. Bu gruba dahil olan daha alt taksonomik grup olarak familya düzeyinde belirlenen örnekler (Chironomidae, Micronectidae, Asellidae ve Gammaridae) morfolojik çalışmalarda rastlanmıştır. Odonata üyelerine ise sadece örnek altı suyu eDNA analizlerinde rastlanılmış olup morfolojik örneklemede bu grup gözlenmemiştir. Platyhelminthes grubu morfolojik örneklemede bulunamamışken nehir dip suyu ve örnek altı suyu eDNA analizinde bulunmuştur. Gastropoda grubu, Sulusaray hariç tüm istasyonların morfolojik örneklemede bulunmuştur. Avanos istasyonunda morfolojik örneklemede rastlanmasına rağmen eDNA örneklemede rastlanmamıştır. Marshall ve ark. (2020) morfolojik ve eDNA metabarkodlama analizini karşılaştırmış, Annelida grubuna ait 2 taksonu sadece eDNA analiziyle, Mollusca grubundan birbirinden farklı olmak üzere 2 takson morfolojik yöntemle, 2 takson da eDNA analiziyle tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Bryozoa grubunun üyelerine morfolojik yöntemle 1 istasyonda tespit ettiklerini ve diğer istasyonlarda sadece eDNA analiziyle tespit ettiklerini vurgulamışlardır [88]. Yapılan çalışmaya bağlı olarak makroomurgasızların aile düzeyinde tespitlerindeki farklılıklar, iki yöntemin makroomurgasızların örneklemedeki farklılıklarla açıklanabilir. Bazı ailelerin amplifiye edilmiş eDNA'sı morfolojik örnekleme yöntemiyle tespit edilememiştir. Bu, sınırlı ve düşük yoğunluklu popülasyonları tespit etmek için eDNA metabarkodlama yönteminin daha yüksek hassasiyeti ile açıklanabilir [89-90]. Morfolojik örneklemede rastlanmayan gruplar açısından, ortamda bulunmayan ancak nehrin yukarısında yaşayan makroomurgasızların döküntülerinin veya ölü bireylerin kalıntılarının akışa bağlı taşınması ile eDNA analizinde tespit edilebildiklerini Hering ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmalarında belirtmişlerdir. Aynı çalışmalarında, eDNA'nın tatlı sudaki ortalama ömrünün oldukça kısa olduğu bilgisi verilmiş ve bu sebeple herhangi bir gruba atanamamış bireylerin bulunmasının bu süreçte DNA dizi bozukları oluşmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir [91]. Öte yandan, bazı familyalar sert dış iskeletlere/kabuklara sahip olduklarından (örn. Planorbidae ve Sphaeriidae) suya daha az

DNA dökebilirler veya belki de düşük metabolik aktiviteye (yani daha az salgı) sahiptirler ve daha az DNA izi bırakabilirler [92].

Nehir dip suyu ve örnek altı suyu için yapılan eDNA analiz sonuçlarına göre istasyonlardaki birey sayıları Tablo 4.7’de gösterilmiştir.



Tablo 4.7. eDNA Analiziyle Bulunan Bentik Organizmaların Birey Sayıları

Bentik Organizmalar	NDS1 (Gülşehir)	NDS2 (Sulusaray)	NDS3 (Sarıhıdır)	NDS4 (Avanos)	OAS1 (Gülşehir)	OAS2 (Sulusaray)	OAS3 (Sarıhıdır)	OAS4 (Avanos)
Arthropoda (Atanamamış)		9928	9		161	1175	102	345
Collembola						67		
Peracarida					288		10	
Insecta (Atanamamış)				126				
Coleoptera			127					
Diptera			21					
Hemiptera						18		
Odonata						17		
Annelida (Atanamamış)							2	
Arhynchobdellida					46		29	13
Haplotaxida			234		2548	1978	3217	173
Nematoda		277	8635		6	45		
Platyhelminthes	3	17	41	20	32914	7	27538	15215
Bivalvia					223		150	
Gastropoda			9		100	38	262	

