

**İLERİ MOLEKÜLER TEKNİKLER KULLANILARAK MAĞARA
AKTERİLERİNİN İDENTİFİYE EDİLMESİ ve ÖRNEKLERİN ANTİMİKROBİYAL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Başlık 12 punto, Times new roman, ortalı, tamamı büyük harf ve bold

Yazar ünvanları, isimleri, kurumları ve email adresleri
yandaki gibi olmalıdır. Ünvan isim ve soyisim **BOLD**
yazılmalıdır.

Dr. Öğr. Üyesi Rozelin AYDIN
Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, rozelin.aydin@gmail.com

Dr. Öğr. Üyesi Cengiz AKKALE
Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, cakkale@adanabtu.edu.tr

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep İYİGÜNDOĞDU
Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, ziyigundogdu@adanabtu.edu.tr

ÖZET **ÖZET** kelimesinin tamamı bold ve büyük harf olmalıdır

PARAGRAF BAŞINDA İÇE GİRİNTİ OLMAMALIDIR

Mağaralar biyosfer içinde besinin kısıtlı, sıcaklığın sabit, nemin yüksek ve fotosentetik aktivitenin sadece giriş koridorlarından sızan ışık sonucu oluştuğu, ekstrem özellikler gösteren yerler olarak kabul edilirler ve bu yüzden aşırı korunaklı bu ortamlarda bulunan mikroflora sınırlı sayıda kalmış ve çok iyi korunmuş olan alanlardır. Mağaralarda kalsit ve benzeri oluşumlarla ilgili mekanizmaların oluşumu üzerine günümüzde artık büyük bir kısmının mikroorganizmalar tarafından yapıldığı bilinmektedir. Bu yüzden mağaralarda yer alan yapıların oluşmasında da mikroorganizmaların çok önemli rolleri olduğu kanıtlanmıştır. Projemiz kapsamında, farklı mağara yapıların bakteriyel yükleri kültürden bağımsız ileri moleküler teknikler kullanarak identifiye edilmeye çalışılmıştır. Aynı zamanda alınan örneklerin antimikrobiyal özelliklerinin tespiti ve minerolojik yapıları da ortaya konmaya çalışılmıştır. Mağaradan 9 farklı yapıdan kazıma yöntemi ile ve damlayan sular, mağara yapıları çökellerine zarar vermeden, aseptik şartlarda steril swablar ve bistürüler kullanılarak örnekler steril tüpler içerisine alınmıştır. +4°C'de korunarak laboratuvara getirilmiştir. Çalışmaya başlayıncaya kadar bir kısım örnek -20°C'de bir kısmı da -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bakteriyel çeşitliliğin belirlenebilmesi için ileri moleküler tekniklerde son yıllarda sıklıkla başvuru alan pyrosequencing yöntemi uygulanmıştır. Modifiye edilmiş disk difüzyon metodu kullanılarak belirlenen örneklerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir. XRF cihazında cam tabletler halinde hazırlanan numunelerin yarı-nicel yüzde ağırlıkça kimyasal analiz sonuçları elde edilmiştir. Cam tabletler ağırlıkça 1/10 oranında numune/Li₂B₄O₇ karışımı ile platin krozeler içerisinde ergitilerek hazırlanmıştır. Analizi yapılan örneklerde 9 farklı phylum tespit edilmiştir. Bunlar sırasıyla *Proteobacteria* sonrasında *Actinobacteria*, *Unclassified*, *Nitrospirae*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* ve *Bacteroidetes* izlenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriler, ileri moleküler teknikler, identifikasyon, antimikrobiyal aktivite, minerolojik analiz

en az 3 adet anahtar sözcük eklenmelidir

**IDENTIFICATION OF CAVE BACTERIA BY USING ADVANCED MOLECULAR
TECHNIQUES AND DETERMINING ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF
EXAMPLES**

İNGİLİZCE Başlık 12 punto, Times new roman, ortalı, tamamı büyük harf ve bold

ABSTRACT

The caves are considered to be extreme places where the food is limited, the temperature is constant, the humidity is high and the photosynthetic activity occurs only as a result of the light leaking from the entrance corridors. It is known that a large part of the mechanisms related to calcite and similar formations in caves have been made by microorganisms. Therefore, microorganisms have a very important role in the formation of structures in caves.....

Keywords:EN.AZ.3.ADET ingilizce anahtar kelime

1.GİRİŞ ANA BAŞLIKLARIN TAMAMI BÜYÜK HARF OLMALIDIR

Mağaralar ekstrem ortamlar olup, çözülebilen kayalardan meydana gelen ve çevresel etkiler ile oluşan korunaklı oluşumlardır. Mağaralar i) Giriş Bölümü, ii) Geçiş Bölümü, iii) Karanlık Bölüm olmak üzere 3 bölgeye ayrılırlar (Lee vd., 2012). Mağaralardaki ekstrem ortam şartları bilimsel araştırmalar için araştırmacılara ideal bir ekosistem sunmaktadır. Kendi özgü mikrobiyal çeşitliliği bulunan mağara ekosistemleri yeni mikroorganizmaların izole edilmesine, aynı zamanda etanol, butanol vb. türevleri, çeşitli yeni enzimlerin ve antibiyotikler gibi biyolojik yan ürünlerin keşfedilmesine olanak sağlamaktadırlar (Barton, 2006).

