

ÇAN ASİDİK MADEN DRENAJ GÖLÜNÜN BAKTERİYEL ÇEŞİTLİLİĞİNİN 16S KLONLAMA YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ: TEMSİLİ KLON KÜTÜPHANESİ

Pınar Aytar¹, Mehmet Burçin Mutlu², Ahmet Çabuk^{3*}

Özet

Biyoteknolojik potansiyele sahip yeni mikroorganizmalara kaynak olabileceğinden dolayı asidik ortamlarda bulunan mikroorganizmaları belirlemek ekolojik ve pratik açıdan önemlidir. Bu çalışmanın hedefi; Çanakkale-Çan asidik maden drenajında yaşayan asidofilik bakterilerin çeşitliliğinin 16S klonlama yöntemi kullanılarak klonların rasgele seçilip temsili klon kütüphanesi oluşturulması ile belirlenmesidir. Ülkemizde asidik çevrelerdeki mikrobiyal çeşitlilik hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmanın sonucunda, Çan AMD'de *Acidiphilium* sp. türünün dominant olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca diğer bakteriyel klonların da *Acidobacteriaceae* familyasına ait bir üye (klon #50), bir *Actinobacterium* türü (klon #98), daha önce kültüre alınmamış bir *Firmicutes* üyesi (klon #1) ve başka bir *Acidiphilium* üyesi (klon #68) ile *Leptospirillum* türünden (klon #44) oluştuğu görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Asidik maden drenajı, 16S klonlama, temsili klon kütüphanesi

GİRİŞ

Halen çalışan ya da terk edilmiş metalce zengin asidik suların deşarjından kaynaklanan su kirliliği, tüm Dünya'da kömür ve metal madenciliğinin yapıldığı alanlarda karşılaşılan genel bir olgudur. Asidik maden drenajları (AMD) birçok yaşam formuna oldukça toksik etki gösterirken asidofil mikroorganizmalar bu sulara yaşamlarını rahatça sürdürebilmektedir. Bu türlerin ortamdaki miktarı ve çeşitliliği, ortamın ağır metal konsantrasyonu, pH'sı, organik bileşik içeriği, oksijen varlığı gibi çevresel parametreler tarafından belirlenmektedir. Asit maden drenajları abiyotik kimyasal reaksiyonların sonucunda üretilmektedir. Ancak demir okside eden

* ¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Meşelik Kampüsü, Eskişehir

²Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Yunus Emre Kampüsü, Eskişehir;

³Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Meşelik Kampüsü, Eskişehir. Yazışmalardan sorumlu yazar E-posta: acabuk@ogu.edu.tr

kemolitotrof bakteri ve arkelerin varlığı AMD oluşumunu önemli ölçüde hızlandırmaktadır. AMD oluşumunun en önemli aşaması, yüksek oranda sülfid içeren kömür veya metal cevherinin ya da mineral yığın ve atıkların fragmentasyonu sonucunda pirit (FeS_2) gibi sülfidik minerallerin suya ve oksijene maruz kalmasıdır (1). Son yıllarda ekstremofillerle yapılan çalışmalar daha çok bu mikroorganizmaların kendileri ya da metabolitlerinin potansiyel biyoteknolojik uygulamaları üzerine yoğunlaşmıştır. Yeni mikrobiyal türlerin izolasyonu, yeni metabolitlerin ve yol izlerinin belirlenmesi, hücresel bileşenlerin moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonu ile farklı alanlarda kullanım imkânı sağlanmaktadır (2). Aşırı asidik prokaryotlar hem biyolojik özellikleri hem de uygulama açısından oldukça ilgi görmektedir. Uygulamadan kasıt, minerallerin biyolojik işleme tabi tutulmasını kapsayan biyolojik madenciliktir (3). Özetle asidofilik bakterileri tanımlamak endüstriyel ve çevresel açıdan kritik öneme sahiptir. Asidofil mikroorganizmaların çeşitli biyoteknolojik uygulamaları arasında, biyoliçing ve biyodesülfürizasyon en yaygın olan uygulama alanları olarak sıralanabilir (4, 5).

