



**T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İNSUYU MAĞARASININ BAKTERİYEL  
BİYOÇEŞİTLİLİĞİNİN, ENZİMATİK VE  
ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Fatma Seçil KOÇ**

**BURDUR, 2018**

T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSUYU MAĞARASININ BAKTERİYEL  
BİYOÇEŞİTLİLİĞİNİN, ENZİMATİK VE  
ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLLERİNİN  
BELİRLENMESİ

Fatma Seçil KOÇ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nermin SARIGÜL

BURDUR, 2018

## YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY FORMU

Fatma Seçil KOÇ tarafından Dr. Öğr. Üyesi Nermin SARIGÜL yönetiminde hazırlanan “İnsuyu Mağarasının Bakteriyel Biyoçeşitliliğinin, Enzimatik ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01/08/2018

**Dr. Öğr. Üyesi Nermin SARIGÜL** (Başkan)

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi.....



**Doç Dr. Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ** (Jüri Üyesi)

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi.....



**Doç Dr. Seyhan ULUSOY** (Jüri Üyesi)

Süleyman Demirel Üniversitesi.....



### ONAY

Bu Tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun \_\_\_\_\_ Tarih ve \_\_\_\_\_ Sayılı Kararı ile Kabul Edilmiştir.

.....  
**Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ**

\_\_\_\_\_  
Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“İnsuyu Mağarasının Bakteriyel Biyoçeşitliliğinin, Enzimatik ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi”** başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

## **TEŞEKKÜR**

Bu araştırma için beni yönlendiren, çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesi ile yardımcı olan değerli Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Nermin SARIGÜL'e teőekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımı yürütürken imkanlarından yararlandığım Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi' ne teőekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarımnda bilgi ve tecrübesi ile desteklerini esirgemeyen Uzman Orhan YAVUZ'a teőekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

**Ağustos, 2018**

**Fatma Seçil KOÇ**

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ÖZET .....	vii
SUMMARY .....	viii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. İnsuyu Mağarası .....	3
2.2. Biyosferin Bir Parçası Olarak Mağaralar .....	3
2.3. Ekstrem Çevreler Olarak Mağaralar .....	5
2.4. Mağaralardaki Mikrobiyal Biyoçeşitlilik .....	6
2.4.1. Bakteriyel Biyoçeşitlilik.....	8
2.4.2. Arkea Biyoçeşitliliği .....	10
2.4.3. Fungal Biyoçeşitlilik .....	11
2.4.4. Biyofilm Çeşitliliği.....	12
2.4.5. Mağaralardaki Patojenik Mikroorganizmalar .....	13
2.5. Mağaralardaki Metabolik Çeşitlilik.....	14
2.5.1. Mağaralarda Enerji Akışı ve Redoks Reaksiyonları .....	14
2.5.2. Mağaralarda Mikroorganizma – Mineral Etkileşimleri .....	15
2.6.1. Yeni Antibiyotik Üreten Bakterilerin Kaynağı Olarak Mağaralar.....	17
2.6.2. Antibiyotik Direnç GenRezervuarları Olarak Mağaralar.....	18
2.6.3. Yeni Enzimlerin Keşfinde Mağaralar .....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyaller.....	25
3.1.1. İnsuyu Mağarası .....	25
3.2. Besiyeri Ortamları .....	26
3.2.1. 0,1X Nutrient Agar Besiyeri Ortamı .....	26
3.2.2. R2A Besiyeri Ortamı.....	26
3.2.3. M9 Besiyeri Ortamı.....	26
3.2.4. 0,1x Nutrient Broth Besiyeri Ortamı.....	27
3.2.5. Amilaz Test Ortamı.....	27
3.2.6. Proteaz Test Ortamı.....	27
3.2.7. Lipaz Test Ortamı .....	28
3.2.8. Jelatinaz Test Ortamı.....	28
3.2.9. Üreaz Test Ortamı .....	28
3.3. Boyalar ve Çözeltiler .....	29
3.3.1. Kristal Viyoleto Solüsyonu .....	29
3.3.2. Gram İyodür Solüsyonu .....	29
3.3.3. Safranin Solüsyonu .....	29
3.3.4. % 0,9 Sodyum Klorür Solüsyonu.....	29
3.3.6. Tris (Tris Hidroksimetil Amino Metan) / EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) .....	30
3.3.7. SET (Sakkaroz-EDTA-Tris HCl) Tampon .....	30

3.3.8.	% 10 SDS Çözeltisi.....	30
3.3.9.	Fenol/ Kloroform/ İzamil Alkol Çözeltisi.....	30
3.4.	Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyaller.....	30
3.5.	Antibiyotikler.....	32
3.6.	Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	32
3.7.	Yöntem.....	32
3.7.1.	Mikroorganizmaların İzolasyonu.....	32
3.7.2.	Mikroorganizmaların Kültürü ve Saflaştırılması.....	33
3.7.3.	Gram Boyama.....	34
3.7.4.	Biyokimyasal Testler.....	34
3.7.4.1.	Katalaz Testi.....	34
3.7.4.2.	Proteaz Testi.....	34
3.7.4.3.	Lipaz Testi.....	35
3.7.4.4.	Amilaz Testi.....	35
3.7.4.5.	Jelatinaz Testi.....	35
3.7.4.6.	Üreaz Testi.....	35
3.7.5.	Antibiyotik Duyarlılığının Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Testi (MİK) ile Belirlenmesi.....	36
3.7.6.	Genomik DNA İzolasyonu.....	36
3.7.7.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	37
3.7.8.	DNA Dizi Analizi.....	38
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	39
4.1.	Gram Boyama ve Hücre Morfolojisi.....	39
4.2.	Biyokimyasal Test Sonuçları.....	42
4.3.	Antibiyotik MİK Testi Sonuçları.....	47
4.4.	Mikroorganizmaların Moleküler Düzeyde Tür Tanısı.....	53
4.5.	Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi.....	57
5.	SONUÇ.....	62
	ÖZGEÇMİŞ.....	73

## ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2. 1. İnsuyu Mağarası .....	3
Şekil 2. 2. Mağaralarda ışık maruziyetine bağlı olarak oluşan bölgeler (Lee vd., 2012)..	6
Şekil 2. 3: Mağaralarda Mikrobiyal Aktivite .....	8
Şekil 2. 4. Meksika Villa Luz Mağarasında biyofilm oluşumu.....	13
Şekil 2.5. Boquet B-4 Ortamında Bakteriler Tarafından Oluşturulan Kalsit Kristallerinin Elektron Mikrograflarının Taranması .....	16
Şekil 2. 6. Lechuguilla Mağarasından İzole Edilen Bakterilerin Çeşitli Antibiyotiklere Karşı 20 mg/ml Konsantrasyonda Direnç Seviyeleri.....	22
Şekil 3. 1. Örneklerin Mağara duvarlarından toplanması.....	33
Şekil 4. 1. Farklı besiyeri ortamlarında saflaştırılan suşlara ait deney fotoğrafı	39
Şekil 4. 2. Enzim Testleri: a. Katalaz, b. Proteaz, c. Amilaz, d. Lipaz, e. Üreaz, f. Jelatinaz.....	46



## ÇİZELGE DİZİNİ

	Sayfa
<b>Tablo 2. 1.</b> Bazı mağaralardan izole edilen antibiyotik üretme potansiyeline sahip mikroorganizmalar .....	18
<b>Tablo 2. 2.</b> Antibiyotik ana sınıflarının hedefleri, direnç mekanizmaları ve etki biçimleri.....	19
<b>Tablo 2. 3.</b> Bazı mikrobiyal enzimler ve biyoteknolojik uygulama alanları.....	23
<b>Tablo 3. 1.</b> İnsuyu Mağarasından örnekleme yapılan alanlar.....	25
<b>Tablo 3. 2.</b> Çalışma kapsamında kullanılan primerler.....	31
<b>Tablo 3. 3.</b> Antibiyotik duyarlılık deneylerinde kullanılan antibiyotikler.....	32
<b>Tablo 4. 1.</b> Aydınlık alan örneklerinden izole edilen suşlar ve kodları.....	40
<b>Tablo 4. 2.</b> Karanlık alan örneklerinden izole edilen suşlar ve kodları.....	41
<b>Tablo 4. 3.</b> Aydınlık alan örneklerinin enzim testi sonuçları.....	44
<b>Tablo 4. 4.</b> Karanlık alandan izole edilen örneklerin enzim testi sonuçları.....	45
<b>Tablo 4. 5.</b> Aydınlık alan suşlarının antibiyotik MİK testi sonuçları.....	47
<b>Tablo 4. 6.</b> Karanlık alan suşlarının antibiyotik MİK testi sonuçları.....	48
<b>Tablo 4. 7.</b> Tür tanısı yapılan bakteriler ve NCBI kayıt numaraları.....	54
<b>Tablo 4. 8.</b> Tür tanılaması yapılan suşlarda saptanan antibiyotik direnç genleri.....	58
<b>Tablo 4.9.</b> PZR ile saptanan direnç genlerinin MİK testi sonuçları ile .. karşılaştırılması.....	60

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>CLSI</b>	: Clinical & Laboratory Standards Institute
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>MAKÜ</b>	: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
<b>MİK</b>	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>tRNA</b>	: Transfer Ribonükleik Asit
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

### İnsuyu Mağarasının Bakteriyel Biyoçeşitliliğinin, Enzimatik ve Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Fatma Seçil KOÇ

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nermin Sarıgül

Ağustos, 2018

Bu tez çalışmasında İnsuyu Mağarası'nın bakteriyolojik çeşitliliği ve izolatların antibiyotik direnç profilleri kültür temelli yöntemler ve moleküler biyoloji yöntemleriyle belirlenmiştir. Çalışma kapsamında İnsuyu Mağarasının 15 farklı lokasyonundan aydınlık ve karanlık alanlardan örnekleme yapılmıştır. Örnekleme sonunda elde edilen 75 izolatın antibiyotik dirençliliği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Testi ile belirlenmiştir. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) testi sonucunda 75 izolattan 64 sefpodoksim, 6 rifampisin ve gentamisin, 18 vankomisin, 15 ampisilin, 44 klindamisin, 48' inin penisilin antibiyotiklerine karşı en yüksek konsantrasyonda direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Çoklu direnç gösteren 10 izolat ve duyarlı 3 izolat seçilerek 16S rRNA dizi analizi ile tür tayini yapılmıştır. Çoklu direnç gösteren *Pseudomonas spp.* (2G-2), *Pseudomonas jesseni* (2J), *Sphingopyxis fribergensis* (4D), *Microbacterium yannicii* (4M), *Flavobacterium chungangense* (6B), *Rhodococcus spp.* (7A), *Flavobacterium resistens* (9D), *Pseudomonas spp.* (K-4F), *Pseudomonas spp.*(K-4G), *Buttiauxella agrestis* (K-15A) ve duyarlılık gösteren *Flavobacterium chungangense* (K-1E), *Rhodococcus erythropolis* (K-11G) ve *Pseudomonas spp* (K-15G) suşlarında antibiyotik direnç genleri taranmıştır. *Pseudomonas jesseni* (2J) ve *Pseudomonas spp.* (K-4G)' de aminoglikozit 2''-O-nükleotiltransferaz (aadB), beta laktamaz (bla<sub>CTXM3</sub>, bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>TEM</sub>), aminoglikozit direnç proteini (strA), rifampin ADP- ribosiltransferaz (arr2- int2a), vankomisin (vanC) olmak üzere 8 farklı gen bölgesi saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** bakteriyel biyoçeşitlilik, insuyu mağarası, çoklu ilaç direnci, moleküler yöntemler

## SUMMARY

M. Sc. Thesis

### Determination of Bacterial Biodiversity, Enzymatic and Antibiotic Resistance Profiles of Insuyu Cave

Fatma Seçil Koç

Burdur Mehmet Akif Ersoy University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Nermin SARIGÜL

August, 2018

In this study, the bacteriological diversity of Insuyu Cave was determined by culture depended and molecular biology methods. Samples were taken from 15 different points in Insuyu Cave. Antibiotic resistance of 75 isolates was determined by the Minimum Inhibition Concentration (MIC) Test.

As a result of Minimum Inhibition Concentration (MIC) test, 64 cefpodoxim, 6 rifampicin and gentamycin, 18 vancomycin, 15 ampicillin, 44 clindamycin, 48 penicillin resistant strains were detected. 10 multiple drug resistant and 3 susceptible strains were selected and identified by 16S rRNA sequencing. Antibiotic resistant genes were investigated for both multiple drug resistant *Pseudomonas spp.* (2G-2), *Pseudomonas jesseni* (2J), *Sphingopyxis fribergensis* (4D), *Microbacterium yannicii* (4M), *Flavobacterium chungangense* (6B), *Rhodococcus spp.* (7A), *Flavobacterium resistens* (9D), *Pseudomonas spp.* (K-4F), *Pseudomonas spp.* (K-4G), *Buttiauxella agrestis* (K-15A) and susceptible *Flavobacterium chungangense* (K-1E), *Rhodococcus erythropolis* (K-11G), *Pseudomonas spp.* (K-15G).

*AadB*, *Bla<sub>CTXM3</sub>*, *Bla<sub>SHV</sub>*, *Bla<sub>OXA1</sub>*, *Bla<sub>SHV</sub>*, *Bla<sub>SHV2</sub>*, *Bla<sub>TEM2</sub>*, *StrA* and *Arr2-int2a* genes were detected in *Pseudomonas jesseni* (2J) and *aadB*, *bla<sub>CTXM3</sub>*, *bla<sub>OXA1</sub>*, *bla<sub>SHV2</sub>*, *strA*, *strA'*, *arr2-int2a* and *vanC* genes were detected in *Pseudomonas spp.* (K-4G).