PARAGRAF BAŞINDA İÇE GİRİNTİ OLMAMALIDIR

Bakteriler mağaralarda yüzeylerde noktacıklar, renklenmeler, çökeltiler ya da oldukça yapışkan görünümlü biyofilmler olarak görülebilirler (Barton, 2006; Stewart, 2012). Son on yılda, özellikle kültürden bağımsız tekniklerdeki ilerlemeler bakteriyel toplulukların dağılımı, farklı taksonların miktarı ve bunların farklı habitatlardaki muhtemel görevleri üzerine daha geniş bilgiler sunmaktadır. Ancak, hala farklı ekosistemlerde gözlenen mikrobiyal çeşitliliğe sebep olan olaylar ve çevresel faktörlerin mikrobiyal toplulukların oluşumunda ne kadar etkili olduğu hakkında bir bilgi eksikliği vardır.

Mağara sistemlerinde alınan mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğu petri kaplarında klasik yöntemler kullanılarak kültüre alınamamaktadır. Mağara mikroorganizmaları besince kısıt ortamlarındaki yaşama adapte olabilmek için, farklı tipte enerji elde etme yöntemleri geliştirmişlerdir. Bu sebeple, bu kadar kısa zamanda görülen bu besin değişimine adapte olamamaktadırlar (Barton, 2006; Engel Annette, 2015). Kültüre bağımlı tekniklerde yaşanan sorunlardan ötürü moleküler teknikler kullanılarak mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi çok büyük bir önem arz etmektedir. Son yıllarda, özellikle kültürden bağımsız ileri moleküler tekniklerdeki gelişmeler bakteriyel toplulukların dağılımı, farklı taksonların miktarı ve bunların farklı habitatlardaki muhtemel görevleri üzerine daha geniş bilgiler sunmaktadır. Kültürden bağımsız metotlar ilk olarak sülfürik mağara sistemlerinde başarı ile kullanılmıştır (Engel Annette, 2015). Luisa Ikner ve (2007) bir kireçtaşı mağarası olan Kartchner Mağarasında yaptıkları çalışmalarında 16S rRNA analizi ile ortamdan Firmicutes, Actinobacteria ve α - β - ve γ - Proteobacteria olmak üzere üç dominant filum tespit etmişlerdir (Ikner vd., 2007). Ortiz ve arkadaşları, Kartchner Mağarasında yaptıkları çalışmalarında aynı ortamları kullanarak gene benzer şekilde α - β - and γ - Proteobacteria ile Firmicutes ve Actinobacteria filumlarına ait bakterileri izole etmişlerdir.

Mağaralar nasıl oluştuğuna dair yapılan ilk çalışmalarda mağaralardaki oluşumların ve yapıların oluşma nedenleri hep jeokimyasal nedenlere dayandırılırken, son yıllarda bu yapıların ve oluşumların büyük çoğunluğunun mikroorganizmalar tarafından oluşturulduğu ortaya çıkmıştır (Barton ve Jurado, 2007; Baskar vd., 2006).

Ülkemizde mağaraların biyoçeşitliliği ve özelde mikrobiyal çeşitlilik üzerine yapılmış çalışmalar son derece sınırlıdır. Mağara içi yapıların oluşumunda rol alan bakterilerin tanımlanması bizlere mağaraların oluşum süreçleri hakkında bilgi verirken, aynı zamanda mağara içerisindeki mikrobiyolojik etkileşimin de önemini gösterecektir. Çalışmamız kapsamında ayrıca örneklerin antimikrobiyal ve minerolojik özellikleri de belirlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı, mağaradaki i) bakteriyel çeşitliliğinin tespitine gidilmesi, ii) mağara içerisindeki her biri farklı özellikte olan oluşumların oluşmasında rol alan bakterileri tanımlama ve iii) örneklerin antimikrobiyal ve minerolojik özelliklerinin belirlenmesidir.