Çalışılan AMD'lerdeki komünite analizleri kültüre bağlı tekniklerin yanı sıra kültürden bağımsız, moleküler boyutta da değerlendirilmiştir. Bu amaçla kullanılan yöntemler 16S rRNA'ya dayanan 16S klonlama, flouresan insitu hibridizasyon, terminal restriksiyon uzunluk polimorfizm, denatüre edici jel elektroforezi, değişken alanlı jel elektroforezi, rep-PZR, real time PZR, mikroarray olmuştur (6-12).

Temelde, bir filogenetik belirteçte aranan tüm özellikler, küçük alt ünite rRNA'da mevcuttur. Ribozomal RNA'ların evrimsel belirteç (marker) olarak kullanılmalarının nedenleri; yeterli büyüklükte olması, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın olan moleküller olması ve tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içermeleridir (13). Dizilemedeki hızlı ilerleme ve in vitro nükleik asit amplifikasyon teknolojisi, pahalı karmaşık ve yorucu teknikler yerine, hızlı ve rutin uygulaması kolay tekniklerin kullanılmasına yol açmıştır. Sonuçta, küçük alt ünite rRNA'yı kodlayan genin analizi prokaryotik identifikasyon ve sistematikte en çok kullanılan sınıflandırma tekniğidir (14).

Moleküler mikrobiyal ekoloji çalışmalarını bir adım daha öne götüren diğer teknik ise polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) olmuştur. Grup spesifik primerlerin bulunmasıyla yöntem giderek daha başarılı hale gelmiştir. 16S rRNA'nın çevresel örnekten doğrudan çoğaltılması ile eldesinden sonra bunların gen kütüphanesi oluşturulup otomatik dizi analizleme ile yeni tip mikroorganizmalar bulunabilmiştir (15).

Çeşitlilik çalışmalarında kültür temelli yöntemlerin getirdiği sınırlamaların üstesinden gelebilmek için genellikle PZR'a dayanan moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler ekolojik ve çevresel araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Çevreden ekstrakte edilen toplam DNA, PCR için kalıp olarak kullanılabilir. 16S rDNA'yı hedefleyen PZR, prokaryotik çeşitlilik ve identifikasyon çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (16). Hedef DNA (16S) evrensel ya da spesifik primerler ile çoğaltılır ve ürünler farklı yollarla ayrılabilir (17). 16S klon kütüphanesi oluşturma mikrobiyal çeşitliliği belirlemede biraz zaman almasına rağmen önemli ve oldukça geçerli bir yöntemdir. Aşamaları; mikroorganizma izolasyonu olmaksızın doğrudan nükleik asit ekstraksiyonu, 16S rRNA'yı kodlayan genlerin bakteri ve arkeler için evrensel primerler kullanarak PZR ile amplifikasyonu, PZR ürünlerinin kompetan *E. coli*'ye transformasyonu, vektörün bulunduğu transforme olmuş klonların seçimi

(şekilde beyaz koloniler), plazmid DNA'nın ekstraksiyonu, klonlanmış genin dizilimi, klon kütüphanesi oluşturma şeklinde sıralanabilir. Doğruluğunun yüksek olması ve henüz kültüre ve identifiye edilmemiş organizmaların identifikasyonuna olanak tanıdığı için oldukça avantajlıdır (18).

Bu çalışmanın amacı, Çanakkale Çan'da bulunan asidik maden drenaj gölünün bakteriyel çeşitliliğinin 16S klonlama yöntemi ile incelenmesidir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Örneklem Yeri

Keçiagılı köyü civarında bulunan kömür maden drenaj gölünden 2011 Nisan ayında örnekler alınmıştır. Yapılan örneklemeler +4 °C'de muhafaza edilerek en kısa sürede laboratuvara getirilerek analizlerine başlanmıştır.

DNA ekstraksiyonu ve PZR reaksiyonu

DNA ekstraksiyonu için su örnekleri membran filtrasyona tabi tutulmuş ve 0,22 µm por çapına sahip GTTP tipi filtreler doygunluğa ulaşana dek su örneği filtreden geçirilmiştir. Ekstraksiyon için de bu filtre örnekleri kullanılmıştır. Bu filtreler küçük parçalar halinde kesilmiş ve MOBIO Toprak İzolasyon kitinin tüplerine konulmuştur. DNA izolasyonu "UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit" ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Bu kitin prensibi, örneğin homojenizasyonu, mekanik ve fiziksel yöntemlerle hücrelerin lizisi, tüm DNA'ların silika membran tarafından tutunması ve DNA'ların yıkanarak membrandan elüsyonuna dayanmaktadır (19).