**Keywords:** bacterial biodiversity, Insuyu cave, multiple drug resistance, molecular method

## 1. GİRİŞ

Mağaralar, bir insanın içine sığabildiği kadar büyük, doğal yollarla oluşan ve tamamen karanlık yeraltı geçitleri olarak tanımlanmaktadır. Mağaralar ışık, sıcaklık, su, nem ve besin maddelerinin azlığı gibi faktörler bakımından sınırlandırılmış ekosistemler olarak dikkat çekmektedir vemağaralar ekstrem çevreler olarak kabul edilmektedir (Lee vd., 2012). Mikroorganizmalar mağaralardaki ekstrem koşullarda yaşayabilen en önemli ve en yaygın organizmalardır (Sarbu vd., 1996; Yamaç, 2008; Barış, 2009). Mikroorganizmalar mağaraların taş yüzeylerinde kolonize olabilirler, damlayan sulardaki düşük organik maddeleri kullanabilirler ve minerallerin kristalleştirme süreçlerine müdahale edebilirler.

Mağaralarda ilk biyolojik çalışmalar Orta Çağ'da Avrupa ve Çin'de başlatılmıştır (Culver ve Pipan, 2009; Romero, 2009; Engel, 2010). 1980'lerin başlarında, Atlas Okyanusu'ndaki hidrotermal alanlarda karanlık yaşam ekosistemleri keşfedilmiştir(Sarbu vd., 1996). Farklı özelliklere sahip olan yeni keşfedilen ekosistemler yeni türler için kaynak olarak değerlendirilmelidir. Jeobiyojoloji ve astrobiyojoloji çalışmalarında mağaralar model sistem olarak kullanılabilir (Taylor, 1999; Boston).Mağaralar ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu onların jeolojik, hidrolojik ve jeokimyasal özellikleri ile ilgilidir. Mikrobiyojoloji çalışmaları yakın zamanda yoğunluk kazanmıştır (Hoyos vd. 1998; Groth vd., 2001).

Mikrobiyal biyoçeşitlilik araştırmaları mağaralarda yaşayan ekstrem mikroorganizmaların keşfi için önemlidir (Amann vd., 1995). Ekstremofilik mikroorganizma çalışmalarının mağara ekosistemlerinde yapılmasının sebepleri arasında;

a) Ortam koşullarının benzersiz olması ve dolayısıyla bu ortamlarda yaşayan mikroorganizmalarınbu ekstrem şartlara uygun önemli adaptasyon özelliklerine sahip olması

b) Bilimsel açıdan yeterince araştırılmamış ortamlar olması ve buna bağlı olarak biyolojikçeşitliliği konusunda yeteri kadar bilginin bulunmaması

c) Mağara habitatlarına adapte olmuş mikroorganizmaların farklı metabolik aktiviteler göstermesi

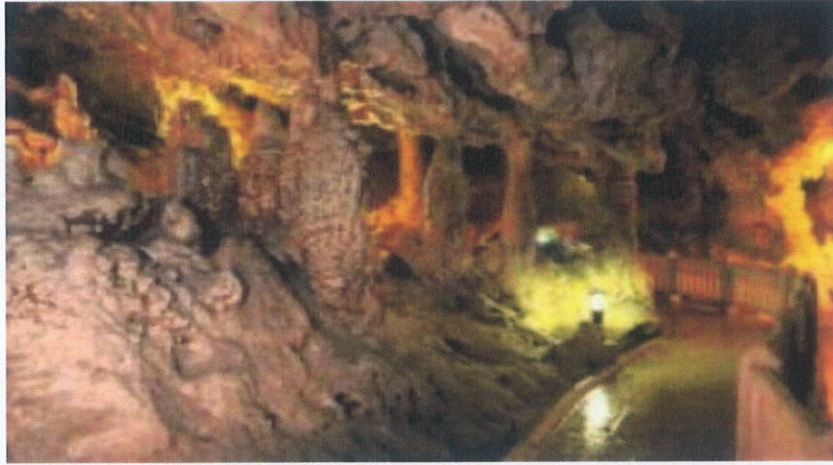
d) Bu ortamlardan izole edilen mikroorganizmaların enzimlerinin ve/veya metabolik ürünlerinin endüstriyel, tıbbi ve zirai amaçla kullanılabilmesi gibi sebepler yer almaktadır (Satarayana vd., 2005).

Türkiye'de mağaraların jeolojik ve biyolojik özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça az sayıdadır. Gerçekleştirilen biyolojik mağara çalışmaları çoğunlukla yarasalar ve eklembacaklılara odaklanmaktadır (Paksuz vd., 2007). Çalışmamızda Türkiye'de turizme açılan ilk mağara olan İnsuyu Mağarası'nın mikrobiyolojik çeşitliliğinin moleküler biyoloji temelli yöntemlerle ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnsuyu Mağarası

İnsuyu Mağarası Batı Toros Dağları'nın Göller Bölgesi'nde ve Burdur-Antalya karayolunun güneydoğusunda, deniz seviyesinde 1200 m. yükseklikte yer alan Burdur şehir merkezine 11 km uzaklıkta bulunmaktadır. 1966 yılında turizme açılan İnsuyu Mağarası ülkemizde turizme ilk açılan mağaradır. Mağaranın içinde birbirleriyle bağlantılı dokuz göl vardır. Bunlardan Büyük Göl 512 m<sup>2</sup>'lik alanıyla Türkiye'nin en büyük yer altı gölüdür. Oluşumu 10 milyon yıl öncesine dayanan mağarada, damlayan kireçli suların katılaşmasıyla oluşan kolonlar ve tavandan aşağıya sarkan kalker birikintileri bulunmaktadır (Şekil 2. 1). Dilek Gölü'nde bulunan dikit, 6 metrelik boyuyla Türkiye'nin en büyük dicitidir. Birbirine bağlı iki bölümden oluşan mağaranın toplam uzunluğu 525 metre olan ve ana faya paralel uzanan birinci bölüm girintili çıkıntılı kafesli bir yapıya sahiptir. İkinci bölüm yer altı suyunun alçalması sonucu keşfedilmiştir. Birinci bölümden daha uzun olmasına rağmen damlataş oluşumları açısından birinci bölüme göre daha fakirdir (Kültürturizm.gov.tr).



Şekil 2. 1. İnsuyu Mağarası

### 2.2. Biyosferin Bir Parçası Olarak Mağaralar

Mağaralar; yüzeyle bağlantısı bulunan, en az bir insanın girişine olanak sağlayacak genişlik ve yüksekliğe sahip olan yeraltı boşlukları olarak tanımlanmaktadır (Palmer, 1991; Northup ve Lavoie, 2001; Ozansoy ve Mengi 2006). Mağara habitatları

insanlar ve hayvanlar tarafından çok uzun bir süre kullanılmıştır. Arkeolojik çalışmalar Paleolitik dönemde bile mağara kullanımının kanıtlarını göstermektedir. İnsanların mağaraları kullanma nedenleri arasında barınak, depolama, minerallerin kaynakları, sanatsal ifade yerleri ve kültürel, gömü ve/veya tören alanları gibi farklı kullanım amaçları bulunmaktadır. Günümüzde ise mağaraların insanlar tarafından kullanımı, çoğunlukla rekreasyon ve bilimsel keşifle sınırlıdır.

Mağaralar jeokimyasal özellikleri bakımından tek tip ortamlar değildir (Hoyos vd., 1998). Erozyonel mağaralar dalgaların vurması gibi mekanik etkiler ile gelişmiştir. Çözülme mağaraları erozyon mağaralarının zaman içerisinde değişime uğramasıyla oluşmaktadır. Volkanik mağaralar ve lav tüplerinin oluşumu ise çözülme mağaralarından farklıdır, bu tip mağaralar akan lavı çevreleyen soğutucu kabuktan meydana gelmiştir. Karstik mağaraların karakteristik özelliği kireçtaşı, dolomit, jips gibi çözünen kayalarla gelişmiş olmasıdır (Ford ve Williams, 2007). Karstik alanlar mikroorganizmalar için uzun vadeli bir rezervuar olarak hizmet etmektedir.

Mağaralar çeşitli jeolojik süreçler ile oluşmalarına rağmen 3 temel mekanizma vardır:

**Karbonik asit ile çözünme:** su, atıklardan ve topraktan geçerken biyojenik CO<sub>2</sub>'i absorblar ve seyreltik karbonik asit oluşur. Asitleşme suyun geçtiği yerlerdeki mikrobiyal aktivite ile de gerçekleşebilir. Eğer bu zayıf asit kireçtaşı (CaCO<sub>3</sub>) ile temas ederse, kalsiyum karbonat çözünür. Çözünmenin devamı bir girinti ve mağara oluşumuna neden olur. Mağaranın dış kısmının açık hava ile temas etmesi içerdeki yoğun karbondioksitin dışarı salınmasına ve sarkıt ve diktler gibi ikincil karbonat oluşumlarına neden olmaktadır.

**Sülfürik asit kaynaklı mağara oluşumu:** hidrojen sülfid gazı su ile temas ettiğinde sülfürik asite oksitlenir ve bu da kireçtaşının çözünmesine neden olur. Mikroorganizmalar tarafından biyojenik sülfürik asit üretimi de aynı şekilde mağara oluşumuna neden olmaktadır.

**Lav tüpü mağaraları:** volkanik alanlarda aktif akan lav tarafından oluşturulur. Eriyik haldeki lav volkandan dışarı doğru akarken, lavın dış yüzeyi daha çabuk soğur ve altta akan lav için bir izolasyon oluşturur. Püskürme sona erdiğinde akışkan lav akmaya devam eder ve ardında boş tüp şeklinde bir kanal bırakır. Lav tüpü mağaralarının oluşumunda mikroorganizmaların etkinliği yoktur.



Oluşum şekillerine göre yapılan diğer bir sınıflandırmada mağaralar 4 gruba ayrılmaktadır.

Çözünme mağaraları: kireçtaşı ve dolomitten oluşan ana kayaç ile yeraltı sularının reaksiyona girmesi, bunun sonucunda erimesi ile oluşan en büyük ve en yaygın mağara tipleridir.

Erozyonal mağaralar: rüzgar ya da su akıntıları nedeni ile oluşmaktadır.

Lav mağaraları: volkanik aktiviteler sonucu oluşan lav tüpleridir.

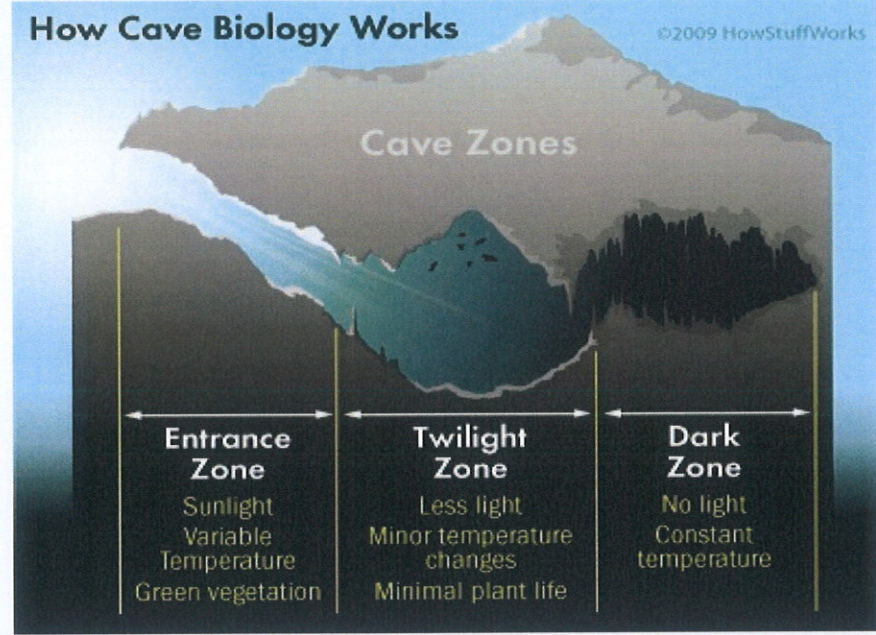
Deniz mağaraları: denizdeki dalgaların kıyıya vurması sonucu, kıyıdaki büyük kayaların içinde oluşan mağaralardır.

### **2.3. Ekstrem Çevreler Olarak Mağaralar**

Ekosistemler karşılaştırıldığında bazı ortamların çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörler açısından yaşam sınırlarını zorladığı bilinmektedir. Yer altı sistemlerine bakıldığında ve bir veya daha fazla sınırlayıcı faktöre sahip olan mağaralar, ekstrem ekosistemler olarak dikkat çekmektedir. Işık, sıcaklık, su/nem ve özellikle de besin maddelerinin kıtlığı birçok mağarada önemli sınırlayıcı faktörlerdendir. Mağara habitatını bu sınırlı faktörlere dayanıklı ve/veya adapte olmuş canlılar oluşturmaktadır (Sarbu vd., 1996; Yamaç, 2008; Barış, 2009). Besin maddelerinin kıtlığı birçok mağarada önemli sınırlayıcı faktörlerdendir (Sarbu vd., 1996). Kimyasal olarak kompleks yapıda sınırlı besin maddesinin mağara sistemine girmesine rağmen az sayıda mikrobiyal tür büyümeyi desteklemek için gerekli tüm alımları ve katabolik reaksiyonları kodlayabilmektedir. Buna ek olarak bu şartlarda yaşamak, biyofilm topluluklarında kaynak olarak rekabet yerine ortaklıklara bağlı olarak mümkün olmaktadır (Barton ve Jurado, 2007).

Mağaralarda ışık penetrasyonu ve yoğunluğuna bağlı olarak; (i) tam güneş ışığına maruz kalan ve günlük ışık döngüsünü deneyimleyen giriş bölgesi; (ii) alacakaranlık bölgesi ve (iii) ışığın girmediği karanlık bölge olmak üzere üç ana bölge bulunmaktadır (Şekil 2. 2). Bu doğal habitatlarda, ototrofik aktivite, enerji girişinin kaynağı olarak ışığın hala mevcut olduğu giriş bölgesinde gözlemlenebilmektedir. Işık azalınca ototrofik bir yaşam tarzı giderek daha az sıklaşır. Böylelikle, avcılar, oligotroflar ve yırtıcılar da dahil olmak üzere heterotrofların derinliği, mevcut enerji kaynağı ve miktarı nedeniyle bulunabilir. 2 mg / L'den az toplam organik karbon içeren

herhangi bir ortam oligotrofik olarak kabul edilir. Mağaralar yaygın olarak çözünmüş organik karbon (DOC) formunda organik karbon alırlar. Yüzeydeki toprak kaynaklı ekosistemlerden kaynaklanan alloktan girişinin sonucu olarak DOC derinliğine ve yüzeye olan bağlantısına ve yakınlığına bağlı olacaktır (Barton ve Engel, 2015).