NDS: Nehir dip suyu

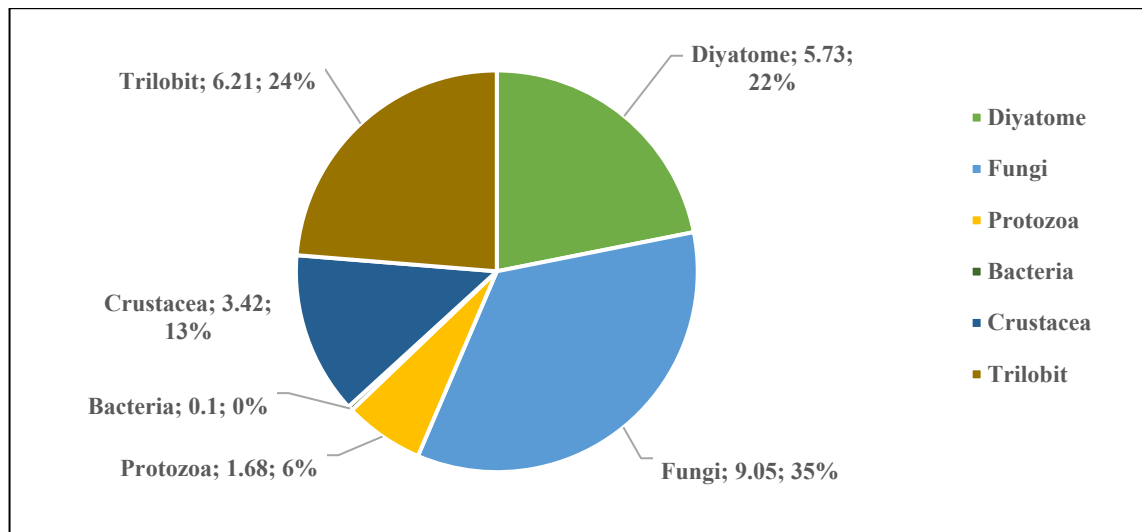
OAS: Örnek altı suyu

Peracarida Gülşehir örnek altı suyu ve Sarıhıdır örnek altı suyu analizinde bulunmuştur. Peracarida üst takımına ait familyalardan Gammaridae ve Asellidae morfolojik örneklemelerde Sulusaray hariç diğer 3 istasyonda bulunmuştur. Insecta grubunda ise atanamamış olan bireyler 126 adet ile Avanos nehir dip suyu örneğinde görülmüş diğer istasyonlarda gözlenmemiştir. Coleoptera (127) ve Diptera (21) grupları sadece Sarıhıdır nehir dip suyu örneğinde bulunurken, Hemiptera (18) ve Odonata (17) grupları sadece Sulusaray örnek altı suyu istasyonunda bulunmuştur. Odonata ve Hemiptera gruplarına morfolojik örneklemede rastlanmamışken, eDNA analizi ile bu 2 grup gözlemlenmiştir. Larano (2023) morfolojik olarak 12 adet tespit ettiği Odonata grubunu, eDNA analizi ile daha yüksek oranda tespit ettiğini bildirmektedir [93]. Ayrıca Uchida (2020), Natori Nehri'ndeki çalışmasında haziran ayında Diptera grubundan 1542 birey, Coleoptera grubundan 35 birey ve Hemiptera grubundan 20 birey tespit etmiştir [94]. Annelida grubunun 2 adet atanamamış bireyi bulunmuş ve sadece Sarıhıdır örnek altı suyu analizinde görülmektedir. Arhynchobdellida, nehir dip suyu örneklerinde ve Sulusaray örnek altı istasyonunda bulunamamışken; Gülşehir (46), Sarıhıdır (29) ve Avanos (13) örnek altı suyu eDNA analizlerinde bulunmuştur. Haplotoxida bireyleri nehir dip suyu analizlerinde sadece Sarıhıdır (234) istasyonunda bulunurken, örnek altı suyu analizlerinde bulunmamaktadır. Nematoda grubu nehir dip suyu analizlerinde Sulusaray ve Sarıhıdır istasyonlarında sırasıyla 277 ve 8635 birey sayısına sahipken, örnek altı suyu analizlerinde Gülşehir ve Sulusaray istasyonlarında sırasıyla 6 ve 45 birey sayısına sahiptir. Platyhelminthes grubu tüm istasyonların eDNA analizinde bulunmuştur ve özellikle Gülşehir nehir dip suyu analizinde 3 birey sayısı ile saptanan tek gruptur. eDNA analizlerinde, Platyhelminthes taksonu her istasyonda yoğun olarak gözlemlenmiştir. Bu grubun parazitik form olduğu ve nehirlerde gözlemlendiği belirtilmektedir [95]. Fernandez ve ark. Nolan gölündeki çalışmalarında Annelida, Arthropoda, Gastropoda, Oligochaeta gruplarını eDNA analizi ile tespit etmişlerdir fakat Platyhelminthes grubunu morfolojik olarak (28 grup) tespit etmişken, eDNA analizlerinde tespit edememişlerdir [92]. Bivalvia grubu nehir dip suyu analizlerinde görülmemişken, Gülşehir örnek altı suyu analizinde 223 adet ve Sarıhıdır örnek altı suyu analizinde 150 adet birey sayısı olarak bulunmuştur. Gastropoda grubu nehir dip suyu analizinde sadece Sarıhıdır istasyonunda 9 adet bulunmuş; örnek altı suyu analizlerinde Avanos istasyonu hariç hepsinde bulunmaktadır. İstasyonlarda bulunan bentik makroomurgasızlardan en fazla

biyere sayısına sahip olan istasyonun Gülşehir örnek altı suyu olduğu görülmektedir. Jensen ve Mads (2021) 5 nehirde yaptıkları çalışmada Annelidae, Arthropoda, Cnidaria, Gastropoda ve Nematoda gruplarına ait türleri tespit etmişler fakat, primer sapması ile ilgili olarak, eksik referans dizi miktarının bir sorun olduğunu belirtmiş, veritabanı kapsamının olmamasının, eDNA metabarkodlama kullanan biyoçeşitlilik çalışmaları için ciddi bir engel olabileceğini ancak daha fazla referans dizisi oluşturuldukça sorunun hafifleyeceğini belirtmişlerdir. Kusurlu taksonomik tanımlama, açıklanan tüm türlerin belirli hedef fragmanlar için bir DNA referans dizisine sahip olmaması ve spesifik primerlerin tüm türleri pozitif olarak ayırt edememesi gerçeğinden kaynaklandığını, vurgulamışlardır. Dünya üzerindeki türlerin yalnızca tahminen %10'u bilimsel olarak tanımlanmıştır ve bu, özellikle yüksek tür zenginliğine sahip tropikal ekosistemlerde çalışırken dikkate alınması gereken önemli bir faktör olduğunu belirtmişlerdir [96].

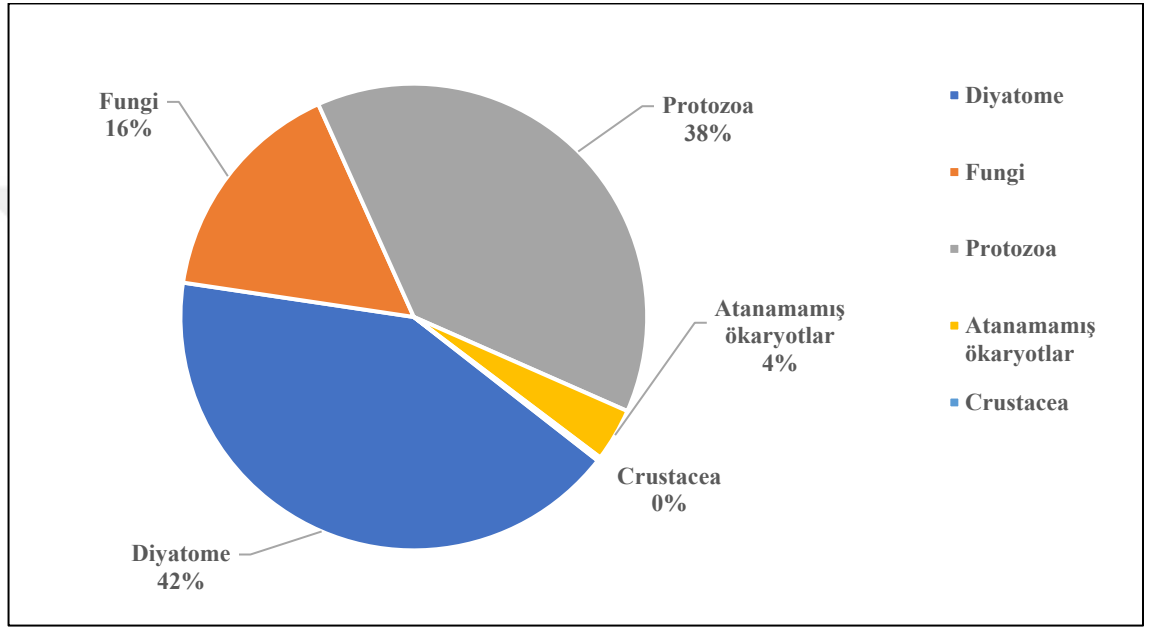
4.3.4 Metagenom analizleri içerisinde bulunan diğer organizmalar

eDNA analizinde makrobentik organizmalar haricinde mikrobentik olarak ifade edilen farklı canlı grupları vardır. Bunlardan Diatome, Protozoa, Fungi olarak mikro canlılar ve ayrıca bentik kabul edilmeyen diğer formlara ait organizmalarda bulunmuştur. İstasyonlardaki nehir dip suyu ve örnek altı suyuna uygulanan eDNA analizlerinde bulunan diğer organizmalar Şekil 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20 ve 4.21'de grafik halinde verilmiştir.