Çevresel örnekten ekstrakte edilen toplam DNA uygun primerler kullanılarak PZR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Bunun için 27F ileri ve 1387R geri primer kullanılmıştır. Bacteria üyelerinin 16S rRNA genlerinin amplifikasyonları için uygulanan reaksiyon bileşenleri; 5X renksiz tampon 4 µL, dNTPs (2 mM) 2 µL, MgCl₂ 2 µL, ileri primer 0,4 µL, geri primer 0,4 µL, DMSO 0,4 µL, GoTaq Hot Start enzim 0,2 µL, ultra saf su 9,6 µL, kalıp DNA 1 µL şeklindedir. PZR koşulları ise, 95 °C'de 5 dakika (ilk denatürasyon), 30 döngüden oluşan 95 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika 30 saniye sirkülasyonu ve son olarak 72 °C'de 10 dakikadır (20).

Elde edilen PZR ürünleri %0.7'lik agaroz jellerde (0.5X TBE çözeltisinde) gözlenmişlerdir (21). Elde edilen PCR ürünleri SureClean çözeltisi kullanılarak saflaştırılmış ve konsantre edilmiştir.

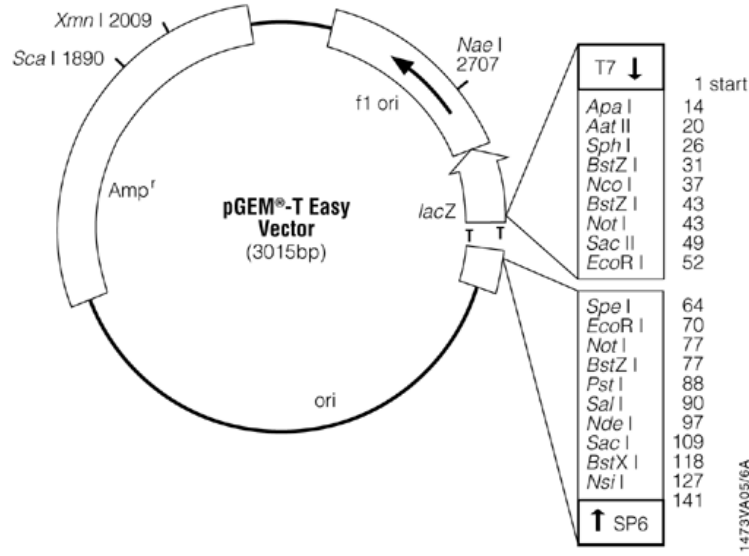
16S Klonlama Deneyleri

Saflaştırılmış PZR ürünlerinin pGEMT vektörüne (Promega)'e ligasyonu kitte belirtilen talimatlara göre yapılmıştır. pGEMT easy vektörün haritası Şekil 1'de verilmiştir. Buna göre 10 µL toplam hacme; 1 µL rapid ligasyon tamponu (2X), 1 µL pGEM T vektör (5ng/µL), ve 1 µL T4 DNA ligaz (0.3U/ µL) eklenmiştir. Kontrol reaksiyonu kontrol DNA (0.8ng/µL) içermiştir. Eklenecek DNA miktarı aşağıda

belirtilen formüle göre hesaplanmıştır (22). Bu formülden yola çıkarak DNA:insert oranının 3:1 olması sağlanmıştır.

$$\frac{\text{Vektör miktarı (ng)} \times \text{DNA fragmentinin büyüklüğü}}{\text{Vektörün büyüklüğü (kb)}} \times \text{DNA : Vektör} = \text{DNA miktarı} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right)$$

Ependorflara koyulan ligasyon reaksiyonları +4 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon etkinliğinin değerlendirilmesi için kitte sağlanan kontrol DNA fragmenti (4ng/μL) 1 μL pGEMT kullanılarak aynı şartlarda ligasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda negatif kontrol olarak DNA içermeyen bir ligasyon reaksiyonu da ortamda denenmiştir (22).