Şekil 2. 2. Mağaralarda ışık maruziyetine bağlı olarak oluşan bölgeler (Lee vd., 2012)

#### 2.4. Mağaralardaki Mikrobiyal Biyoçeşitlilik

Arkealar, bakteriler, mayalar, mantarlar ve algleri içeren mikroorganizmalar grubu mağaralarda oldukça yaygındır (Saiz-Jimenez 2001; Schabereiter-Gurtner vd., 2002). Mikrobiyal toplulukların oluşumu ve yapısı; pH, besin maddelerinin durumu, ışık, oksijen, kükürt ve diğer metallerin bileşenleri, nem ve yüzey kolonizasyonuna dayanıklılık gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.

Mağaralarda mikrobiyal aktivite ince kalsit tortuları ya da kayaç yüzeylerindeki değişimler olarak açıkça görülebilir. Bu özelliklerin saptanması mağarada mikrobiyal aktivitenin varlığına delil olarak gösterilebilir (Şekil 2. 3).

**Yüzeylerdeki Noktalar:** Abiyotik mineral tortular yüzeylerde nokta görünümüne neden olmaktadır. Genellikle şartlar uygun olduğunda mikroorganizmalar büyüyerek gözle görülecek büyüklükte koloniler oluşturur. Bu koloniler şekil olarak

petri kutusundaki kolonilere benzer ve her biri milyonlarca mikroorganizma içerir. Bu tip koloniler özellikle suların sızdığı alanlarda açıkça görülür.

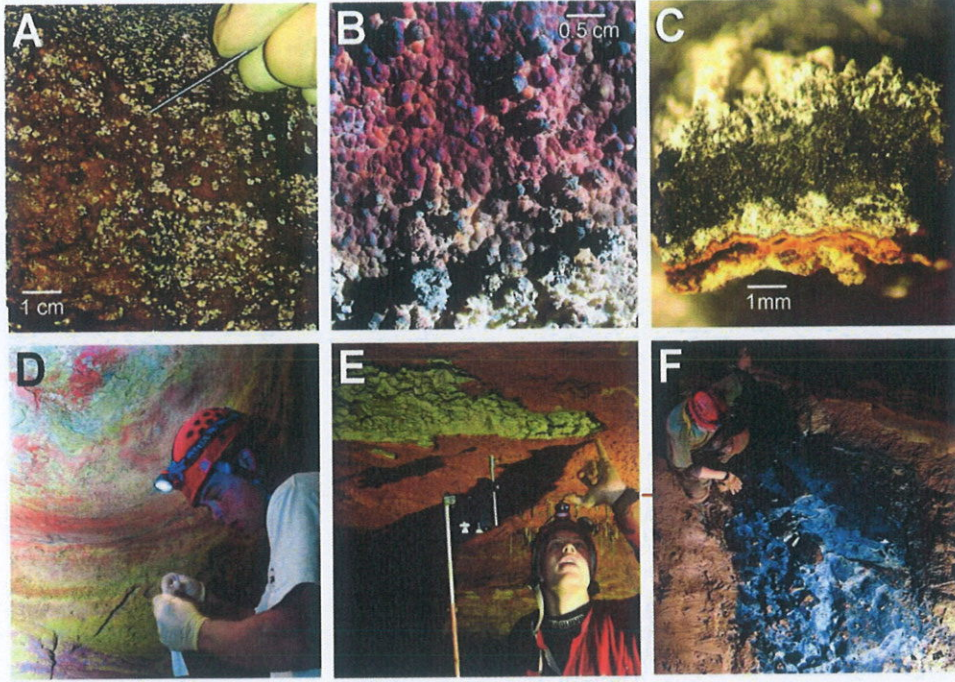
**Olağandışı Renklenme:** Mikroorganizmalar yüzeylerde büyüdüğünde yüzey alanının kimyasını değiştirebilirler ve kayalarda renk değişikliğine neden olurlar. Mağaralarda görülen kırmızı/ siyah kalıntılar bu durumun bilinen örnekleridir. Bu renk mekanizması bölgenin kimyası ve mikrobiyal aktiviteye göre bölgeden bölgeye değişebilmektedir.

**Çökeltiler:** Mikroorganizmalar kimyasal gradientleri kullanarak enerji üretirler. Bu gradientler mikroorganizmaların çevresel koşullarını değiştirebilir ve minerallerin kimyasal özelliklerinde değişime yol açar. Demir ve mangan oksit gibi mineraller bu değişime neden olur ve çökelmelere yol açar. Bu mikrobiyal aracılı çöktürme sonucunda yüzeylerde mineral bantlı katmanlar oluşur.

**Korozyon Artıkları:** Kireçtaşı, dolomit ve minerallerle birlikte mikrobiyal etkileşimin sonucu olarak korozyon artıkları ortaya çıkmaktadır. Bu oluşumun mekanizması araştırmacılar tarafından henüz tam olarak açıklanmamıştır. Mikrobiyal metabolik aktivitenin kayalardaki çözünme ile ilgili olduğu varsayılmaktadır. Enerji oluşumunun ise sürekli mineral dönüşümü ve çökelmelerin neden olduğu kimyasal gradientlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Korozyon artıkları mağara ortamlarında jeomikrobiyal aktiviteyi sağlamak ve besin yoksunluğu olan ortamlarda enerji oluşumunu sağlamada yararlı olmaktadır (Barton vd., 2005).

**Yapısal Değişiklikler:** Mikroorganizmalar kayalarla etkileşime girdiği zaman kayalarda kimyasal değişikliklere neden olabilirler. Bu değişiklikler ince yapısal değişikliklerin sonucu olarak korozyon artıkları ile görülen parlak renk değişikliklerinden farklı olabilir. Bu oluşum mikrobiyal enerjinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır.

**Biyofilmler:** Mağaralarda mikrobiyal aktivitenin en açık işaretlerinden biri biyofilmlerin varlığıdır. Bu tabakalar mikrobiyal komüniteleri içermektedir. Jel benzeri yapılarla birlikte yapışkan tampon, kaygan su altı tabaka ve kıl benzeri dallar gibi bazı yapıları da kapsamaktadır. Biyofilmler enerji girişi olan yerlerde sık görülmektedir ve mağara yaşamında enerji kaynaklarını destekleyen önemli bir kanıttır (Angert vd., 1998).



**Şekil 2. 3:** Mağaralarda Mikrobiyal Aktivite A) Noktalar- Kaya yüzeyindeki mikrobiyal kolonilerin hipodermik iğne ile örneklenmesi B)Renk- Kaya yüzeyinde renklenmeye neden olan mikrobiyal aktivite C) Çökeltiler- Kaya yüzeylerinde mikrobiyal aktivite ile oluşan bantlı mineralizasyon D) Korozyon Artıkları- Bir mağara tavanında oluşmuş parlak renkli korozyon kalıntısı E) Yapısal Değişiklikler- Yumuşak mağara tavanlarındaki kimyasal gradientlerin incelenmesi F) Biyofilmler- Mağara akarsularında görülen beyaz biyofilm kaplamaları (Barton, 2006)

#### 2.4.1. Bakteriyel Biyoçeşitlilik

Bu güne kadar mağaralarda mikrobiyal ekoloji üzerine yapılan birçok çalışmada bakteriyel çeşitlilik vurgulanmıştır. Bu çalışmalar ağırlıklı olarak mağaranın duvarlarında ve tavanlarında, sudaki sedimentlerde ve speleoterm yüzeylerinde bulunan çökeltilere odaklanmıştır. Mikrobiyal kültürlerle dayanan mağaralarda yapılan çalışmalar öncelikle *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Firmicutes* gruplarının baskın olduğunu göstermiştir (Barton vd., 2015). Lee vd., (2012) tarafından mağaradaki mikroorganizmaların 16S rRNA filogenetik analizi ortaya konmuştur. Bu sonuçlara dayanarak *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* ve *Chloroflexi* en yaygın bakteriyel sınıflar olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, bu sonuçlar her mağaranın özelliklerine göre değişebilmektedir. *Gammaproteobacteria* ve *Acidobacteria* ABD'de Wind Mağarasında baskın iken, *Gammaproteobacteria* ve *Epsilonproteobacteria* sulfidik mağara biyofilminde baskındır (Chelius ve Moore, 2004, Engel, 2010). Zhou

vd., (2007); Avustralya, Çin, İspanya ve ABD'deki mağaraları karşılaştırmış ve *Proteobacteria*'nın İspanya ve Çin mağaralarında baskın grup olduğunu ve *Acidobacteria*'nın ikinci baskın grup olduğunu bildirmiştir. Ferromanganez çökeltileri mezofilik *Crenarchaeota* ve *Euryarchaeota*'yı kapsayan bazı arkea gruplarını içermektedir ve bu arkea grubunun farklı çalışmalarda kaydedildiği bildirilmiştir (Northup vd., 2003). Farklı ülkelerdeki turistik mağaralarda yer alan mantarların jeomikrobiyolojisi üzerine yapılan çalışmalar, *Ascomycota*'nın hem kültüre bağımlı hem de kültürden bağımsız çalışmalarda baskın bir grup olduğunu göstermiştir (Docampo vd., 2010).

Günümüze kadar tamamlanan çalışmaların çoğu bakteri çeşitliliğini aydınlatmak için kültüre dayalı veya metagenomik yaklaşımlar uygulamıştır. Örneğin, 2014'te Vlikonja ve diğerleri tarafından Sloven karstik bir mağarada kültüre dayalı bir çalışma yapılmıştır (Barton ve Jurado, 2007). Mikrobiyal izolatların 16S rRNA gen profillemesini kullanarak incelenen 80 bakteri izolatının çoğunluğunun *Streptomyces* (% 25), *Micrococcus* (% 16) ve *Rhodococcus* (% 10) ' tan oluştuğu tespit edilmiştir. Diğer kültüre edilebilir bakteriler *Microbacter*, *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Oerskovia*, *Bacillus*, *Okskovia* ve *Oroskovia* olmak üzere *Pseudomonas* (% 9), *Agrobacterium* (% 8), *Lysobacter* (% 6) ve *Paenibacillus*, *Sphingomonas*, *Aerococcus* ve *Bosea* düşük oranda tespit edilmiştir.

Bir başka çalışmada, İspanya, Çek Cumhuriyeti ve Slovenya'da bulunan üç karstik mağaradaki mikrobiyal topluluklar analiz edilmiştir. Bu üç mağaradan elde edilen metagenomik DNA'dan 424 adet 16S rRNA gen klonu hazırlanmıştır. İstatistiksel analizde *Pseudonocardinae* (30–50%), c-Proteobacterial Chromatiales (6–25%) ve *Xanthomonadales* (0. 5–2. 0%) varlığı saptanmıştır. Sekansların% 7'si üç örnekleme alanında ortak, kalan % 35'i alana özgüdür. Bu bulgular, benzer phylotiplere ait mikrobik toplulukları barındıran farklı kireç taşı mağaralarında yapılan daha önceki çalışmaların sonuçlarına benzemektedir (Castainer vd., 1999).

Kartchner mağaralarında, 10 mağara üzerine inceleme yapılmıştır ve sonuç olarak *Actinobacteria*, *Proteobacteria* ve *Acidobacteria* olmak üzere 3 farklı taksonomik profil ortaya çıkarılmıştır.

İlginçtir ki, yapılan çalışmalarda daha düşük çeşitlilikte mikrobik toplulukları sergileyen örnekleme noktaları *Actinobacteria* tarafından baskın iken, daha çeşitli

topluluklarda Proteobakteriler egemen olduğu görülmektedir. Ayrıca, Kartchner Mağaralarındaki örneklerin 16S klon kütüphanesi profillemesi, bakteriyel popülasyona hakim olan *Actinobacteria*'yı ortaya çıkarmıştır; bunların% 99'u kemoototrof ve oligotroflardır (Ortiz vd., 2013;Wu vd., 2015).

Benzer şekilde, Çin 'deki Jinjia Mağaralarının Kaya duvarı tortularında, su sedimentlerinde ve bataklık topraklarında bakteri varlığının incelenmesi hem *Proteobacteria* hem de *Actinobacteria* varlığını ortaya koymuştur (Wu vd., 2015). Bu iki çalışma (Kartchner ve Jinjia mağaraları) farklı coğrafi bölgelerde olmasına rağmen (Doğu Kuzey Amerika ve Doğu Asya) mikrobiyal toplulukların benzer olduğunu ortaya çıkarmıştır. Riquelme vd., 2015 volkanik mağaralarda (Azores, Portekiz, Hawaii ve New Mexico, ABD'deki iki adadan) yaptıkları çalışmada volkanik mağaraların bilinmeyen *Actinobacteria*'lar için zengin bir rezervuar olduğunu ortaya çıkarmıştır (Riquelme vd., 2015).

Erzurum'da Elmalı ve Yıldızkaya Mağara Sistemlerinde damlataş oluşumuna katkıda bulunan bakterilerin karakterizasyon ve tanımlaması yapılmıştır (Barış, 2009). Yücel ve Yamaç (2010), 19 farklı mağaradan izole edilen *Streptomyces* spp.'nin antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. İn vitro olarak Düz kır Mağarası'ndan (Aladağlar) izole edilen bakteriyel örneklerin antimikrobiyal aktivitelerini, statin-üretme kabiliyetlerini ve sitotoksik etkilerini araştırılmış, farelerde in vitro ve in vivo olarak test edilmiştir (Şen vd., 2011).