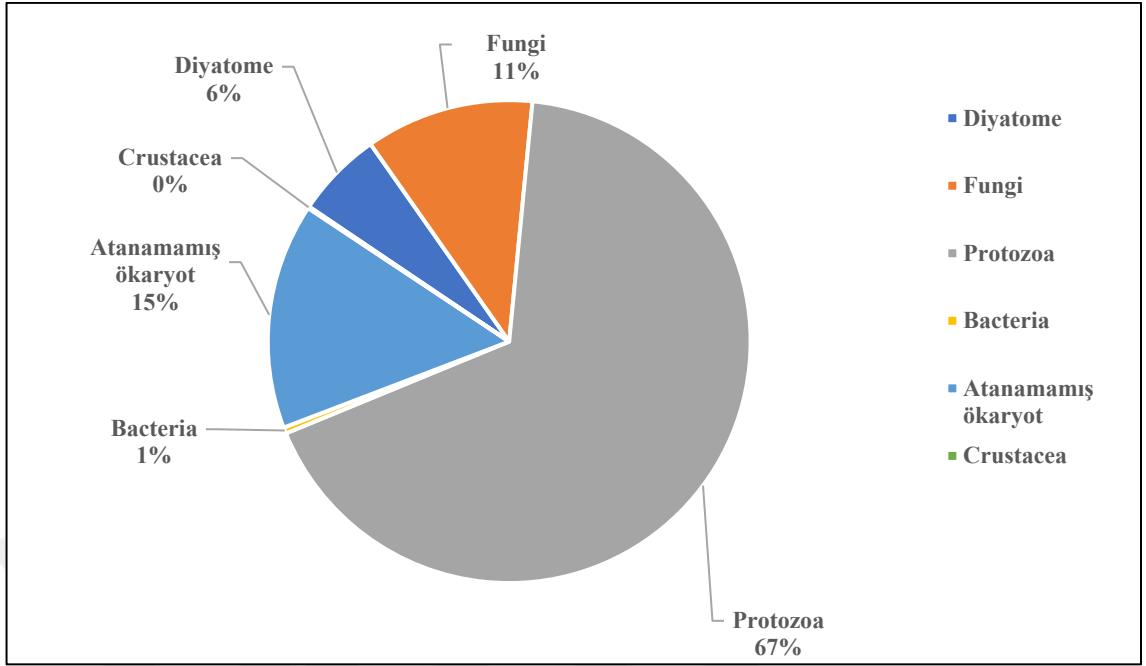
Şekil 4.14. Gülşehir istasyonu nehir dip suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları

Şekil 4.14'te Gülşehir nehir dip suyu eDNA analizinde makrobentik organizmalar dışında 6 farklı grup organizma mevcuttur. Mantarlar %35 oranıyla en fazla karşımıza çıkan canlı grubudur. Arthropoda üyesi olan ancak makrobentik grubunda yer almayan, Paleozoik dönemde yaşamış ve dönem sonunda yok olmuş Trilobit, mantarlardan sonra %24 oranıyla en fazla görülen canlı grubudur [97]. Onları takip eden diyatome %22 oranında görülmektedir.



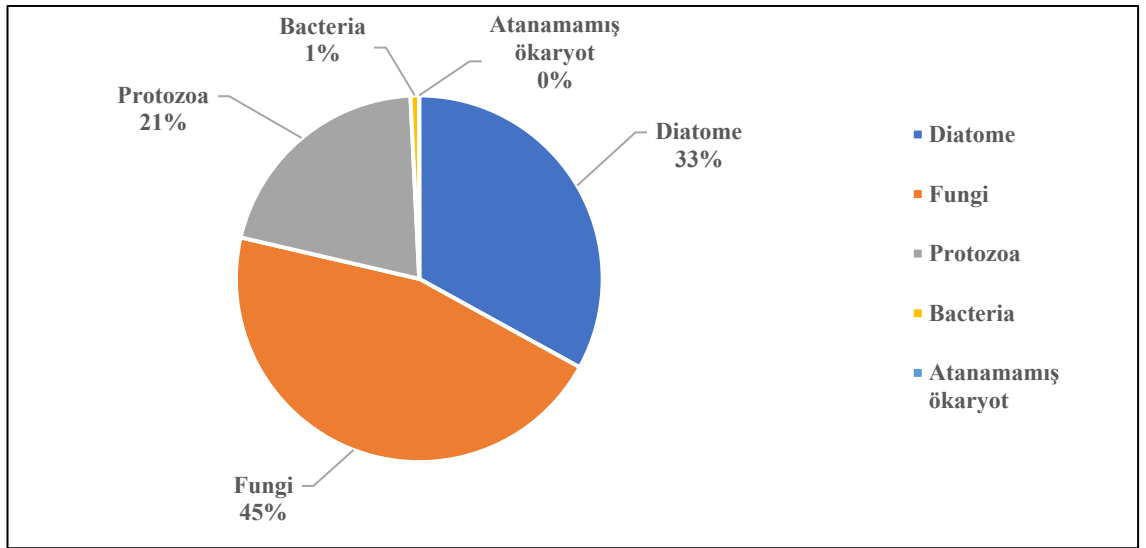
Şekil 4.15. Sulusaray istasyonu nehir dip suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları

Şekil 4.15'te Sulusaray istasyonu nehir dip suyu örneklerinin %42'sini diyatome grubu algler oluşturmaktadır. Aynı istasyonda % 20 oranıyla Protozoa grubu ikinci en fazla görülen canlı grubudur. Bu organizmalardan bazılarının yaşam alanı bentik olmasına rağmen mikrobentik olarak kabul edildiği için yukarıda verilmemiştir. Mantarlar Sulusaray istasyonunda %16 olarak bulunmaktadır ve Gülşehir istasyonuna göre daha az görülmüştür. Crustacea ortamda tespit edilmiş ancak oran olarak %1'in altında kaldığı gözlenmiştir. Herhangi bir gruba atanamamış ökaryotlar %4 olarak görülmektedir.