Şekil 1. pGEMT easy vektör haritası.

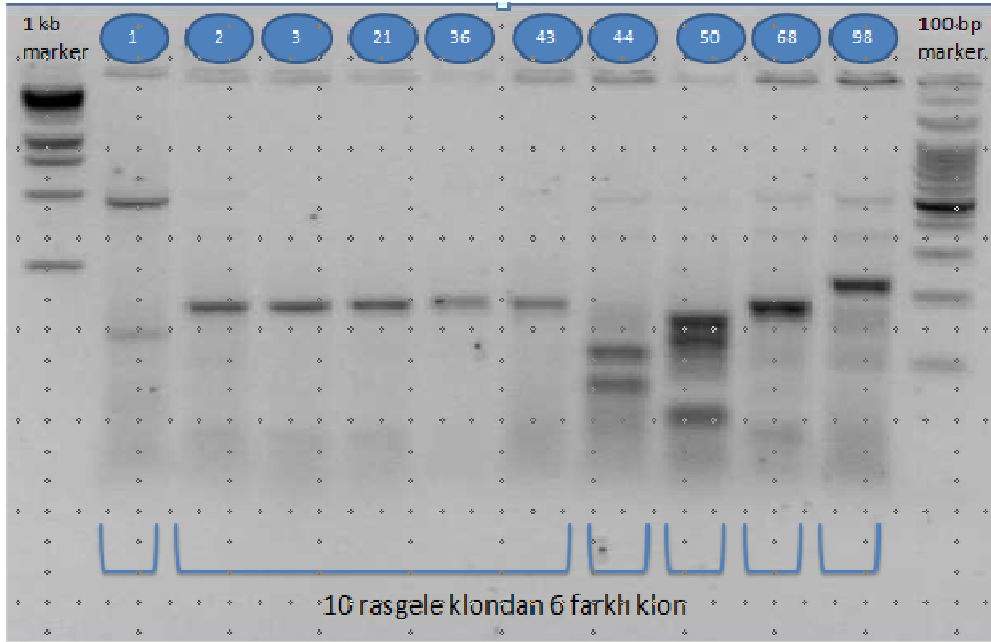
İnkübasyonu takiben kompetent hücelere (*E.coli* DH5α suşu) transformasyon gerçekleştirilmiştir. Transformasyon pGEMT vektör sistem II'de belirtilen prosedür modifiye edilerek yapılmıştır. Her ligasyon reaksiyonu için 2 adet ampicilinli Luria Agar (LA) petri hazırlanmıştır. LA besiyeri steril edildikten sonra son konsantrasyonu 100 μg/mL olacak şekilde ampicilin antibiyotigi eklenmiş ve petri kaplarına dökülerek polimerleşmesi beklenmiştir. Ampicilinli agar petrilere bek alevi yanında XGal (%4 ve 0,1M) stok solusyonundan 20 μL konularak steril bir drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. Transformasyon tüpüne 50-100ng plazmit DNA olacak şekilde 5 μL ligasyon reaksiyonundan, kompetan hücrelerden de 200 μL eklenmiş ve 30 dakika buzda inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler 42 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 4550 saniye ısı şokuna tabi tutulduktan sonra tekrar 2 dakika buzda bekletilmiştir. Bu sürenin bitiminde, Luria Broth (LB) besiyerinden 400 μL eklenmiştir. 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda transformasyon kültürü petrilere yayılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 100 kadar beyaz koloni yeni bir LB agar besiyerine ekilmiş, inkübasyondan sonra 4 °C'de beklenip mavi renge dönüşüp dönüşmediği takip edilmiştir (22). Sonra bu beyaz kolonilerden rasgele 10 tanesi seçilip 27F ve 1387R primer setleri ile koloni PZR reaksiyonu kurulmuştur. Klonlardaki 16S rRNA geni için elde edilen PZR ürünlerinin restriksiyon analizleri için MspI ve HaeIII enzimleri kullanılmıştır. Kesim reaksiyon bileşenleri; 7 μL PZR ürünü; 0,5 μL HaeIII; 0,5 μL