#### **2.4.2. Arkea Biyoçeşitliliği**

Arkea üyelerinin mağaraların kronik enerji stresine iyi adapte oldukları ve besin döngüsüne katkıda bulunarak besin değeri düşük mağara ekosistemlerinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Arkealar çok uzun süre yalnız ekstrem koşullara atfedilmiştir (Woese vd., 1990). Bununla birlikte, yapılan çalışmalar mağaralarda ve diğer ekosistemlerde ve çeşitli toprak numunelerinde Arkea varlığını ortaya koymuştur (DeLong, 1998). Bu grupta belirlenen mikroorganizmalar aerobik, fakültatif veya tamamen anaerobik, kemotitrofik, kemoheterotrofik, asidofilik, termofilik veya halofilik olabilir. Bu organizmaların çoğu kükürtü metabolize edebilmektedir (Cavicchioli vd., 2011).

Bu özelliklerden dolayı, arkealar küresel karbon ve azot döngülerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bugüne kadar *Crenarchaeota* ve *Euryarchaeota*, arkealar içindeki en önemli gruplardır.

Mağara sistemlerinde Arkeaların bulunuşu hakkında çok az bilgi vardır. Sıklıkla tespit edilen arkealar *Crenarchaeota* ve *Euryarchaeota*'ya aittir. Movile Mağarası'ndan (Chen vd., 2009) ve Wind Mağarası sedimentlerinden Chelius'un 16S rRNA gen kütüphanesinde, her iki türden 16S rRNA dizileri bulunmuştur. Frasassi mağara sistemine ait düşük pH içere (pH 0-1, Grotta del Fiume) başka bir mağarada bir grup Archaea mikroorganizması tanımlanmıştır ve snottitler içerisinde tanımlanan mikroorganizmaların% 40'ını oluşturduğu tespit edilmiştir (Macalady vd., 2007). Bu mağarada *Crenarchaeota*'dan herhangi bir temsilci bulunamamıştır ve popülasyonda ağırlıklı olarak azaltılmış sülfür bileşiklerini oksitleyebilen Ferroplasma cinsinin hakim olduğu görülmüştür (Tyson vd., 2004). Asidik ortamlarda yapılan çalışmalar pH ve Ferroplasma'nın egemenliği arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Golyshina ve Timmis 2005). Buna ek olarak, Yellowstone'daki asidik sular ve sıcak su akımlarından gelen arkealar ile filogenetik olarak ilişkilendirilen bu popülasyonda ve diğer arkalarda *Thermoplasma* organizmaları bulunmuştur. Son yıllarda Altamira Mağarası'nda, yeni bir psikrofilik *Crenarchaeota* mikroorganizması saptanmıştır. Lechuguilla Mağarası'nda *Crenarchaeota*'ya ait 51 dizi, *Euryarchaeota*'ya ait 5 dizi, mezofilik *Crenarchaeota* ve *Euryarchaeota* tanımlanmıştır (Northup vd., 2003).

#### 2.4.3. Fungal Biyoçeşitlilik

Mağara ortamlarında mantarlar çoğunlukla kayalardan, mağaranın sedimentlerinden, yarasa guanosundan, mağara yüzeylerinden ve havadan izole edilmektedir. Çalışmaların çoğunda, kanıtlar Ascomycota'nın diğer şubelerden daha fazla tespit edildiğini ortaya koymaktadır. Çoğu mağara örneğinde *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* ve *Fusarium* cinslerinin hakim olduğu bilinmektedir (Man vd., 2005; Nováková, 2009). Son zamanlarda incelenen Kuzey Amerika mağaralarının çoğunda *Pseudogymnoascus destructans* türü mantar tespit edilmiştir. Bu mantarın, White Nose Sendromu olarak adlandırılan ölümcül yarasa enfeksiyonunun etken ajanı olduğu bilinmektedir. Mağara ortamlarında tespit edilen mantar taksonlarının çoğu saprofitlerdir; çoğunun karst yüzeyinde yaşadığı ve bozunan

organik maddeleri kolonize ederek oligotrofik mağara mantarlarının büyümesini engellediği bilinmektedir (Northup ve Lavoie, 2015).

#### 2.4.4. Biyofilm Çeşitliliği

Biyofilmlerin oluşumu, mikrobiyal toplulukların mağaralarda karşılaşılan ekstrem çevre stresi ile baş etme yollarından biridir. Jones vd. 2012'de İtalya'daki sülfid bakımından zengin Frasassi mağara sisteminin duvarlarından "snotit" olarak adlandırılan oldukça asitli (pH 0-1) biyofilmlerin yapısını ve işlevselliğini araştırmıştır. Snotitlerin 16S rRNA geni klonlanmış kütüphanesi, *Acidithiobacillusthiooxidans*'ın dominant (>% 70) bakterisi, bunu takiben *Thermoplasmatales* (>% 15) ve *Acidimicrobiaceae* familyasındaki bir bakterisi (>% 5) olduğunu ortaya koymuştur.

Birkaç çalışma, minerallerle ilişkili ve belirli türlerde mağara yapıları ile ilişkili mikrobiyal toplulukları tanımlamış ve bu mikrobiyal toplulukların mağara çökeltileri oluşumunda rol oynayabileceğini ileri sürmüştür. Örneğin, Kuzey İsveç'te yer alan Tjuj-Ant Mağarası'nda yürütülen bir çalışma (Sallstedt vd., 2014), iki tür mağara çökeltisi barındırır: (1) kangaloid, (patlamış mısır yapıları) ve (2) flowstone (ince yapılar). İnce yapılar Actinobacteria benzeri biyofilmler ve mantar toplulukları olmak üzere iki tip mikrobiyal topluluk barındırmaktadır. Meksika Villa Buz Mağarası'nda da biyofilm oluşumuna rastlanmıştır (Şekil 2. 4). Bu mikrobiyal topluluklar mağara oluşumlarında önemli bir rol oynamaktadır ve bu nedenle mikroorganizma-mineral etkileşimlerindeki farklılıkları incelemek için bir model sunmaktadır.





Şekil 2. 4. Meksika Villa Luz Mağarasında biyofilm oluşumu (Lavoie vd., 2006)

#### 2.4.5. Mağaralardaki Patojenik Mikroorganizmalar

Çeşitli mağaralarda bulunan ve izole edilen patojenler (*Aurantimonas*, *Legionella*, *Staphylococcus*, *Inquilinus*, *Afipia*, vb.) özellikle insanlar için risk oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bu mikroorganizmaların virülans seviyeleri, aynı türlerin suşları içinde farklılık göstermektedir. Bu, türün izole edildiği ekolojik nişin özellikleri ile ilişkili olabilir ve mikroorganizmaya farklı patojenite faktörlerini kazandırabilir veya geliştirebilir.

Mağaralarda patojenlerin bulunup bulunmadığının yanı sıra, patojenlerin kültür temelli yöntemleri kullanarak ve kantitatif PCR ile ölçülmek önemlidir. Öte yandan, mağaralarda izole edilen patojen suşların bulaşıcı kapasitesi hakkında bilgi edinmek, virülans kapasitelerini direk PCR yöntemleri ile virülans genlerini işaretleyiciler olarak incelemek ve diğer konak etkileşim testleri ile incelemek yerinde olacaktır. Mağaralarda insan varlığına bağlı olarak, insandan mağaraya, birçok farklı patojenik seviyeye sahip yeni bakteri hatlarının gelişmesine yol açabilecek bir bakteri geçişinde yüksek bir risk vardır. Bu fenomen, Lavoie ve Northup (2006) tarafından önerilen insan indikatör bakterilerinin ölçülmesi ile değerlendirilebilir. Öte yandan, suşlar değiştirildikten sonra (insandan mağaraya veya tam tersine) adaptif faktörler; transkriptom ve karşılaştırmalı genomik çalışmalarla tanınabilir.

Sık ziyaret edilen veya hayvanların bulunduğu mağaralar patojenik mikroorganizmaların rezervuarlarıdır. Son yıllarda, mağaralarda yaşayan bazı bakteri, mantar ve virüslerin insanlarda ve hayvanlarda patojen olduğu bildirilmiştir. Özellikle tropikal bölgelerde bu tehlike daha fazladır. Belirli bir enfeksiyonu tek bir ziyaretle ilişkilendirmek zor olsa da, birçok tıbbi rapor, Afrika'daki mağaralarda yapılan ziyaretlerin ve madencilik faaliyetlerinin hastalık ve ölümcül kayıplar ile sonuçlandığını göstermektedir. Mağara mikroorganizmaları tarafından üretilen en sık görülen hastalıkların solunum sisteminde bulunduğu bilinmektedir.

## **2.5. Mağaralardaki Metabolik Çeşitlilik**

Mağaralarda ışık yokluğu nedeniyle genellikle kısıtlı kaynak bulunmaktadır. Bu durum birincil organik madde üretimini engellemektedir (Poulson ve Lavoie 2000). Bununla birlikte, fiziksel parametreler stabil olma eğilimindedir. Bir mağarada giriş bölgesi ile başlayan bölge ışık ve sıcaklık koşullarından güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Daha derinde, sınırlı ışığın nüfuz ettiği ve yüzey koşullarının olduğu bir alacakaranlık bölgesi bulunmaktadır. Derin bölgelerde ışık yokluğu, yüksek nem (~% 99) ve alan için ortalama yıllık yüzey sıcaklığı düzeyinde sıcaklık (MAST) görülmektedir. Mağara sistemlerinde mevcut olan organik karbon seviyesi, yüzeysel ortamlara kıyasla 1000 kat daha düşük olabilmektedir (Morita, 1997, Barton vd., 2007). Bu tür besin sınırlamalarının üstesinden gelmek için, mağara mikrobiyal ekosistemleri, bu sistemlere sızan çok az miktarda enerji girdisinden yararlanmak için oligotrofik enerji kazanım sistemleri geliştirebilmektedir (Barton ve Jurado 2007).

Bununla birlikte, herhangi bir enerji girdisi sistemine dayanmayan mağara sistemleri de tanımlanmıştır. Bu sistemler alternatif olarak sülfidik mağara sistemleri durumundadır ve sadece kemoototrofik üretim görülmektedir (Engel, 2007). Buna karşılık, bu sülfidik sistemler, organizmalar için toksik gazlar ve asidik koşullar gibi yeni çevresel stres koşulları barındırmaktadır (Spear vd., 2007).

### **2.5.1. Mağaralarda Enerji Akışı ve Redoks Reaksiyonları**

Mikrobiyal yaşam, organik moleküllerin fonksiyon gösterebileceği ve termodinamik açıdan uygun enerji girdisinin bulunduğu tüm yaşam alanlarını kolonize edebilmektedir. 1990 yılından önce, mağara mikrobiyolojisi üzerine yapılan çalışmaların çoğu, mikroorganizmaların tanımlanması üzerinde yoğunlaşmıştır ve

organizmaların redoks ortamları ile olan ilişkisi sınırlı olarak kaydedilmiştir (Barton ve Northup, 2007). Mağaralar, mikroorganizmaların büyümesini desteklemek için indirgenmiş bileşikler şeklinde çok az oksitlenmiş ortamlar olarak bilinmektedir (Brooke, 1996). Ayrıca, araştırmalar mağaralardaki mikroorganizmaların redoks gradyanları ile çeşitli ortamlardan yararlandığını göstermektedir (bkz. Sasowsky ve Palmer 1994'teki makaleleri ve Jeomikrobiyoloji Dergisi, Ağustos 2001, Mağaraların Jeomikrobiyolojisi hakkındaki özel sayısı).

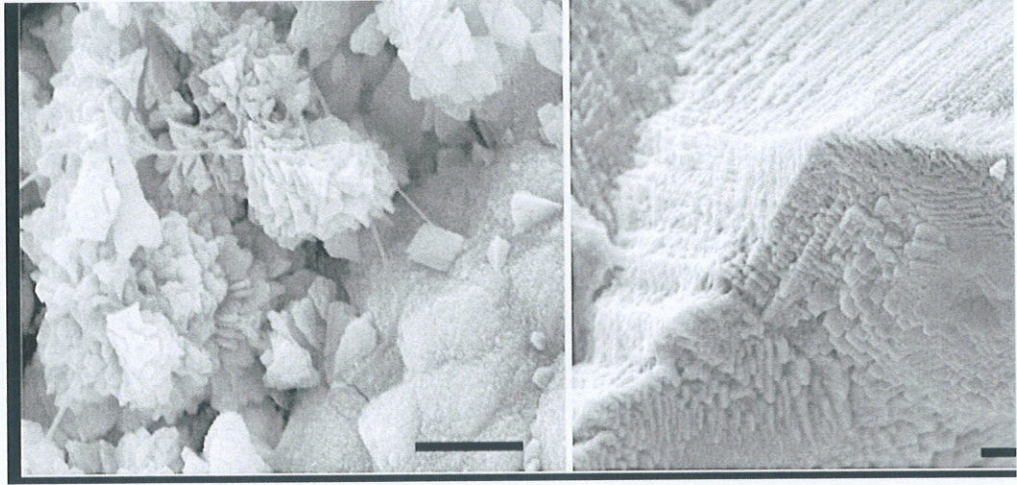
Ana kaya ve mağara pasajları arasında yaşayan mikroorganizmalar enerji üretimi için ana kayadaki kireçtaşları, manganez, bazalt, indirgenmiş kükürt kaynakları gibi indirgenmiş bileşiklerden yararlanmaktadır. Demir, kükürt ve manganez kullanan kemolitrotfik mikroorganizmaların verimliliği genellikle mağaralarda sınırlı bir öneme sahip olarak kabul edilmiştir (Caumartin, 1963; Barr, 1968; Jones ve Motyka 1987), ancak son çalışmalar bazı mağaralarda besin tabanına katkılarının önemli olabileceğini göstermektedir. Jeolojik ortamın kimyasal heterojenliği ile redoks ilişkileri çoğu zaman karmaşıktır ve birbiriyle ilişkilidir ve bileşiklerin gradyanlarının olduğu sınırlarda ya da redoks arayüzlerinde birçok mikroorganizma yaşamaktadır. Bu tür sistemlerin enerjilerini incelemek için, kararlı izotop oranları mikroorganizmaların mağara besin zincirine katkısının ve ikincil mineral kaynaklarının üretiminde rollerinin belirlenmesinde etkili olmaktadır (Sarbu vd., 1996, Hose vd., 2000).