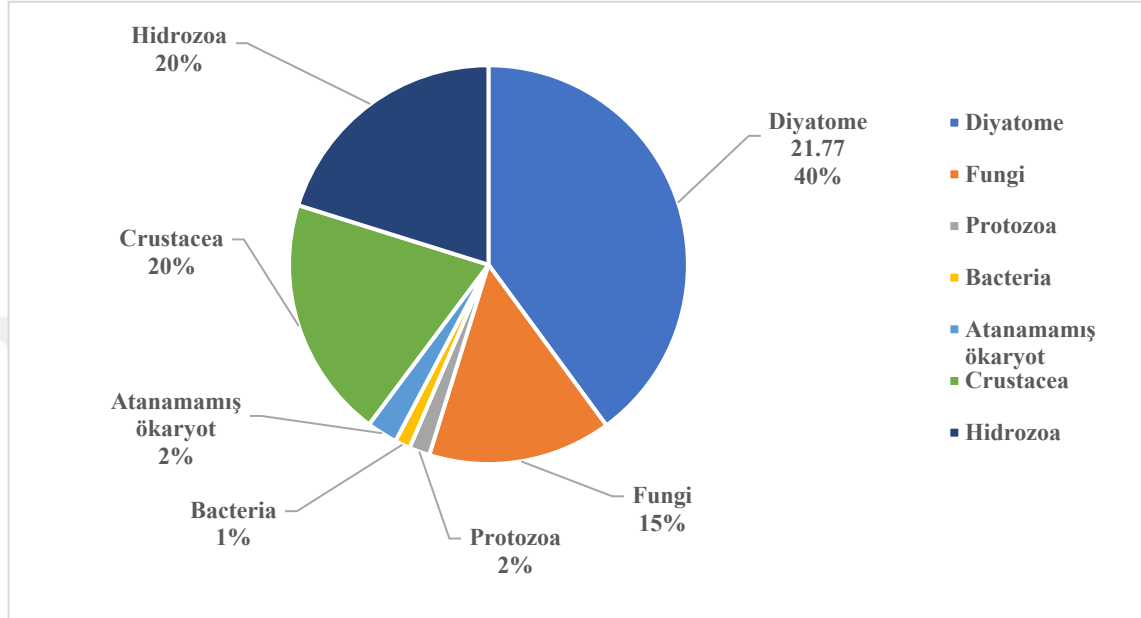
Şekil 4.16. Sarıhıdır istasyonu nehir dip suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları

Şekil 4.16' da görüldüğü üzere, Sarıhıdır nehir dip suyu örneklerinde Protozoa grubu %67 olarak en fazla oran olduğu tespit edilmiştir. Protozoalar çürükçül ve parazitik bir yaşama sahip olduğundan, Sarıhıdır bölgesinin su kalitesinin düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Atanamamış ökaryotlar istasyonda %15 oranında belirlenmiştir. Diatome grubu algler istasyonda % 6 oranı ile temsil edilmiştir.



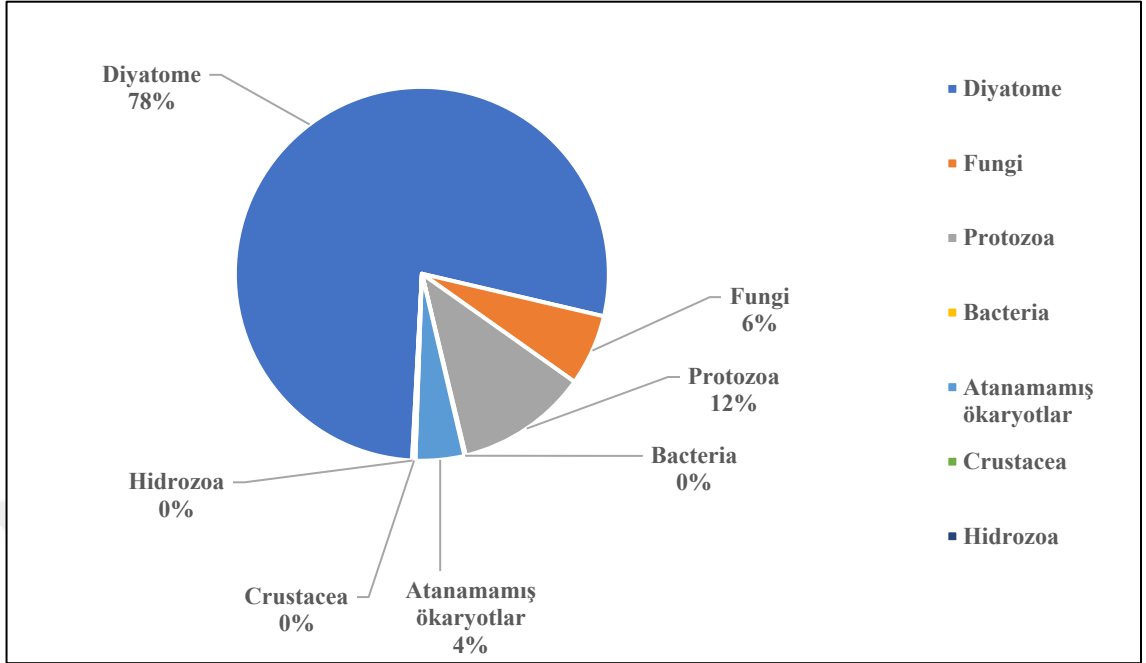
Şekil 4.17. Avanos istasyonu nehir dip suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları

Şekil 4.17’de Avanos istasyonunun nehir dip suyu analizindeki canlıların %45’sini mantarların oluşturduğu görülmüştür. Diatomlar (algler) %33 oranıyla mantardan sonra gelen canlı grubudur. Atanamamış ökaryotlar bu istasyonda oldukça az bulunmuştur (%1’in altında). Bakterilerin oranı çok az olmakla birlikte %1 olarak bulunmuştur.