MspI; 1 µL Tampon C; 1 µL BSA olmuştur. Kesim reaksiyonu 37 °C'de 2 saat süresince sürdürülmüştür. TBE tamponu ile hazırlanan yüksek dansiteli %2'lik agaroz jele kesim ürünleri yüklenmiş, belirteç olarak 1 kb ve 100 bp marker'ları kullanılmış, 60 mV'de 3 saat yürütülmüştür. Elde edilen farklı paternlere sahip klonlar ampicilin içeren LB sıvı ortamına transfer edilmiş ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası bu sıvı kültürlerden Strataprep plazmid izolasyon kitinin yönergeleri doğrultusunda plazmid ekstraksiyonu yapılmıştır (23). Bu plazmidler dizi analizine gönderilmiştir, dizi analizinde kullanılan primer setleri T7F ve SP6R olmuştur.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Klonların Taranması

Reastriksiyon kesimi için MspI ve HaeIII enzimleri kullanılmış ve %2 lik agaroz jele yüklenerek yürütülmüş olan jel görüntüsü Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. Çan'daki bakteriyel klonların enzimatik kesim profilleri.

Restriksiyon enzimleri kesim sonrasında elde edilen her klonun verdiği kesim profili benzerliklerine göre gruplandırılmıştır. Bu gruplandırmalardan sonra hangi klonlardan plazmid ekstraksiyonu ve bunu takiben dizi analizi yapılacağına karar verilmiştir. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm (RFLP) sonuçlarına göre Çan'ın bakteriyel çeşitliliği için hazırlanan gen kütüphanesinde 6 paterne sahip klon olduğu belirlenmiştir.

Rekombinant plazmidlerin klonlardan ekstraksiyonu ve saflaştırılması

RFLP sonuçlarına göre gruplara ayrılmış olan klonların her biri için bir temsilci seçilmiş ve bunlardan plazmid izolasyonu ve bunu takiben dizi analizi yapılmasına

karar verilmiştir. Plazmid izolasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü amacıyla ekstraktlardan %1'lik agaroz jellere yükleme yapılmış ve uygun büyüklükte vektörün olup olmadığı marker yardımıyla belirlenmiştir.

II.3. 16S rRNA genlerinin dizi analizleri

Uygun büyüklükte vektöre sahip olan klonlardan dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu dizi analiz sonuçları BLAST programı ile değerlendirilerek her bir klonun gen bankasında benzerlik gösterdiği türler belirlenmiştir. Çizelge 1'de yapılan dizi analizleri sonuçlarına göre bu klonların benzerlik gösterdiği türler gösterilmektedir.

Çizelge 1. Çan AMD'sinin bakteriyel klonlarının benzerlik gösterdiği türler

Klon adı	Primer seti	Accession no	Gen bankasındaki en yakın karşılığı	Benzerlik
1	T7SP6	AM706669.1	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium partial 16S rRNA gene, clone firmicutes	%97
3	T7SP6	AY766000.2	<i>Acidiphilium</i> sp. CCP3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99
44	T7SP6	HM769765.1	<i>Leptospirillum</i> sp. Mc9KL16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99
50	T7SP6	FN870338.1	<i>Acidobacteriaceae</i> bacterium YE3D120 partial 16S rRNA gene, isolate YE3D120	%100
68	T7SP6	JX989228.1	Uncultured <i>Acidiphilium</i> sp. clone LVEg10 16S ribosomal RNA gene (%100)	%100
98	T7SP6	GU168006.1	<i>Actinobacterium</i> BGR 96 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99

Çan AMD'sinin bakteriyel klon kütüphanesi kurulması çalışmasında 100 klon arasından rastgele seçilen 10 klonun 2 restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda 6 farklı profil gözlenmiştir. Bu profil sonucunda temsili klonlar seçilerek dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1). Çan AMD'de *Acidiphilium* sp. türünün dominant görülmesi bu gözlemin daha çok heterotrof olduğunu düşündürmektedir.