### **2.5.2. Mağaralarda Mikroorganizma – Mineral Etkileşimleri**

Mikroorganizmalar, çözünme yoluyla mağaraların oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Mikrobiyal olarak etkilenmiş mineral yüzeylerin çözünmesi veya aşınması; mekanik ataklar, ekzoenzimlerin salgılanması, organik ve mineral asitler (örneğin sülfürik asit) ve diğer çeşitli mekanizmalar yoluyla meydana gelmektedir (Sand, 1997; Jones, 2001; Bullen vd., 2008). Mağara çözünme süreçlerinde özellikle ilgi kükürt, demir ve mangan oksitleyici bakterileri içeren reaksiyonlar öne çıkmaktadır. Bu mikrobiyal aracılı reaksiyonlar, mağara duvarlarını veya sarkıt ve diktleri çözebilen asidik ortamlar oluşturabilir. Laboratuvar incelemeleri, kalsiyum karbonatın bakteriler arasında çökeltme kabiliyetinin yaygın olduğunu göstermektedir (Boquet vd., 1973). Ayrıca mağaralardan izole edilen bakterilerin çökeltmede daha etkili olduğu bilinmektedir (Danielli ve Edington, 1983; Engel vd., 2001). Bununla birlikte, lipidler

ve fosfolipitler gibi bazı mikrobiyal yapılar ve damlama sularından (Saiz-Jimenez ve Hermosin, 1999) mağaralara giren topraklardaki hümik asitler, kalsit çökmesini engellemektedir.

Çözölmeye ek olarak, çeşitli mineraller, biyolojik olarak kontrollü mineralizasyon (doğrudan veya enzimatik) veya biyolojik olarak uyarılmış mineralizasyon (dolaylı veya pasif) yoluyla bakteriyel hücre yüzeyleri üzerinde çökeltmektedir (Lowenstam ve Weiner 1989; Banfield ve Nealson 1997; Konhauser, 1997; Woods vd., 1999, Neuweiler vd. 2000, Bosak ve Newman 2005). Bağlanmış metaller (demir gibi) kimyasal etkileşimlere yer açar, aktivasyon enerji bariyerlerini azaltır ve kristal büyümesi için çekirdeklenme alanları olarak hizmet eder. Ayrıca, mikroorganizmaların metabolik aktivitesi de lokal pH'ı değiştirmekte ve çeşitli minerallerin çökmesine yol açabilmektedir. Mağaralarda, biyolojik olarak kontrol edilen bu mineralizasyon, karbonatlar, silikatlar, killer, demir ve manganez oksitleri, kükürt ve nitratlar dahil olmak üzere birçok mineralin oluşumunda rol oynamaktadır (Şekil 2.5.).



**Şekil 2. 5.** Boquet B-4 Ortamında Bakteriler Tarafından Oluşturulan Kalsit Kristallerinin Elektron Mikrograflarının Taranması (Boquet vd., 1973)

## 2.6. Mağara Mikroorganizmalarının Biyoteknolojik Potansiyelleri

Mağara mikroorganizmaları, çeşitli biyoteknolojik çalışmaları destekleme potansiyeline sahiptir. Örneğin, mağaralar antibiyotik keşifleri ve antibiyotik direncini anlamak için önemli çalışma ortamlarıdır. Mikroorganizmaların sahip olduğu

antibiyotik dirençli genler, antibiyotik direncinin gelişimini anlamak için önemli sonuçlar sağlayacaktır (Knopp vd., 2010).

Mağaralar gibi keşfedilmemiş ortamlar, mikroorganizmaların birbirlerine karşı antimikrobiyal maddeler ürettiği, sınırlı besin içeriğinden kaynaklı olarak çevrede artan rekabet nedeniyle yeni antimikrobiyal maddeleri araştırmak için önemli bir potansiyele sahiptir (Northup ve Lavoie, 2001).

Mağara mikroorganizmalarının özellikle düşük sıcaklık derecelerinde aktif enzimleri; gıda endüstrisi, temizlik endüstrisi, deterjan ve biyositler gibi temizlik ajanları, moleküler biyoloji çalışmaları ve biyoteknoloji açısından önemlidir, çünkü bu ortamlar yıl boyunca sabit hava sıcaklığına sahiptir. Bu nedenle, soğuk ortam özelliklerine rağmen, mikroorganizmalar tarafından enzim üretimi desteklenmektedir (Cabeza vd., 2011; Russel, 1998).

#### **2.6.1. Yeni Antibiyotik Üreten Bakterilerin Kaynağı Olarak Mağaralar**

Antimikrobiyal ajanlar mikroorganizmaları öldüren ya da onların büyümesini engelleyen kimyasal maddelerdir (Cushnie ve Lamb, 2005). Bu terim antibakteriyel, antifungal, antiparaziter ve antiviral bileşenleri kapsamaktadır (Kujumgiev vd. 1999). Çoğu modern antibiyotik 1945 ve 1960 yılları arasında “Antibiyotik Keşfinin Altın Çağı” olarak bilinen dönemde keşfedilmiştir. Gram pozitif ve negatifleri içeren çeşitli patojenlere karşı etkili antibiyotiklerin çoğu bu dönemde tanımlanmıştır (Spector vd., 2012).

Mağaralar doğadaki eşsiz, keşfedilmemiş ve hakkında az çalışma mevcut olan ortamlardır (Cheeptham, 2013; Gabriel ve Northup, 2013). Bu ortamlar, son derece özelleşmiş mikroorganizmaların yaşayabildiği ve yeni biyoaktif bileşikler üretebilme potansiyeli taşıyan yeni mikroorganizmaların keşfi için cazip yerler haline gelmiştir. Yeni biyoaktif türlerin taranması, yeni prokaryotik türlerin eşsiz biyoaktif bileşikler içerebileceği hipotezine dayanmaktadır. Bu olgu taksonomik çeşitliliğin kimyasal çeşitlilik ile ilişkili olduğu anlamına gelmektedir (Goodfellow ve Fiedler, 2010). Tablo 2.1’de çeşitli mağaralardan izole edilen ve tanımlanan potansiyel antibiyotik üreticileri gösterilmiştir (Gabriel ve Northup, 2013). Lee vd. (2000) tarafından Kore’ de yapılan çalışmada toplanan toprak örneklerinde *Saccharothrix* ve *Saccharothrix violacea* cinsine ait yeni türler keşfetmiştir. Lee (2006), Kore’ deki doğal bir mağarada bakterilerin

biyoçeşitliliği üzerine araştırma yapmış ve yeni bir aktinomiset olan *Nocardia jejuensis* sp.'i keşfetmiştir. Cheng vd. (2013) Çin' deki antik bir mağaradan *Microlunatus cavernae* sp.'i keşfetmiştir. Margesin vd. (2004) bir alp buz mağarasında *Arthrobacter* cinsine ait yeni türler kaydetmiştir. Bu mikroorganizmalar çok çeşitli mağaralarda dağılım göstermektedir.

Aktinomisetler, ikincil metabolit üretiminde en çok kullanılan bakterileri içermektedir. Volkanik bir mağaradan izole edilen *Streptomyces* cinsinin yüksek oranda ikincil metabolitlere sahip olduğu bildirilmiştir (Kay vd., 2013; Cheeptham, 2013).

**Tablo 2. 1.** Bazı mağaralardan izole edilen antibiyotik üretme potansiyeline sahip mikroorganizmalar (Cheeptham, 2013)

Mağara Lokasyonu	Bulunan Mikroorganizmalar
Altamira ve Tito Bustillo mağarası, Kuzey İspanya	<i>Streptomyces</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Rhodococcus</i> , <i>Nocardioides</i> ve <i>Amycolatopsis</i> .
Cesspool mağarası, Virginia, Amerika Birleşik Devletleri	<i>Thiothrix</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Thiovulum</i>
Basaltic sea caves, Kauai Hawaii, Amerika Birleşik Devletleri	Bacteria ve Cyanobacteria suşları
Japonya'daki çeşitli mağaralar (20 kireç taşı mağarası ve volkanik mağara)	<i>Trichosporon</i> türleri, <i>Candida palmioleophila</i> , <i>Clusitaniae</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> ve <i>Hanseniaspora</i> sp.
Portekiz, Hawaii ve New Mexico'daki lav mağaraları	<i>Bacteroidetes</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>Nitrospirae</i> ve <i>Verrucomicrobia</i>
Buracos mağarası, Terceira adası, Portekiz	Genellikle <i>Proteobacteria</i> ve <i>Actinobacteria</i> ; <i>Gallionella</i> sp. ve <i>Leptothrix</i> sp. SEM ile gözlenmiştir fakat diğer teknikler ile belirlenememiştir.

### 2.6.2. Antibiyotik Direnç Gen Rezervuarları Olarak Mağaralar

Direnç; bakterilerin antimikrobiyal bir ajanın öldürme ya da üremeyi durdurma etkisine karşı koyabilmesidir (Tenover ve Hugles, 1996). Direnç antibiyotiğin kendisi ve direnç genleri olmak üzere iki faktörün sonucu olarak gelişmektedir. Antibiyotik

direnci, hedef değişikliği, ilaç alımı ve atılımının kontrolü ve yüksek oranda verimli enzim aracılı inaktivasyon dahil olmak üzere birçok farklı mekanizma ile kendini göstermektedir (Tablo 2.2). Direnç, hedef genlerdeki bazı mutasyonlarda nispeten hızlı bir şekilde ortaya çıkabilir ve antibiyotiklerin bu tür mutasyonları desteklediğine dair kanıtlar vardır. Bununla birlikte, çoğu antibiyotiğe karşı direnç, son derece etkili enzimlerin aracılığıyla gerçekleşir. Bu unsurlar doğal seleksiyon yoluyla evrimin sonucudur. Bu nedenle, antibiyotik direncinin uzun bir evrimsel geçmişe sahip olduğu ortaya çıktığı düşünölmektedir (Yücel ve Yamaç,2010; Cheeptham vd., 2013; Rajput vd., 2012; Stankovic vd., 2012).

**Tablo 2. 2.** Antibiyotik ana sınıflarının hedefleri, direnç mekanizmaları ve etki biçimleri (Walsh, 2000)

Antibiyotik	Hedef	Etki biçimi	Direnç Mekanizması
<b>Hücre duvarını etkileyenler</b>			
$\beta$ -laktamlar	Transpeptidazlar / Transglikozilazlar	Peptidoglikan tabakasındaki çapraz bağ oluşumunu engeller	$\beta$ -laktamazlar, penisilin bağlayıcı protein mutantları
Vankomisin	Peptidoglikan ve lipid II' nin D-Ala-D-Ala ucu	peptidoglikan tabasının oluşumunda gerekli olan substratları uzaklaştırarak bağlanmasını engeller	Lipid II ucundaki D-Ala ucunda değişiklik
<b>Protein Sentezi</b>			
Eritromisin sınıfındaki makrolidler	Peptidiltransferaz, ribozomun merkezi	Protein sentezi engellenir	Ribozomal RNA' yı metiller, antibiyotiğin hücre dışına atılması
Tetrasiklinler	Peptidil transferaz	Protein sentezi engellenir	Antibiyotiğin

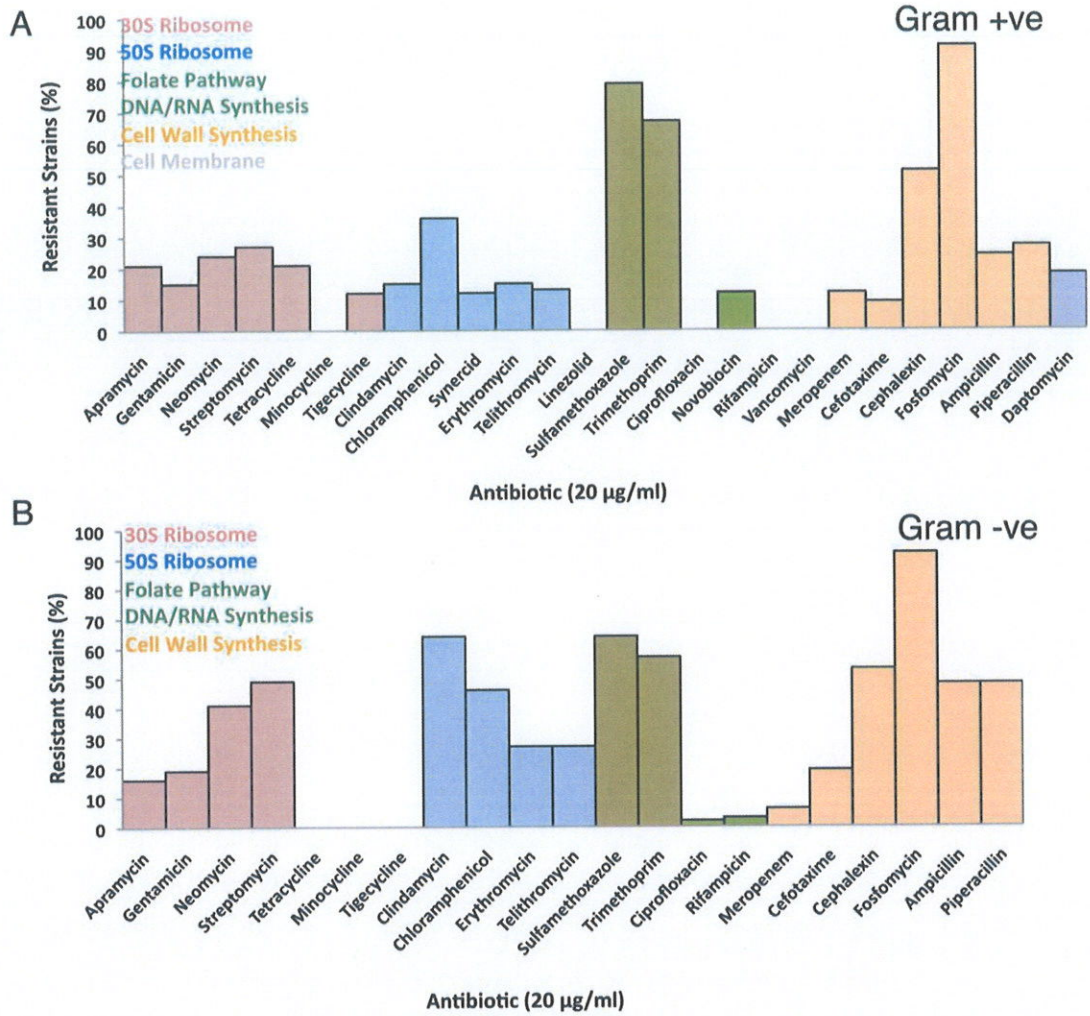
			hücre dışına atılması
Aminoglikozitler	Peptidil transferaz	Protein sentezi engellenir	Antibiyotiğin enzimleri ile modifiye edilmesi
Oksazolidinonlar	Peptidil transferaz	Protein sentezi engellenir	Etki şekli belirlenmemiştir
<b>DNA replikasyonu/tamiri</b>			
Florokinonlar	DNA giraz	DNA replikasyonu engellenir	DNA giraz enziminde yapısal değişiklik

Çok sayıda yeni araştırma, direnç genlerinin sıklıkla antibiyotik kullanımının artışıyla kaynaklandığını belirtmektedir (Levy, 2002; Davies, 2010; Bhullar, 2011). Bununla birlikte, diğer çalışmalar, insanların tedavi amacıyla antibiyotik kullanımından önce de bazı dirençli genlerin var olduğunu ileri sürmektedir (White, 2013). Hollanda’da antibiyotik öncesi ve sonrası dönemlerini (1940–2008) kapsayan toprak örnekleri üzerine yapılan bir araştırmada, antibiyotik öncesi dönem örneklerine kıyasla günümüze ait toprak örneklerinde majör antibiyotik aileleri ( $\beta$ -laktamlar, tetrasiklinler ve makrolidler) için antibiyotik direnç genleri taşıdığı gözlenmiştir (Knapp vd., 2010). Bu kanıt, yaygın direncin, antibiyotiklerin insan kullanımına bağlı olduğu hipotezi ile tutarlıdır.