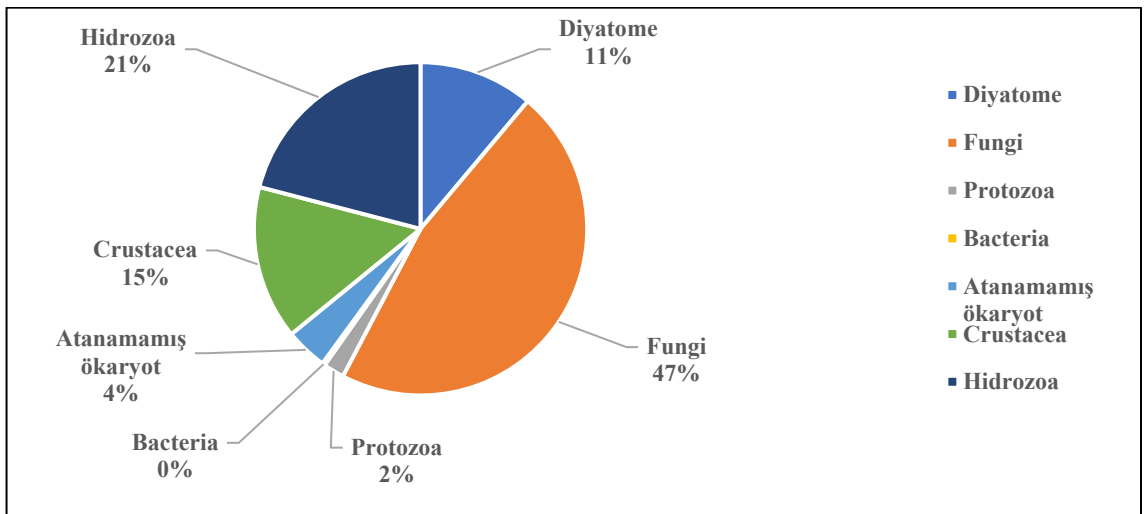
Şekil 4.18. Güleşhir istasyonu örnek altı suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları

Şekil 4.18’te Güleşhir istasyonu örnek altı suyu analizinde Diatomlar en fazla görülen canlı grubudur. Hidrozoa olarak bilinen Hidroid canlılar %20 oranında bulunmuştur. Bakteri ve Protozoa canlı grupları en az görülen canlılar olmakla birlikte oranları sırasıyla %1 ve %2’dir. Atanamamış ökaryotlar Güleşhir örnek altı suyu analizinde de %2 olarak bulunmuştur.



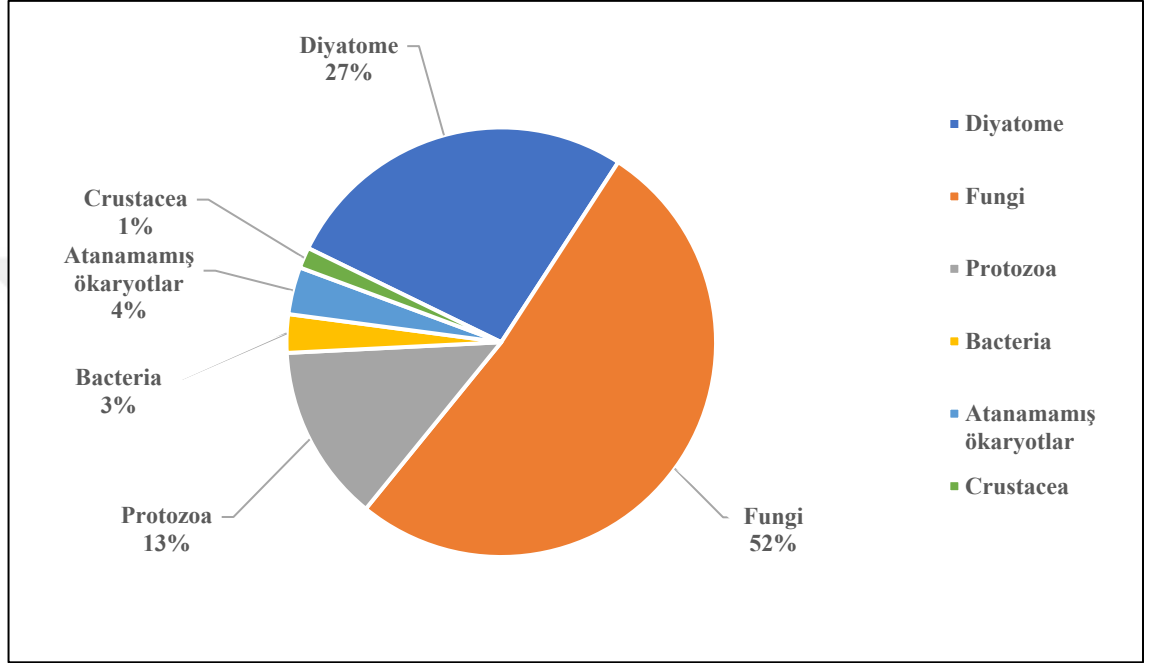
Şekil 4.19. Sulusaray istasyonu örnek altı suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları

Diyatomeler, Sulusaray örnek altı suyu analizindeki canlıların %78'ini oluşturmaktadır ve tüm analizlerde en fazla görülen canlı grubudur. Bakteri, ve Crustacea canlı grupları analizde bulunmuştur fakat oranları 1'in altında kaldığından %0 olarak grafikte görülmektedir. Hidrozoa canlı grubu Sulusaray istasyonunda da görülmektedir. Mantarlar %6 oranıyla yer almaktadır ve tüm analizlerdeki en düşük yoğunluğa sahiptir. Atanamamış mikroorganizmalar %4 oranıyla bulunmaktadır.



Şekil 4.20. Sarıhıdır İstasyonu Örnek Altı Suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları

Sarihır istasyonundaki örnek altı suyu analizinde mantar grubu %47 oranıyla bulunmaktadır. Protozoa grubu diğer istasyonlara göre çok daha düşük çıkmıştır. Bakteri grubu bulunmuştur ve 1'in altında kaldığından %0 olarak verilmiştir. Hidrozoa, Sarihır istasyonunda %21 ile bulunmuştur.



Şekil 4.21. Avanos İstasyonu Örnek Altı Suyu eDNA analizinde bulunan makrobentik dışı canlı grupları

Avanos istasyonu örnek altı suyu analizlerinde %52 oranıyla mantarlar bulunmuştur. Buna ek olarak %27 oranında diyatome bulunmuştur. Atanamamış ökaryotlar Avanos örnek altı suyu analizinde de %4 oranında tespit edilmiştir.