Oluşturulan temsili klon kütüphanesinden elde edilen bulgulara göre Klon #2, #3, #21, #36 ve #43'nin aynı restriksiyon profiline sahip olduğu görülmüş, söz konusu profilin ait olduğu türün çalışılan AMD'nin dominant üyesi olduğu belirlenmiştir. Bunların arasından diğerlerini de temsil ettiği düşünülen Klon #3 dizilenmiştir. Klon #3'e ait sekanslar, Kuzey Galler'de metalce zengin asidik sudan izole edilen *Acidiphilium* sp. ile %99 benzerlik göstermektedir (24). *Acidiphilium* spp. en yaygın obligat heterotrof asidofildir. Bu bakteri, organik maddeleri ayrıştırmada yeteneklidir (25). Klon #1'e ait gen dizimleri çevresel örnekten izole edilen daha önce kültüre edilmemiş bir Firmiküt üyesine %99 benzerlik göstermektedir (26). Klon #44'e ait sekanslar demir biyooksidasyon yatak reaktörden sağlanan *Leptospirillum* sp. Mc9KL16 ile %99 benzerlik göstermektedir (27). *Leptospirillum* sp. bilinenin aksine çoğu maden drenajında veya ticari biyolojik zenginleştirme işlemlerinde dominant

demir okside eden asidofildir (28). Klon #50'ye ait gen diziliminin asidik bir sedimentten izole *Acidobacteriaceae* bacterium YE3D120 ile %100 benzerliğe sahip olduğu bulunmuştur (29). Filogenetik olarak farklı olan *Acidobacteriaceae* familyasına ait heterotroflar önemli olduğu düşünülen ve çevresel klonlara göre yaygın bir yayılım gösteren bakterilerden biridir (3). Klon #68'e ait gen diziliminin Urbietta ve arkadaşlarının yaptıkları ancak henüz yayımlamadıkları bir çalışma kapsamında Arjantin'de Copahue jeotermal alanından izole edilen kültüre edilememiş *Acidiphilium* sp. clone LVEg10 ile %100 benzerliğe sahip olduğu görülmüştür. Klon #98'in sahip olduğu gen dizilimi sülfidik maden atıklarından izole edilen *Actinobacterium* BGR 96 ile %99 benzerlik göstermektedir (30).

Günümüzde ülkelerin sahip olduğu biyoçeşitlilik oldukça önemli bir zenginlik olarak kabul görmektedir. Ülkemizin sahip olduğu zengin biyoçeşitlilik unsurlarının envanterleri oluşturulmaya hızla devam edilmektedir. Bu çalışma ile Çan asidik maden drenajının bakteriyel çeşitliliği 16S klonlama tekniği ile temsili bir klon kütüphanesi oluşturularak belirlenmeye çalışılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda tüm klonların taranmasını takiben daha detaylı bir klon kütüphanesi oluşturulması ve aynı alanda gerçekleştirilecek diğer komünite analiz yöntemleri ile karşılaştırılması planlanmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma, yazarlardan P. Aytaç'ın Doktora tezinin bir kısmından üretilmiştir. Ayrıca aynı çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 20111908 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Johnson, D.B., Hallberg, K., 2005. Acid mine drainage remediation options: a review. *Science Total Environment* 338: 3-14.
2. Satyanarayana, T., Chandralata, R., Shivaji, S., 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, 89: 78-90.
3. Rawlings, D.E., Johnson, D.B., 2002. Ecology and biodiversity of extremely acidophilic microorganisms", In: *Extremophiles* (Gerday, C. ed.). In: *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, developed under the auspices of the UNESCO. EOLSS Publishers, Oxford, U.K.
4. Akçıl, A., Çiftçi, H., 2003. Küre Bakır Cevherinin Bakteriyel Liçi, *Madencilik Dergisi*, 42: 15-25.
5. Ehrlich, H.L., 2004. Beginnings of rational bioleaching and highlights in the development of biohydrometallurgy: A brief history. *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection* 4: 102-112.
6. Bryan, C.G., Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2006. Mobilization of metals in mineral tailings at the abandoned São Domingos copper mine (Portugal) by indigenous acidophilic bacteria. *Hydrometallurgy* 83: 184–194.
7. Tan, G., Shu, W., Zhou, W., Li, X., Lan, C., Huang, L., 2009. Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site. *FEMS Microbiology Ecology* 70: 277–285.