Bilim adamları, farklı çevrelerden izole edilen bakterilerin direnç gen kaynaklarını tanımlamak için fonksiyonel çalışmalar gerçekleştirmişlerdir (White, 2013; Bhullar, 2011). Forsberg ve meslektaşları doğal ortamları, genlerin toprak bakterileri ve klinik patojenler arasında aktarılmasını sağlayan antibiyotik dirençli genlerin rezervuarları olarak tanımlamıştır. 2011’de Bhullar Meksika’da bulunan Lechuguilla mağarasından izole edilen mikroorganizmalar üzerine araştırma yapmıştır. Bu izole edilmiş mağarada yaşayan mikroorganizmaların 4-6 milyon yıl yüzey suyu ile



etkileşime girmesi muhtemel olmamakla birlikte günümüzde dahi bu mağaraya insan erişimi son derece sınırlıdır. Araştırma sonuçları mağara bakterilerinin doğal ortamlarında karşılaşma ihtimali olan, piyasada bulunan çeşitli antibiyotiklere karşı oldukça dirençli olduğunu göstermiştir (Şekil 2. 6). Evrim ve direnç yaygınlığını incelemedeki zorluklardan biri, antropojenik antibiyotiklerden etkilenmeyen tanımlayıcı ortamları zorlaştıran son yedi yıl içinde klinikte ve tarımda antibiyotiklerin yoğun kullanımınıdır. İnsan antibiyotik kullanımına maruz kalmamış, bozulmamış ortamlarda antibiyotik direnç çalışmaları, direnç gen prevalansı ve evrimin anlaşılması için gerekli olan direnç genetik çeşitliliğinin kritik bir ölçüsünü sağlamaktadır. Bununla birlikte antibiyotik direncinin antik mikrobiyal genler tarafından kodlanan doğal bir süreç olduğu ileri sürülmektedir (Hughes ve Datta, 1983; Barlow ve Hall, 2002; Bhullar, 2011).



**Şekil 2. 6.** Lechuguilla Mağarası'ndan izole edilen bakterilerin çeşitli antibiyotiklere karşı 20 mg/ml konsantrasyonda direnç seviyeleri. (üstte) Gram pozitif suşlar (altta) Gram negatif suşlar. Antibiyotikler, her bir rengin farklı bir hedefi temsil ettiği etki/hedef tarzlarına göre gruplandırılmıştır.

### 2.6.3. Yeni Enzimlerin Keşfinde Mağaralar

Enzimlerin çoğunluğu, mezofilik, nötrofilik mikroorganizmalar için normal kabul edilen fizyolojik koşullar veya koşullar altında performans gösterecek şekilde optimize edilmiştir. Bununla birlikte, "ekstremozimler" olarak adlandırılan belirli bir enzim grubu, aşırı-olmayan benzerleri ile aynı enzimsel fonksiyonları yerine getirmek için adapte edilmişlerdir, ancak zorlu koşullara karşı çok yönlülük ve adaptasyona sahiptir. Bu enzimler ekstremofillerde, aşırı fiziksel ve / veya kimyasal koşullarda gelişen organizmalarda bulunur. Ekstremofiller, hidrotermal menfezler, hipersalin

gölleri ve havuzları, alkali soda gölleri, kuru çöller, soğuk okyanuslar ve volkanik alanlar da dahil olmak üzere, Dünya üzerindeki aşırı koşullar içeren ortamlarda bulunmaktadır. Ekstremofilik enzimler, geleneksel endüstriyel kimyasal proseslerin ayırt edici özelliği olan zehirli atık üretimi olmaksızın ticari açıdan değerli kimyasal dönüşümleri katalize etmekte önemli rol oynamaktadır (DeCarvalho, 2011).

Mağara sistemleri gibi yer altı bölgelerinde soğuğa adapte olmuş çok çeşitli mikroorganizmalar bulunmaktadır (Russell ve Homamoto, 1998). Değişken sıcaklık dönemlerinde yaşayabilen mikroorganizmaların aksine, sürekli soğuk ortamlarda yaşayanlar, düşük sıcaklıklarda büyüme için optimal olarak uyarlanmış hücresel işlemlere sahip olmaktadır. Bir mikrobiyal hücrenin tüm bileşenlerinin soğuğa uyum sağlaması biyoteknolojik uygulama için geniş bir ürün yelpazesinin mevcut olduğu anlamına gelmektedir (Gianese vd., 2001). Son yıllarda biyoteknolojinin hızlı gelişimi nedeniyle, enzim endüstrileri hızla artmaktadır. Soğuk ortamlara adapte olmuş mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmaların ürünleri geniş bir yelpazede endüstriyel, tarımsal ve tıbbi süreçlerde potansiyel uygulamalara sahiptir (Tablo 2. 3).

**Tablo 2. 3.** Bazı mikrobiyal enzimler ve biyoteknolojik uygulama alanları

Enzim	Üretici Mikroorganizma	Uygulama Alanları	Referans
Ksilanaz	<i>Thermoactinomyces thalophilus</i> ; <i>Bacillus</i> sp.; <i>Humicola insolens</i> . <i>Bispora</i> (acidophilic fungus)	Pentoz üretimi - yakıt ve kimyasallar için hemiselülozun biyolojik dönüştürülmesi; Meyve suyu arıtma; kağıtendüstrisi, Bira endüstrisi	Pandey, 1999 Nigam, 2009 Du, 2003
Ligninaz	Basidiomycetes türleri: <i>Steccherinum ochraceum</i> , <i>Polyporus versicolor</i> ,	Kot yıkama; Biyosensörler, Gıdaların ağartılması; Biyoremediasyon; Kirlilik kontrolü; Tekstil ve Endüstriyel atık sularda geri kazanılan	Pandey, 1999 Nigam, 2009 Nigam, 1987

	<i>Panus tigrinus</i>	kimyasalların arıtılması	
Selülaz	Basidiomycetes türleri: <i>Polyporus</i> sp.; <i>Pleurotus</i> sp.; <i>Trichoderma</i> sp.; <i>Aspergillus</i> sp.	Selülozdan glukoz besleme stoğu; Biyo-rafineri; Biyo-etanol; Kağıt hamuru endüstrisi	Pandey,1999 Nigam, 2009 Hardiman, 2010
Lipaz	Yeasts and Fungal strains- <i>Candida</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp,	Deterjanlar; Süt Endüstrisi yağları, katı yağlar, Tereyağı, Krem, Yem takviyesi; Terapötik ajan	Pandey,1999 Nigam, 2009 Reddivari,2002

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. İnsuyu Mağarası

Çalışma alanını Burdur ilinde yer alan İnsuyu Mağarası oluşturmaktadır. Çalışma kapsamında İnsuyu Mağarasının 15 farklı istasyondan, karanlık ve aydınlık alanlardan örnekleme yapılmıştır. Çalışma materyalini bu alanlardan alınan toprak, su ve sediment örnekleri oluşturmaktadır. Örnekleme yapılan alanlar Tablo 3. 1.'de verilmiştir.

**Tablo 3. 1.** İnsuyu Mağarasından örnekleme yapılan alanlar

No	Örnekleme Noktası	Materyal
1	Büyük Göl/ Karanlık	Toprak
2	Büyük Göl/ Aydınlık	Toprak
3	Büyük Göl- Sarkıt / Aydınlık	Su/ Süzüntü
4	Büyük Göl Tarafı- Mağara Duvarı/ Aydınlık	Toprak
5	Büyük Göl Tarafı- Mağara Duvarı/ Karanlık	Toprak
6	Üst Duvar/ Aydınlık	Süzüntü
7	Yürüyüş Parkuru- Mağara Duvarı/ Aydınlık	Toprak
8	Ziyaretçi Yolu Üzeri- Tavan/ Aydınlık	Su/Süzüntü
9	Ziyaretçi Yolu Üzeri- Mağara Duvarı/ Aydınlık	Toprak
10	Ziyaretçi Yolu Üzeri- Tavan/ Aydınlık	Toprak
11	Ziyaretçi Yolu Kenarı Toprak Alan/ Aydınlık	Toprak
12	Ziyaretçi Yolu Kenarı Toprak Alan/ Karanlık	Toprak
13	Mağara Duvarı/ Karanlık	Su/ Süzüntü
14	Dilek Gölü / Aydınlık	Su/ Süzüntü
15	Mağara Duvarı/ Karanlık	Su/ Süzüntü

### 3.2. Besiyeri Ortamları

#### 3.2.1. 0,1X Nutrient Agar Besiyeri Ortamı

Mikroorganizmaların izolasyonu ve inokülasyonu için 0,1X Nutrient Agar Besiyeri ortamı kullanılmıştır.

Nutrient agar besiyeri içeriği (1 L):

Et peptonu	2,5 g/L
Et ekstraktı	1,5 g/L
Agar-agar	12,0 g/L

Mikroorganizmaların inokülasyonu için Nutrient agar katı besiyeri 0,1X konsantrasyonunda hazırlanmıştır. 121 °C' de 15 dakikada otoklavda steril edildikten sonra steril petri kutularına dökülerek kullanılmıştır.

#### 3.2.2. R2A Besiyeri Ortamı

Mikroorganizmaların izolasyonu ve inokülasyonu için, Merck marka 100416 kodlu R2A Agar üretici firma talimatına göre hazırlanarak kullanılmıştır.

#### 3.2.3. M9 Besiyeri Ortamı

Mikroorganizmaların izolasyonu ve inokülasyonu için M9 besiyeri ortamı kullanılmıştır. M9 besiyeri ortamı içeriği (1 L):

M9 Tuzları	Agar Solüsyonu	%20 glukoz solüsyonu
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12,8 g	Agar 15,0 g	Glukoz 4,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3,0 g	Deionize su 500 ml	Deionize su 20 ml
NaCl 0,5 g		
NH <sub>4</sub> Cl 1,0 g		
Deionize su 478 ml		

M9 tuzları, agar solüsyonu ve %20 glukoz solüsyonu ayrı ayrı 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildikten sonra karıştırılarak steril petri kutularına dökülerek kullanılmıştır.

#### 3.2.4. 0,1x Nutrient Broth Besiyeri Ortamı

Biyokimyasal test ortamlarında ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan minimum inhibisyon konsantrasyon testi için saflaştırılmış suşların aktifleştirilmesi amacı ile 0,1x Nutrient Broth sıvı besiyeri ortamı kullanılmıştır.

Nutrient broth besiyeri içeriği (1 L):

Et peptonu 5,0 g/L

Et ekstraktı 3,0 g/L

Deionize su 1000 ml.

Mikroorganizmaların aktifleştirilmesi için Nutrient Broth besiyeri ortamı 0,1x konsantrasyonunda hazırlanmış ve steril tüplere dağıtılmıştır. Hazırlanan besiyeri 121 °C' de 15 dakikada otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

#### 3.2.5. Amilaz Test Ortamı

Amilaz testi için %2 nişasta içeren 0,1x Nutrient Agar ortamı kullanılmıştır.

Ortamın içeriği:

Nutrient Agar 2,0 g/L

Agar agar 12,0 g/L

Çözünebilir nişasta 20,0 g/L

Deionize su 1000 ml.

121 °C' de 15 dakikada otoklavda steril edildikten sonra steril Petri kutularına dökülerek kullanılmıştır.

#### 3.2.6. Proteaz Test Ortamı

Proteaz aktivitesi tayini için kullanılan besiyeri ortamının içeriği:

Öncelikle kazein 0,02 N NaOH ile çözülmüştür.

Nutrient Agar 20,0 gr/L

Kazein 10,0 gr/L

Jelatin 10,0 gr/L

Deionize su 1000 ml.

121 °C' de 15 dakikada otoklavda steril edildikten sonra steril petri kutularına dökülerek kullanılmıştır (Montville, 1983).

### 3.2.7. Lipaz Test Ortamı

Lipaz testi için kullanılan besiyeri ortamının içeriği:

Et peptonu 15 gr/L

NaCl 5gr/L

CaCl<sub>2</sub> 2 gr/L

Tween 80 10 ml.

Deionize su 1000 ml.

pH 7.2 seviyesine ayarlanarak 121 °C' de 15 dakikada otoklavda steril edildikten sonra steril Petri kutularına dökülerek kullanılmıştır.

### 3.2.8. Jelatinaz Test Ortamı

Jelatinaz testi için % 10 jelatin içeren 0,1x Nutrient Broth ortamı kullanılmıştır.