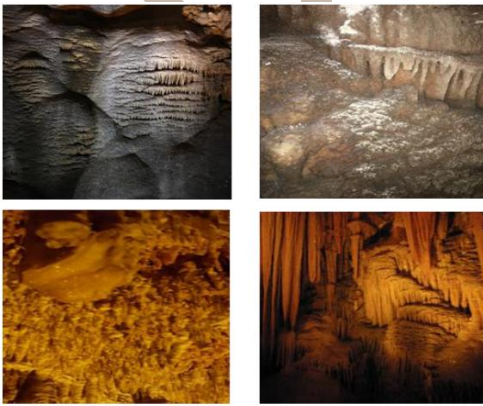
Bu amaçlara ulaşmak için kültürden bağımsız ileri moleküler teknikleri kullanmayı hedeflenmiştir. Bakteriyel çeşitliliğin belirlenmesi için son yıllarda sıklıkla kullanılan bir metot olan 16S rRNA pyrosekanslama ile elde edilen ham verilerin işlenmesi ile bakteriyel yüklerin ortaya konulması sağlanmıştır. Elde edilen örneklerin modifiye edilmiş disk difüzyon metodu ile antimikrobiyal aktiviteleri çeşitli mikroorganizmalar üzerinde test edilmiştir. Ayrıca örnekler toz hale getirilerek örneklerin minerolojik yapısı tanımlanmaya çalışılmıştır.

2.MATERYAL VE YÖNTEM

Kültürden bağımsız ileri moleküler teknikler kullanılarak mağara içindeki oluşumlardan, mağara duvarlarından örnekler alınarak mikrobiyal çeşitliliğin tespitine gidilmiştir. Toplamda 9 farklı oluşumdan örnekler toplanmıştır.

2.1. Örneklerin toplanması ALT BAŞLIKLAR KÜÇÜK HARFLE YAZILMALIDIR

Projemizde; farklı yapılardan kazıma yöntemi ile ve damlayan sular, mağara yapıları çökeltilere zarar vermeden, aseptik şartlarda steril swablar ve bistürüler kullanılarak örnekler steril tüpler içerisine alınmıştır (Şekil 1). +4°C`de korunarak laboratuvara getirilmiştir. Çalışmaya başlayınca kadar bir kısım örnek -20°C`de bir kısmı da -80°C`de muhafaza edilmiştir.



Şekil 1. Örnekleme sahası

2.2. Bakterilerin İdentifikasyonu

Bakteriyel çeşitliliğin belirlenebilmesi için ileri moleküler tekniklerde son yıllarda sıklıkla başvurulmuş pyrosekanslama yöntemini uygulanmıştır. Fast DNA™ SPIN Kit kullanılarak

.....
.....

2.3. Antimikrobiyal atkivitenin belirlenmesi

Modifiye edilmiş disk difüzyon metodu kullanılarak belirlenen örneklerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir. Bu amaç için Standart NCCLS disk difüzyon metodu (Lalitha ve Vellore, 2005), ürünlerin her çeşit mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi test etmek amacıyla modifiye edilmiştir. Bunun için 108 cfu/mL bakteri, 106 cfu/mL maya ve 104spor/mL küf içeren 100µl inokulum yeni kültürlerden hazırlanıp ve sırasıyla nutrient agar (NA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ve Potato Dextrose Agar (PDA)

.....
.....

3. BULGULAR

3.1 Bakteriyel çeĞitlilik

Analiz sonuçlarımıza göre toplamda 9 farklı phylum tespit edilmiştir. Bu phylum lar içerisinde *Proteobacteria* sonrasında *Actinobacteria*, *Unclassified*, *Nitrospirae*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* ve *Bacterioidetes* izlemektedir

.....
.....

4.TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Biyosferin parçası olan mağaralar insan aktivitesinin en kısıtlı olduğu dünya üzerindeki en izole alanlardır. Bu alanlara ait biyolojik çeşitliliğin araştırılması yeni türler, metabolitler ve gen kaynakları bakımından biyoteknolojik açıdan önem teşkil etmektedir.

Mağara çökelleri yeraltı suyunun mağara atmosferi ile teması sonrasında içerdiği karbondioksit gazının (CO2) atmosfere salınması sonucunda oluşmaktadır. Oluşturulan karbonik asit, yeraltı suyunun sızması sırasında karbonatlı (ve diğer) minerallerin çözünmesine neden olmaktadır.

.....
.....

KAYNAKLAR

- Barton, H. A. 2006. Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. *Journal of Cave and Karst Studies*.
- Barton, H. A., and Jurado, V. 2007. What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe*, 2(3), 132–138. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34547171491&partnerID=40&md5=c0f6b943fe84ea15b7f8e3362f075b47>
- Barton, H. A., and Northup, D. E. 2007. Geomicrobiology in cave environments: Past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69(1), 163–178.
- Baskar, S., Baskar, R., Mauclair, L., and McKenzie, J. A. 2006. Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India. *Current Science*, 90(1), 58–64.
- Navdeep K. Dhami, Abhijit Mukherjee and Elizabeth L. J. Watkin. Microbial Diversity and Mineralogical-Mechanical Properties of Calcitic Cave Speleothems in Natural and in Vitro Biomineralization Conditions. *Frontiers in Microbiol*, 9-40