8. García-Moyano, A., González-Toril, E., Moreno-Paz, M., Parro, V., Amils, R., 2008. Evaluation of *Leptospirillum* spp. in the Río Tinto, a model of interest to biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy* 94: 155–161.
9. Ni, Y., He, K., Bao, J., Yang, Y., Wan, D., Li, H., 2008. Genomic and phenotypic heterogeneity of *Acidithiobacillus* spp strains isolated from diverse habitats in China. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 248–259.
10. C.M. Zammit, L.A. Mutch, H.R. Watling, E.L.J. Watkin, 2008. Evaluation of quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of biomining microorganisms in culture. *Hydrometallurgy* 94: 185–189.
11. Kock, D., Schippers, A., 2006. Geomicrobiological investigation of two different mine waste tailings generating acid mine drainage. *Hydrometallurgy* 83: 167–175.
12. Garrido, P., González-Toril, E., García-Moyano, A., Moreno-Paz, M., Amils, R., Parro, V., 2008. An oligonucleotide prokaryotic acidophile microarray: its validation and its use to monitor seasonal variations in extreme acidic environments with total environmental RNA. *Environmental Microbiology* 10: 836–850.
13. Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2005. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th Ed.. Pearson Prentice Hall.
14. Boone, D.R., Casstenholz, R.W., Garrity, G.M., (eds.) “*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*”, 2nd. Edn. New York. Springer, 2001.
15. Benlloch, S., Acinas, S.G., Anton, J., Lopez, L., Luz, S.P., Rodriguez-Valera, F., 2001. Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microbial Ecology* 41: 12-19.
16. Pace, N.R., 1999. Microbial ecology and diversity, *ASM News*, 65: 328– 333.
17. Muyzer, G., Smalla, K., 1999. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology, *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127– 141.
18. Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2004. Review: Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58: 169–188.
19. <http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12224.pdf>, UltraClean DNA isolation kit manual, Erişim tarihi: 06.10.2012.
20. Okibe, N., Gericke, M., Hallberg, K.B., Johnson, D.B., Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred tank bioleaching operation. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1936–1943, 2003.
21. Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F., Amann, R., 1999. Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environmental Microbiology* 1: 517-523.
22. <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>, pGEM-T easy vector manual, Erişim tarihi: 06.07.2012.
23. <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/400761.pdf>, Plasmid isolation kit manual, Erişim tarihi: 20.07.2012.

24. K.B. Hallberg, K. Coupland, S. Kimura, D.B. Johnson, 2006. Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in North Wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2022-2030.
25. Akira, H., Nagashima, K.P., Matsuura, K., Shimada, K., Takaichi, S., Wakao, N., Katayama, Y., 1998. Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48: 1889-1898.
26. Muhling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J.C., Joint, I., 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities, *ISME J*, 2: 379-392.
27. Mazuelos, A., Carranza, F., Romero, R., Iglesias, N., Villalobo, E., 2010. Operational pH in packed-bed reactors for ferrous ion bio-oxidation, *Hydrometallurgy*, 104: 186-192.
28. Harrison, A.P., Norris, P.R., 1985. *Leptospirillum ferrooxidans* and similar bacteria: Some characteristics and genomic diversity, *FEMS Microbiology Letters*, 30: 99-102.
29. Lu, S., Gischkat, S., Reiche, M., Akob, D.M., Hallberg, K.B., Kusel, K., 2010. Ecophysiology of Fe-cycling bacteria in acidic sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 8174-8183.
30. Breuker, A., Blazejak, A., Bosecker, K., Schippers, A., 2009. Diversity of Iron Oxidizing Bacteria from Various Sulfidic Mine Waste Dumps (in) E.R. Donati, M.R. Viera, E.L. Tavani, M.A. Giaveno, T.L. Lavalle, P.A. Chiacchiarini, (Eds.); *Advanced Materials Research*, Vol. 71-73, *Biohydrometallurgy: A Meeting Point Between Microbial Ecology, Metal Recovery Processes And Environmental Remediation*: 47-50; Trans Tech Publications Ltd, Switzerland.