Besiyeri ortamının içeriği :

Nutrient Broth 0,8 gr/L

Jelatin 100 gr/L

Deionize su 1000 ml.

121 °C' de 15 dakikada otoklavda steril edildikten sonra steril ependorf tüplere dağıtılarak kullanılmıştır.

### 3.2.9. Üreaz Test Ortamı

Üreaz testi için Christensen Base Agar besiyeri ortamı kullanılmıştır.

1. Christensen Base Agar :

Pepton 1g/L

NaCl 5 g/L

Glukoz 1 g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L

Fenol Red 0,012 g/L

Agar agar 15 g/L

Hazırlanan Cristensen Agar Base 121° C' de 15 dk. steril edilir.

2. %40 üre hazırlanır. Hazırlanan üre membran filtre ile steril edilir.

3. Hazırlanan Cristensen Agar Base'e litresine 50 ml. olacak şekilde steril %40'lık üre ilave edilir.



### 3.3. Boyalar ve Çözeltiler

#### 3.3.1. Kristal Viyoleto Solüsyonu

Kristal viyoleto solüsyonu içeriği (100 mL );

Solüsyon A:

Kristal viyoleto (%90 boya içeren) 2 g

Etanol (%96 v/v) 20 mL

Solüsyon B:

Amonyum okzalat 0,8 g

Deiyonize su 80 mL

A ve B solüsyonları ayrı ayrı hazırlanıp karıştırılmıştır. Solüsyon 24 saat oda sıcaklığında bekledikten sonra filtre edilerek kullanılmıştır (Harley ve Prescott 2002).

#### 3.3.2. Gram İyodür Solüsyonu

Gram iyodür solüsyonu içeriği (300 mL );

Potasyum iyodür 2g

İyot 1 g

Potasyum iyodür ve iyot bir kap içerisinde ezilmiş ve üzerine su ilave edilerek 300 mL ye tamamlanmıştır. Solüsyon 24 saat oda sıcaklığında bekledikten sonra filtre edilerek kullanılmıştır (Harley ve Prescott 2002).

#### 3.3.3. Safranin Solüsyonu

Safranin solüsyonunun içeriği (110 mL için);

Safranin O 0,25 g

Etanol (%95 v/v) 10 mL

Deiyonize su 100 mL

Safranin O %95 etanol içerisinde çözülmüş ve üzerine steril saf su eklenmiştir. Solüsyon 24 saat oda sıcaklığında bekledikten sonra filtre edilerek kullanılmıştır (Harley ve Prescott 2002).

#### 3.3.4. % 0,9 Sodyum Klorür Solüsyonu

9 gr NaCl 1000 ml steril saf su içerisinde çözülmüş ve 121<sup>0</sup>C' de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

### **3.3.6. Tris (Tris Hidroksimetil Amino Metan) / EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit)**

Tris 1,21g

EDTA 0.37g

Distile su 1000mL

pH 2N HCl kullanılarak 7.4' e ayarlanmıştır. 121 C<sup>0</sup>' de sterilize edilmiştir.

### **3.3.7. SET (Sakkaroz-EDTA-Tris HCl) Tampon**

Tris HCl 0,788g

EDTA 1,86g

Sakkaroz 20g

Distile su 100mL

pH 8' e ayarlanarak 121 C<sup>0</sup>' de sterilize edilmiştir.

### **3.3.8. % 10 SDS Çözeltisi**

SDS 10 g

Steril distile su 100mL

### **3.3.9. Fenol/ Kloroform/ İzoamil Alkol Çözeltisi**

Fenol 25 mL

Kloroform 24mL

İzoamil Alkol 1mL

## **3.4. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyaller**

Taq DNA Polymeraz: Thermo EP0402

dNTP's: Thermo R0181

1X TAE Tamponu: SIGMA-ALDRICH A4718

Agaroz: SIGMA-ALDRICH A4718

Jel Boyası: BİOTIUM GelRed™

Primerler: Antibiyotik direnç primerleri Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

16S rRNA primerleri: 8F: AGAGTTGATCCTGGCTCAG

1492 R: CTACGGCTACCTTGTTACGA

**Tablo 3. 2.Çalışma kapsamında kullanılan antibiyotik direnç primerleri**

Gen Bölgesi	Primerler (5'→3')	Antibiyotik	Amplikon boyutu ve sıcaklığı	Kaynak
<i>Aac(3)-Ila</i>	F-ACTGTGATGGGATACGCGTC R-CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	Gentamisin	237 bp- 58 C <sup>0</sup>	Teixeira vd. 2016
<i>AphA1</i>	F-ATGGGCTCGCGATAATGTC R-CTCACCGAGGCAGTTCCAT	Gentamisin	600 bp- 55 C <sup>0</sup>	Teixeira vd. 2016
<i>AphA2</i>	F-GAACAAGATGGATTGCACGC R-GCTCTTCAGCAATATCACGG	Gentamisin	680 BP- 56 C <sup>0</sup>	Teixeira vd. 2016
<i>Aac(6')-Ib-cr</i>	F-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R-CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	B-laktam	482 bp-55 C <sup>0</sup>	Teixeira vd. 2016
<i>AadB</i>	F-CGTCATGGAGGAGTTGGACT R-CGCAAGACCTCAACCTTTTC	Gentamisin	350 bp- 57 C <sup>0</sup>	Teixeira vd. 2016
<i>Bla<sub>TEM</sub></i>	F-GAGTATTCAACATTTTTCGT R-ACCAATGCTTAATCAGTGA	β -laktam	857 bp- 48 C <sup>0</sup>	Bhattacharya vd. 2015
<i>Bla<sub>SHV</sub></i>	F-TCGCCTGTGTATTATCTCCC R-CGCAGATAAATCACCACAATG	β -laktam	768 bp- 56 C	Bhattacharya vd. 2015
<i>Bla<sub>CTX-M-3</sub></i>	F-AATCACTGCGTCAGTTTAC R-TTTATCCCCACAACCCAG	β -laktam	701 bp- 53 C <sup>0</sup>	Bhattacharya vd. 2015
<i>Bla<sub>OXA1</sub></i>	F-GCAGCGCCAGTGCATCAAC R-CCGCATCAAATGCCATAAGTG	β -laktam	198 bp- 58 C <sup>0</sup>	Bhattacharya vd. 2015
<i>Bla<sub>OXA7</sub></i>	F-AGTTCTCTGCCGAAGCC R-TCTCAACCCAACCAACCC	β -laktam	591 bp- 51 C <sup>0</sup>	Bhattacharya vd. 2015
<i>Bla-TEM2</i>	F-AAAATTCTTGAAGACG R-TTACCAATGCTTAATCA	β -laktam	1080- 40 C <sup>0</sup>	Sharma vd. 2010 Lee vd. 2001
<i>Bla-SHV2</i>	F-GGGTTATTCTTATTTGTGCGCT R-TAGCGTTGCCAGTGCTCG	β -laktam	929 bp- 54 C <sup>0</sup>	Lee vd. 2001
<i>Bla-CTX-M</i>	F-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA R-CGATATCGTTGGTGGTCCATA	β -laktam	544 bp- 62 C <sup>0</sup>	Mir vd. 2016
<i>StrA</i>	F-TCAATCCCGACTTCTTACCG R-GCTAACGCCGAAGAGAACTG	β -laktam	240 bp- 57 C <sup>0</sup>	NC_005205.1, 487-506 NC_005205.1, 726-745 (Bu çalışmada)
<i>StrAF-R</i>	F-AGCAGAGCGCGCCTTCGCTG R-CCAAAGCCCACTTCACCGAC	β -laktam	500 bp- 62 C <sup>0</sup>	Carattoli, 2002
<i>Arr2-int2a</i>	AAC CGA GGA TGC GAA CCA CT	Rifampisin*	3602 bp- 54 C <sup>0</sup>	Houang vd. 2003
<i>Int6b</i>	CCG AGC CGC TCG TAT AG	Rifampisin	3602 bp- 54 C <sup>0</sup>	Houang vd. 2003
<i>Arr-4-CATB3</i>	CACTGGAGAAGATCAAAGCG	Rifampisin	406 bp	Houang vd. 2003
<i>Arr4-INB</i>	GGCAGACTTGACCTGAT	Rifampisin	450 bp- 54 C <sup>0</sup>	Fonseca vd. 2008
<i>Arr-5-INF</i>	GGCATCCAAG CAGCAAG	Rifampisin	450 bp- 54 C <sup>0</sup>	Fonseca vd. 2008
<i>Van A</i>	ATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATAC CCCCTTAACGCTAATACGAT	Vankomisin	1029- 57 C <sup>0</sup>	Miele vd. 1995
<i>Van B</i>	GTG ACA AAC CGG AGG CGA GGA CCOG CCA TCC TCC TGC AAA AAA	Vankomisin	433- 63 C <sup>0</sup>	Clark vd. 1993
<i>Van C</i>	GAA AGA CAA CAG GAA GAC CGC ATC GOCA TCA CAA GCA CCA ATC	Vankomisin	796- 57 C <sup>0</sup>	Clark vd. 1993

\* : Rifampisinin enzimatik degradesyonu ile kazanılan direnç ile ilgili primerler reverse ve forward olmak üzere ikili olarak kullanılmıştır.

### 3.5. Antibiyotikler

Antibiyotik duyarlılık deneylerinde kullanılan antibiyotikler Tablo 3. 3' te verilmiştir.

**Tablo 3. 3.** Antibiyotik duyarlılık deneylerinde kullanılan antibiyotikler

Antimikrobiyal Madde	Sembol	Grup
Ampisilin	AMP	Beta Laktam
Streptomisin	STR	Aminoglikozid
Gentamisin	GEN	Aminoglikozid
Rifampisin	RIF	Ansamisin
Vankomisin	VAN	Glikopeptid
Penisilin	PCN	Beta Laktam
Sefpodoksim	CP	Sefalosporin

### 3.6. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar:

İnkübatör: NÜVE ES120

Otoklav: ALP

Faz Kontrast Işık Mikroskobu: Olympus CX41

Çalkalayıcı İnkübatör: IKA KS 4000

Buzdolabı: Beko BK9470

Santrifüj: BECKMAN COULTER Allegra X-22R

Uv/Görünür Alan Mikroplaka Spektrofotometre: BioTek, Epoch

Thermal Cycler: Long Gene A300 Fast Thermal Cycler

Elektroforez Sistemi: Thermo EC 300 XL

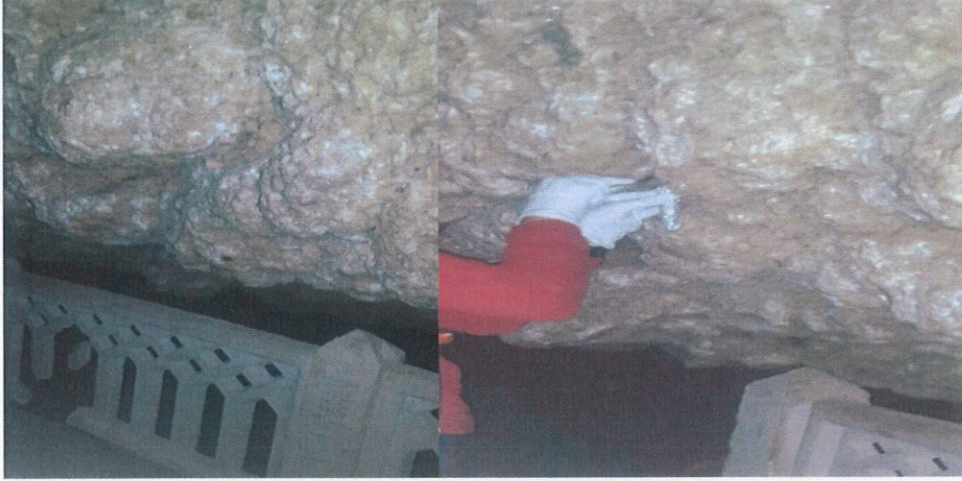
Jel Görüntüleme: Vilber Lourmat Gel Görüntüleme Sistemi

### 3.7. Yöntem

#### 3.7.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu

Çalışma materyalini oluşturan örnekler Burdur ilinde yer alan İnsuyu Mağarasından izole edilmiştir. Örneklem mağaranın 15 farklı istasyonundan karanlık ve aydınlık alanlardaki toprak, su ve sedimentlerden yapılmıştır. İzolatlar mağara duvarı, tavan, sarkıtlardan damlayan süzüntüler ve toprak alanlardan alınmıştır (Şekil 3. 1). Çalışma aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiş, örnekler steril swaplar yardımıyla

steril falcon ve ependorf tüpler içerisine alınmıştır. İzolatlar aynı gün Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarına taşınarak çalışılmaya başlanıncaya kadar buzdolabında +4 °C’de muhafaza edilmiştir.



**Şekil 3. 1:** Örneklerin Mağara duvarlarından toplanması

### 3.7.2. Mikroorganizmaların Kültürü ve Saflaştırılması

1 ml su veya 1 g örnek 9 ml steril %0.9'luktuzlu su içerisinde homojenize edilerek, bir seri dilüsyonu ( $10^{-4}$ 'e kadardilüsyon serisi) hazırlanmıştır. Tüm örneklerden karanlık ve aydınlık ortam koşullarına uygun olmak üzere yayma ekim yöntemiyle 0,1x Nutrient agar, M9 ve R2A ortamlarına inoküle edilmiştir (Şekil 3. 2.). Kültüre edilen örnekler 28 °C’ de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda koloni morfolojileri incelenerek karakteristik özellik gösteren koloniler belirlenmiştir. Seçilen kolonilerden 0,1 x Nutrient Agar ortamına çizgi ekim yapılmış, 28 °C’ de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Saf izolat elde edilinceye kadar çizgi ekim işlemi tekrarlanmıştır.

Üreme gözlemlenen saflaştırılmış izolatlardan 0,1 x Nutrient Agar ortamında yatık hazırlanarak inoküle edilmiş ve -20 °C’ de muhafaza edilmiştir. Saflaştırılan suşlar 0,1X Nutrient Broth’a inoküle edilerek 28°C’ de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizmalarda büyümenin gözlemlendiği kültürler %40 gliserol içeren besiyeri ortamında stok olarak muhafaza edilmiştir.