5.BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Kızılırmak Nehri'nin bentik makroomurgasız varlığını belirlemek için morfolojik ve eDNA yöntemleri kullanılmış ve her iki yöntem karşılaştırmaları yapılmıştır. DNA okumalarında özellikle düşük kalitede DNA bölgelerine fazlaca rastlanıldığı ve atanamamış bireyler olduğu söz konusudur. Ayrıca eDNA analizlerinde örnek alınan istasyonlarda nehir derinliğinin önemli ölçüde etki ettiğini belirten, Mi-Jung Bae ve arkadaşları, 18S rRNA ile yaptığı çalışmada, tatlı su biyoçeşitliliği için, dikkate değer bir uygulama ve saha çalışmalarıyla sürekli olarak geliştirilmesi gerektiğini savunmuştur [98]. Nehir derinliği, örnek saklamada kontaminasyon oluşması veya DNA okumalarında hatalar olabileceği göz önünde bulundurulması gereken önemli konulardır. 18S rRNA kullanımına ilişkin bir çok veri aktarılmış ve sonuçları paylaşılmıştır. eDNA yöntemi literatürde yeni bir yöntemdir ve özellikle ülkemizde kullanımı oldukça az çalışmalardandır. eDNA yöntemindeki eksikliklerin azaltılması adına sürekli olarak araştırma yapılması gerekmektedir. 18S rRNA ile yaptığımız çalışmanın üst gruplar açısından bentik makroomurgasızları belirlemede başarılı olduğunu ve Kızılırmak Nehri'ndeki bentik makroomurgasız faunası hakkında bilgi edinmemizi sağladığını belirtebiliriz. Bu çalışma, biyoçeşitliliği izleme çalışmalarında geleneksel yöntemlerin zor ve zahmetli ve zaman alıcı olduğu durumlarda doğru gen bölgesi kullanılarak yapılan eDNA çalışmalarının morfolojik analizler yerine kullanılabileceğini göstermektedir ve çalışmamızın gelecekteki çalışmalar için önemli bir literatür özelliği taşıyacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Çiçek, İ. ve Ataol, M., Türkiye'nin Su Potansiyelinin Belirlenmesinde Yeni Bir Yaklaşım, Coğrafi Bilimler Dergisi, Cilt: 7; 51-64 s. 2009.
2. Akın, M., Akın, G., "Suyun önemi, Türkiye'de su potansiyeli, su havzaları ve su kirliliği", Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi, 47, 2, s. 105-118, 2007.
3. Cirik, S. ve Gökpınar, Ş. Plankton Bilgisi ve Kültürü. Ege Üniversitesi Yayınları, Su Ürünleri Fakültesi Yayın No: 47, İzmir. 274 S. 2006.
4. Hauer, F.R. and Resh, V.H. Benthic Macroinvertebrates. Methods in Stream Ecology. Ed.:Hauer, F.R., Lamberti, G.A. Academic Press, 339-369, San Diego. 1996.
5. Sözen M, Yiğit S, Akşehir (Konya) Gölü bentik faunası ve bazı limnolojik özellikleri. Turkish Journal of Zoology 23: 829–847. 1999.
6. Kıymaz, G. Aşağı Gediz Havzası nehir sularının kalitesinin değerlendirilmesi ve fizikokimyasal parametrelerin makroomurgasız üzerine etkilerinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. 2018.
7. "Nevşehir İli 2018 Yılı Çevre Durum Raporu", Türkiye Cumhuriyeti Nevşehir Valiliği Çevre Ve Şehircilik İl Müdürlüğü, Nevşehir Çevre Ve Şehircilik İl Müdürlüğü Çevre Yönetimi Ve Denetiminden Sorumlu Şube Müdürlüğü, Nevşehir, 2019.
8. Colless, D. H., and D. K. McAlpine. "Chapter 39. Diptera (flies)." *The Insects of Australia* 2: 717-786. (1991)
9. Walker, J.C.a.A., D.T, The Platyhelminthes, in: Anderson, D.T. (Ed.), Invertebrate Zoology. Oxford University Press, pp. 58-80. 2001.
10. Olson, P.D., Cribb, T.H., Tkach, V.V., Bray, R.A., Littlewood, D.T., Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). International journal for parasitology 33, 733-755. 2003.

11. Henry TJ Biodiversity of Heteroptera. In Footitt RG, Adler PH (Eds) Insect Biodiversity: Science and Society. Chichester, UK: Wiley-Blackwell, 223–263. (2009)
12. Schuh RT, Slater JA True bugs of the World (Hemiptera: Heteroptera). Ithaca: Cornell University Press. 336 pp. (1995)
13. Ulukütük S. Uluabat (Apoloyont) Gölü Havzası potamofaunası (Chironomidae_Oligochaeta) su kalitesiyle ilişkisinin belirlenmesi, Doktora Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir. 2009.
14. Brinkhurst, R.O. A Guide for the Identification of British Aquatic Oligochaeta. (2nd edition). Freshwater Biological Association Scientific Publication No. 22, 55 p., Toronto. 1971.
15. Barnard, J. L., and Barnard, C. M., Freshwater Amphipoda of the World I. Evolutionary Patterns, p. 1-358; II. Handbook and Bibliography, 359-830, Hayfield Associates, Mt. Vernon, Virginia. 1983.
16. Keeton T.W., Gould J.L., Gould C.G., Genel Biyoloji, Ankara, 2, 678- 681. 2000.
17. Stock, S.P., Hunt, D.J. Morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. In: Nematodes As Biocontrol Agents. (Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., and Shapiro-Ilan, I., Eds.), pp. 3-44, CABI, Cambridge. 2005.
18. Martens, E. C., Goodrich-Blair, H. The Steinernema carpocapsae intestinal vesicle contains a subcellular structure with which Xenorhabdus nematophila associates during colonization initiation. Cellular Microbiology, 7: 1723–1735. 2005.
19. Decraemer, W. & D.J. Hunt, “Structure and Classification, 3–32” In: Plant Nematology (Ed: R.N. Perry, & M. Moens), Wallingford, Oxfordshire: CAB International, 447pp. 2006.
20. Öktener, A. Sinop ve Bafra’da bazı tatlı sulardaki mollusca türleri üzerine bir ön araştırma. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 17(2):21-30. 2004
21. Hassel, V., John, H. and Jerry, F. A review of the use of Unionid mussels as biological indicators of ecosystem health. Freshwater Bivalve Ecotoxicology. 19–50. 2007

22. Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F. and Taberlet, P. Species Detection Using Environmental DNA from Water Samples. *Biology Letters* 4(4), 423-425. 2008.
23. Thomsen, P.F. and Willerslev, E. Environmental DNA – An Emerging Tool in Conservation for Monitoring Past and Present Biodiversity. *Biological Conservation* 183, 4-18. 2015.
24. Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. “Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples”, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(8), 1123-1130. 2013.
25. Ogram, A., Saylor, G. S., & Barkay, T. “The extraction and purification of microbial DNA from sediments”, *Journal of Microbiological Methods*, 7(2-3), 57-66. 1987.
26. Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., & Nannipieri, P. “Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance”, *Biology and Fertility of Soils*, 45(3), 219-235. 2009.
27. Andersen, K., Bird, K. L., Rasmussen, M., Haile, J., Breuning-Madsen, H. E. N. R. I. K., Kjaer, K. H., ... & Willerslev, E. “Meta-barcoding of ‘dirt’DNA from soil reflects vertebrate biodiversity”, *Molecular Ecology*, 21(8), 1966-1979. 2012.
28. Arnot DE, Roper C, Bayoumi RA. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 61:15-24. 1993.
29. Aravind K, Ravikanth G, Shaanker RU, Chandrashekara K, Kumar ARV, Ganeshaiyah KN. DNA barcoding: An exercise in futility or utility? *Current Science*. 92(9):1213-1216.2007.
30. Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8):2761-2. Epub 22/02/2008.
31. Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F. and Hajibabaei, M. Next- generation Sequencing Technologies for Environmental DNA Research. *Molecular Ecology* 21(8), 1794-1805. 2012.

32. Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G.H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A.J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P.R., Willerslev, E. and Dejean, T. Next-generation Monitoring of Aquatic Biodiversity Using Environmental DNA Metabarcoding. *Molecular Ecology* 25(4), 929-942. 2016.
33. Carew, M.E., Pettigrove, V.J., Metzeling, L. ve Hoffmann, A.A. Environmental Monitoring Using Next Generation Sequencing: Rapid Identification of Macroinvertebrate Bioindicator Species. *Frontiers in Zoology* 10(1), 45. 2013.
34. Handelsman, J., Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (4), 669-685.2004.
35. Ghosh A., Mehta A., Khan A.M., *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 3, 184-193. 2019.
36. Jongman, M., Carmichael, P.C., Bill, M., Technological advances in phytopathogen detection and metagenome profiling techniques, *Current Microbiology*, 77, 675-681. 2020.
37. Schloss, P.D. and Handelsman, J., 2003, Biotechnological prospects from metagenomics, *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (3), 303-10. 2003.
38. Parente, E., Ricciardi, A., Zotta, T., The microbiota of dairy milk: A review, *International Dairy Journal*, 107, 104714. 2020.
39. Bharagava, R.N., Purchase, D., Saxena, G., Mulla, S.I., Applications of metagenomics in microbial bioremediation of pollutants: from genomics to environmental cleanup, *Microbial Diversity in the Genomic Era*, In: Das, S., and Dash, H.R., (ed.), Chapter 26, Academic Press, Elsevier Limited, United States, 459-477. 2019.
40. Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. ve Alland, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330–339. 2007.

41. Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. ve Miaud, C. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49, 953–959. 2012.
42. Takahara, T., Minamoto, T. ve Doi, H. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS ONE*, 8, e56584. 2013.
43. Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R., ve Gough, K. C. The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450- 1459. 2014.
44. Keskin, E. Detection of Invasive Freshwater Fish Species Using Environmental DNA Survey. *Biochemical Systematics and Ecology* 56, 68-74. 2014.
45. Keskin, E. “Molecular evidence for the predation of critically Tehlike altında Endemic *Aphanius transgrediens* from the stomach contents of world wide invasive *Gambusia affinis*” Mitochondrial DNA, DOI:10.3109/19401736.2014.945526. 2014b.
46. Shaw, J.L.A., Clarke, L.J., Wedderburn, S.D., et al., Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation*. 197:131–8. 2016.
47. Aylagas, E., Borja, A., Irigoien, X. ve Rodriguez-Ezpeleta, N. Biyoçeşitlilik tabanlı izleme ve değerlendirme için kıyaslama DNA metabarkodlama. *Ön. Mart Sci.* 3:96. doi: 10.3389/fmars.2016.00096.2016a.
48. Klymus KE, Marshall NT, Stepien CA Great Lakes'teki istilacı omurgasız türlerini tespit etmek için Çevresel DNA (eDNA) metabarcoding assays. *PLoS BİR*, 12, e0177643. 2017.
49. Blackman, R. C., Constable, D., Hahn, C., Sheard, A. M., Durkota, J., Hänfling, B., ve Lawson Handley, L. Detection of a new Non-native freshwater species by DNA metabarcoding of environmental samples--first record of *Gammarus fossarum* in the UK. *Aquatic Invasions*, 12(2). 2017.

50. Bista, I., Carvalho, G.R., Walsh, K., Seymour, M., Hajibabaei, M., Lallias, D., Christmas, M. and Creer, S. Annual Time-Series Analysis of Aqueous eDNA Reveals Ecologically Relevant Dynamics of Lake Ecosystem Biodiversity. *Nature Communications* 8, 14087. 2017.
51. Fernánde z S, Rodrí guez S, Martí nez JL, Borrell YJ, Ardura A, Garcí a-Va zquez E 2018.
52. Mi-Jung Bae, Seong-N.H., Young-Kyung L. *KJEE* 54(3): 221-228 (Baskı), 2288-1123.2021.
53. Dügel, M., & Kazancı, N. Assessment of water quality of the Büyük Menderes River (Turkey) by using ordination and classification of macroinvertebrates and environmental variables. *Journal of Freshwater Ecology*, 19(4), 605-612. 2004.
54. Kara, C., & Çömlekçioğlu, U. Investigation of Karacay's (Kahramanmaraş) Pollution with Biological and Physico-Chemical Parameters (in Turkish with English abstract), *Kahramanmaraş Sütçüimam University Journal of Science and Engineering*, 7(1), 1-7p. 2004.
55. Kalyoncu, H., Zeybek, M., Ağlasun ve Isparta Derelerinin Bentik Faunası ve Su Kalitesinin Fizikokimyasal Parametrelere ve Belçika Biyotik İndeksine Göre Belirlenmesi *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 2 (1): 41-48.2009.
56. Varnosfaderany MN, Ebrahimi E, Mirghaffary N, Safyanian A. Biological 57 assessment of the Zayandeh Rud River, Iran, using benthic marcoinvertebrates. *Limnologica*, 40:226-232. 2010.
57. Lock, K., Asenova, M., Goethals, P.L.M. Benthic macroinvertebrates as indicators of the water quality in Bulgaria: A case-study in the Iskar River basin. *Limnologica*, 41: 334-338. 2011.
58. Adeogun, A.O., Fafioye, O.O. Impact of effluents on water quality and benthic macroinvertebrate fauna of Awha Stream and Reservior. *Journal of Applied Science of Environmental Management*, 15(1): 105-113. 2011.

59. Flores MJL, Zafaralla MT. Macroinvertebrate composition, diversity and richness in relation to the water quality status of Mananga River, Cebu, Philippines. *Philippine Science Letters*, 5(2):103-113. 2012.
60. Akaahan, T.J.A. Studies on benthic fauna as bio indicators of pollution in river Benue at Makurdi, Benue State, Nigeria. *International Research Journal of Environment Sciences*, 3(7): 33-38. 2014.
61. Ojija F., Laizer, H. Macro invertebrates as bio indicators of water quality in Nzovwe Stream, in Mbeya, Tanzania. *International Journal of Scientific and Technology Research*, 5: 211-222. 2016.
62. Aras, Seval, and Ozlem Findik. "Benthic Macroinvertebrates of the Kızılırmak River (Nevşehir, Turkey) and Their Relation with Environmental Variables." *Inland Water Biology* : 1-10. .2023.
63. EFE, Recep "Kızılırmak Nehri'nin Akım ve Rejim Özellikleri". *Öneri*, 1(4):39-66. Ocak 1996.
64. Campaioli S., Ghetti P.F., Minelli A., Ruffo S., *Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane 1*, Provincia Autonoma Di Trento, 356, 1994.
65. Campaioli, S., Ghetti, P.F., Minelli, A., Ruffo, S., *Manuale per Riconoscimento dei Macroinvertebrati delle Acque Dolci Italiane*, vol. II: Provincia autonoma di Trento, 1999.
66. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 11(6):426–37.2011.
67. Illumina: Two-Channel SBS Sequencing Technology. San Francisco; https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/tech-spotlights/techspotlight_two-channel_sbs.pdf. 2015.
68. Rideout, J. R., He, Y., Navas-Molina, J. A., Walters, W. A., Ursell, L. K., Gibbons, S. M., ... Caporaso, J. G. Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ*, 2, e545. doi:10.7717/peerj.545.2014.

69. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. ve Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. 2016.
70. Prodan, A., Tremaroli, V., Brolin, H., Zwinderman, A. H., Nieuwdorp, M. ve Levin, E. Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLOS ONE*, 15(1), e0227434. 2020.
71. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. ve Holmes, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. 2016.
72. Goldberg, C. S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., & Waits, L. P. 2013. “Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*)”, *Freshwater Science*, 32(3), 792-800.
73. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.. 1 Ocak ,2010.
74. Aras, S and Fındık, Ö. "Nevşehir ili için Kızılırmak Nehri'nin içme suyu potansiyelinin araştırılması." *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi* 7.2 :214-222. 2018.
75. Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliği Orman ve Su İşleri Bakanlığı. T.C. Resmi Gazete, 29797, 10 Ağustos 2016.
76. Karadağ A., Öztürk Ş., Kızılırmak nehrinden alınan su numunelerine ait bazı parametrelerin mevsimsel olarak fizikokimyasal değişiminin gözlemlenmesi. MS thesis. Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, 2022.
77. Topkara, E. T., Taşdemir, A. ve Yıldız, S. "Karagöl (Dikili-İzmir)'ün bentik makroomurgasız faunası üzerine bir araştırma." *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi* 14.1 (2018): 34-41.
78. Akbaba, G. ve Boyacı, Y.Ö. "Işıklı Gölü (Denizli) makrobentik faunasının mevsimsel değişimi." *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi* 11.2: 8-19. 2015.

79. Kırkağaç, M., Köksal G., Akarsularda Bentik Makroomurgasızların Su Kirliliğine Karşı Tepkilerinin Belirlenmesi: Biyotik ve Çeşitlilik İndekslerin Kullanımı, Ankara Üniversitesi.2005.
80. Stein, E. D., White, B. P., Mazor, R. D., Jackson, J. K., Battle, J. M., Miller, P. E., ... Sweeney, B. W. Does DNA barcoding improve performance of traditional stream bioassessment metrics? *Freshwater Science*, 33, 302– 311. 2014.
81. Fernández, S., S. Rodríguez, J.L. Martínez, Y.J. Borrell, A. Ardura and E. García-Vázquez. Evaluating freshwater macroinvertebrates from eDNA metabarcoding: A river Nalón case study. *PLoS One* 13: e0201741. 2018.
82. Lejzerowicz, Franck, et al. "High-throughput sequencing and morphology perform equally well for benthic monitoring of marine ecosystems." *Scientific reports* 5.1: 13932. 2015.
83. N Othman et al IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 736 012054. 2021.
84. Broman, Elias, et al. "Microbial functional genes are driven by gradients in sediment stoichiometry, oxygen, and salinity across the Baltic benthic ecosystem." *Microbiome* 10.1: 1-17. 2022.
85. Gaspar, J. M.: merging paired-end reads via novel empirically derived models of sequencing errors. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 536. 2018.
86. Hajibabaei, Mehrdad, et al. "COI metabarcoding primer choice affects richness and recovery of indicator taxa in freshwater systems." *PLoS One* 14.9: e0220953. 2019.
87. Lanzen, Anders, et al. "Benthic eDNA metabarcoding provides accurate assessments of impact from oil extraction, and ecological insights." *Ecological Indicators* 130: 108064. 2021.
88. Marshall, Nathaniel T., and Carol A. Stepien. "Macroinvertebrate community diversity and habitat quality relationships along a large river from targeted eDNA metabarcode assays." *Environmental DNA* 2.4: 572-586. 2020.

89. Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., ... de Bruyn, M. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, **29**, 358–367. 2014.
90. Goldberg, C. S., Strickler, K. M., & Pilliod, D. S. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183, 1–3. 2015.
91. Hering, D., Borja, A., Jones, J. I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., ... Kelly, M. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research*, 138, 192–205. 2018.
92. Fernández, Sara, et al. "How can eDNA contribute in riverine macroinvertebrate assessment? A metabarcoding approach in the Nalón River (Asturias, Northern Spain)." *Environmental DNA* 1.4: 385-401. 2019.
93. Larano, Arnelyn Doloiras, et al. "Comparison of eDNA, bulk-sample metabarcoding, and morphological approaches: A case study of riverine benthic macroinvertebrate communities." *bioRxiv*: 2023-05. 2023.
94. Uchida, Noriko. "Developing a quantification methodology for the ecological status of benthic invertebrate community using environmental DNA-A case study in Natori River Basin." 2020.
95. Walker, J.C.; Anderson, D.T. "The Platyhelminthes". In Anderson, D.T. (ed.). *Invertebrate Zoology*. Oxford University Press. ss. 58-80. 2001.
96. Reinholdt Jensen, Mads, et al. "Seasonal turnover in community composition of stream-associated macroinvertebrates inferred from freshwater environmental DNA metabarcoding." *Environmental DNA* 3.4: 861-876. 2021.
97. Sayar, C. Paleontoloji Omurgasız Fosiller, İstanbul Teknik Üniversitesi Kütüphanesi Sayı: 1435, İstanbul. 1991.
98. Bae, M.-J.; Ham, S.-N.; Lee, Y.-K.; Kim, E.-J. Terk Edilmiş Maden Arazisi Akışındaki Bentik Makroomurgasız Çeşitliliğinin Çevresel DNA (EDNA)

Yaklaşımına Dayalı Olarak Değerlendirilmesi. *Korece J. Ecol. Environ.* 54, 221-228. 2021.