### 3.7.3. Gram Boyama

Örnekler çizgi ekim yöntemiyle 0,1 x Nutrient Agar ortamına inoküle edilmiş 28 C<sup>0</sup>'de 48 saat inkübe edilmiştir. Lam üzerine Pasteur pipeti ile %0,09 NaCl solüsyonu damlatılmış üreme gösteren kolonilerden öze ile alınıp yayılarak kurumaya bırakılmıştır. Tamamen kuruduktan sonra preperat 5 kez alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi uygulandıktan sonra lamlar Kristal Viyolet Solüsyonunda 1 dakika bekletilmiş ve süre sonunda fazla boyayı uzaklaştırmak için su ile yıkanmıştır. Lamlar Gram iyodür solüsyonunda 1 dakika bekletilmiş ve su ile yıkanmıştır. Bu işlemden sonra preperata %70 Etanol ile 15 saniye muamele edilmiş ve tekrar su ile yıkanmıştır. Son aşamada preperat karşıt boyama için Safranin solüsyonunda 30 saniye bekletilmiş ve su ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonunda lamlar kurulama kağıdı ile kurulanmıştır. Kristal viyole çözeltisini hücre içinde tutabilen, dolayısıyla mikroskop altında mor renkte görünen bakteriler gram-pozitif; kristal viyole çözeltisini tutamayıp hücre dışına bırakan ve bu nedenle pembe-kırmızı renkte gözükten bakteriler de gram-negatif olarak değerlendirilmiştir (Özçelik, 1998). İzolatlar hücre duvarı özelliklerine göre Gram pozitif ve Gram negatif olarak ayırt edilmiş, morfolojik özellikleri ve spor oluşumları belirlenmiştir.

### 3.7.4. Biyokimyasal Testler

#### 3.7.4.1. Katalaz Testi

0,1 x Nutrient Agar besiyeri ortamında saflaştırılan örneklerden bir öze ucu miktarı alınarak boş bir petri kutusuna aktarılmıştır. Örnek üzerine Pasteur pipeti ile %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen Per Oksit) damlatılmıştır. Gaz çıkışı gözlemlenmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Arda, 2000).

#### 3.7.4.2. Proteaz Testi

Proteaz testi için %1 kazein ve %2 jelatin içeren Nutrient Agar besiyeri ortamı kullanılmıştır. Besiyerine spotlama tekniği ile ekim yapılmış ve örnekler 28C<sup>0</sup>'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda mikroorganizma kültürü etrafında oluşan şeffaf zon görünümü pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Montville, 1983).

### **3.7.4.3.Lipaz Testi**

Lipaz testi için Tween 80 Agar içeren besiyeri ortamı kullanılmıştır. Aktifleştirilmiş saf kültürlerden besiyerine spotlama tekniği ile inokülasyon yapılmış ve 28C<sup>0</sup>' de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda üreyen mikroorganizma kültürü etrafında oluşan beyaz çökelek yapıda görünüm lipaz testi için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Samad vd., 1989).

### **3.7.4.4. Amilaz Testi**

Amilaz testi için %2 nişasta içeren 0,1x Nutrient Agar besiyeri ortamı kullanılmıştır. Aktifleştirilmiş saf kültürden hazırlanan besiyeri ortamına spotlama tekniği ile ekim yapılmış ve 28<sup>0</sup>C' de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Agar plakalar üzerine Pasteur pipeti ile yüzeyi kaplayacak miktarda İyodine Mordant Solüsyonu damlatılmış ve yaklaşık 1 dakika yayılarak bekletilmiştir. Üreyen mikroorganizm kültürü etrafında oluşan şeffaf zon görünümü amilaz testi için pozitif sonuç kabul edilmiştir (Cappucino ve Sherman, 2007).

### **3.7.4.5. Jelatinaz Testi**

Jelatinaz testi için % 10-15 jelatin içeren 0,1x Nutrient Broth sıvı besiyeri ortamı kullanılmıştır. Aktifleştirilmiş saf kültür hazırlanan besiyeri ortamına inoküle edilmiş ve 28C<sup>0</sup>, de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 1 saat +4 C<sup>0</sup>, de buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda tüplerde katılaşma olup olmadığı gözlemlenmiştir. Tüplerde katılaşma görülmesi jelatinaz testi için negatif, sıvı görünüm ise pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Cappucino ve Sherman, 2007).

### **3.7.4.6. Üreaz Testi**

Üreaz testi için Christensen's Urea Agar besiyeri ortamı kullanılmıştır. Aktifleştirilmiş saf kültürlerden hazırlanan besiyeri ortamınamikropipet ile ekim yapılmış ve 28<sup>0</sup>C' de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda turuncu renkte olan besiyeri ortamının kırmızıya döndüğü örnekler için sonuç pozitif olarak kabul edilmiştir (Christensen, 1946).

### 3.7.5. Antibiyotik Duyarlılığının Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Testi (MİK) ile Belirlenmesi

Örneklerin antibiyotik duyarlılık seviyelerinin belirlenmesi için Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) testi uygulanmıştır. MİK testi 25'i Gram negatif, 50'si Gram pozitif olmak üzere toplam 75 izolat için denenmiştir. MİK testi için ampisilin, klindamisin, rifampisin, vankomisin, sefpodoksim ve penisilin antibiyotikleri kullanılmıştır.

MİK denemeleri için ampisilin, klindamisin, rifampisin, vankomisin, sefpodoksim antibiyotiklerine karşı duyarlılığın belirlenmesinde 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.625 µg/ml antibiyotik içeren 0,1x Nutrient Agar besiyeri ortamı kullanılmıştır. Penisilin antibiyotiğine karşı duyarlılığın belirlenmesi için ise 40,20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.125 U/ml antibiyotik içeren 0,1x Nutrient Agar besiyeri ortamı kullanılmıştır. 0,1x Nutrient Broth sıvı besiyeri ortamında aktiveleştirilmiş kültürlerden öze ile alınarak %0,9 NaCl içeren ortamda 0,5 MacFarland bulanıklığına göre süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan bir öze miktarı kadar alınarak hazırlanan konsantrasyonlarda antibiyotik içeren besiyeri ortamlarına inoküle edilmiştir. 28 °C' de 48 saat inkübe edilmiştir ve sonuçlar değerlendirilirken üremenin görülmediği ilk konsantrasyon o izolat için MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Saptanan değerler Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından verilen kırılma noktaları ile karşılaştırılmıştır.

### 3.7.6. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonunda Gram pozitif ve Gram negatif bakteri izolatları için farklı protokoller uygulanmıştır. DNA izolasyonu için örnekler 0,1x Nutrient Broth sıvı besiyeri ortamında aktiveleştirildikten sonra kullanılmıştır.

Gram pozitif bakteriler için genomik DNA izolasyonu protokolü:

1. 24-48 saat inkübe edilen bakteri kültürü 5000 rpm de 10 dakika santrifüj edilir.
2. Süpernatant uzaklaştırılır. Pellet 5 ml 0,1x SSC ile yıkanır. 1 ml 10 mM Tris HCl (pH=8.0) ' de çözülür. 2,5 mg/ml lizozim eklenir. 37 C<sup>0</sup> de 45 dakika inkübe edilir.
3. 9ml lizis tamponu [10 mM Tris HCl, pH: 8.0, 1 mM EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit), 500 mg/l proteinaz K] eklenir. 65 C<sup>0</sup> de 30 dakika inkübe edilir.
4. 1: 1 fenol- kloroform eklenir. Kloroform fazı uzaklaştırılır.



5. 1/10 hacim Na- acetat pH: 4.8 ve 2 hacim% 95 etanol eklenerek 15- 20 sn. vortekslenir.10000 rpm' de15 dakika santrifüj edilir ve üst faz uzaklaştırılır.

6. 500 µl % 70 etanol eklenir, 15-20 sn. vortekslenir ve maksimum hızda 15 dk. Santrifüj edilir.

7. Sıvı kısım uzaklaştırılır. Pellet 37 °C' de kurutulduktan sonra 60 µl steril ultra saf suda çözülür.

Gram negatif bakteriler için genomik DNA izolasyonu protokolü:

1. 24-48 saat inkübe edilen kültürden 2 ml ependorf tüplerine aktarılır. 6000 rpm' de 5 dk. santrifüj edilir.

2. Süpernatant kısım uzaklaştırılır.Pellet 467 µl TE tamponunda pipetaj ile çözülür.

3. 30 µl % 10 SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve 3 µl 20 mg/ml Proteinaz K eklenir.Su banyosunda 65 C<sup>0</sup>, de 1 saat inkübe edilir.

4. Proteinaz K ile aynı hacimde RNase ilave edilir ve 37 C<sup>0</sup>, de 1 saat inkübe edilir.

5. 500 µl 1:1 fenol:kloroform eklenerek karıştırılır. 1200 rpm' de 10 dakika santrifüj edilir. Bu aşama 3 kez tekrarlanır.

6. Su fazı yeni ependorfa aktarılır.

7. Hacmin 1/10' u kadar 3 M Na- acetat ilave edilir, pipetajla karıştırılır. Hacmin 2 katı kadar % 100' lük etanol eklenir 15- 20 sn. vortekslenir. 10000 rpm' de15 dk. santrifüj edilir.

8. 500 µl % 70 etanol eklenir, 15-20 sn. vortekslenir ve maksimum hızda 15 dk. santrifüj edilir.

9. Sıvı kısım uzaklaştırılır. Pellet 37 C<sup>0</sup>, de kurutulduktan sonra 60 µl steril ultra saf suda çözülür (Wilson, 1997).

DNA saflığı spektrofotometre cihazında A260/A280 oranına bakılarak ölçülmüştür.

### **3.7.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

DNA izolasyonu yapılan bakteri örneklerinin 16S rRNA bölgelerinin ve antibiyotik direnç genlerinin amplifikasyonu için için Long Gene A300 Fast Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. Ta (bağlanma sıcaklığı) her bir primer için ayrı ayrı Tm= 2

$x(A+T) + 4x(G+C)$  formülü kullanılarak  $T_m$  değerinin hesaplanması ve bu değer 4-5 derece altının alınması ile belirlenmiştir.

Reaksiyon bileşenleri (50  $\mu$ L için)

DNA -	5 $\mu$ L
10X Buffer-	5 $\mu$ L
dNTP karışımı (2 $\mu$ M her biri)-	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)-	3 $\mu$ L
Forward Primer (10 $\mu$ M) -	1 $\mu$ L
Reverse Primer (10 $\mu$ M) -	1 $\mu$ L
Taq DNA polimeraz (5 U/ $\mu$ L)-	0,3 $\mu$ L

PZR Koşulları:

94 C <sup>0</sup>	5 dk	} X35
94 C <sup>0</sup>	1 dk	
42-63 C <sup>0</sup>	1 dk	
72 C <sup>0</sup>	1 dk	
72 C <sup>0</sup>	10 dk	

PZR sonrasında, elde edilen ürünlerin bant büyüklüklerinin görülmesi amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. %1-2 oranında agaroz içeren jel 1xTAE (Tris-acetate-EDTA) buffer ile hazırlanmıştır. Jel içerisine 10  $\mu$ l Gel Red solüsyonu eklenmiştir. PZR ürününden 5 $\mu$ l alınarak 2 $\mu$ l 6x yükleme boyası ile karıştırılmış ve agaroz içeren jelde yürütülmüştür. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacı ile 100 bp ve 1 kb DNA Marker'dan yararlanılmıştır. Elektroforez sonrasında jel görüntüleme sistemi ile incelenmiştir.

### 3.7.8. DNA Dizi Analizi

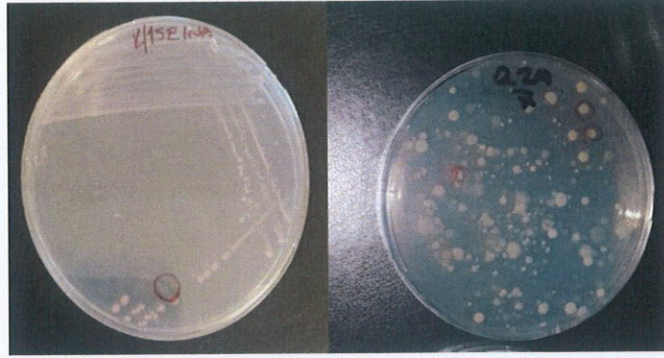
Antibiyotik dirençliliğinin MİK Testi ile belirlenmesinden sonra antibiyotiklere karşı en yüksek konsantrasyonda ve çoklu direnç gösteren 10 izolat ve negatif kontrol olarak kullanılmak üzere duyarlılık gösteren 3 izolat belirlenmiştir. Seçilen örneklerden 16S rRNA gen bölgesi için PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiş, elde edilen PZR ürünlerinden çift yönlü dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analizi BMLabosis firması tarafından yapılmıştır.

Dizi analizi sonuçları "ApE" ve "Finch TV" programları kullanılarak değerlendirilmiş ve NCBI üzerinden Blast edilerek tür tanıları gerçekleştirilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Gram Boyama ve Hücre Morfolojisi

Mağaraların mikrobiyal yaşam için besin bakımından bakımından sınırlı ortamlar olması nedeni ile izole edilen örneklerin inokülasyonu için düşük miktarda besin içeren 0,1X Nutrient agar, M9 ve R2A besiyeri ortamları tercih edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler arasından morfolojik verileri aynı olan izolatlar çıkarılmış ve çalışma için birbirinden farklılık gösteren 75 izolat seçilmiştir. Seçilen koloniler 0,1x Nutrient agar ortamında saflaştırılmış (Şekil 4. 1) ve aktifleştirilmiş örnekler için Gram boyama yöntemi uygulanmıştır. Örneklerin Gram boyama özellikleri ve hücre morfolojileri ışık mikroskobu ile incelenmiştir. İncelenen 75 bakteri izolatının 50'sinin Gram negatif, 25'inin Gram pozitif olduğu tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında incelenen 75 örnek için Gram boyama sonuçları ve morfolojik özellikler Tablo 4. 1. ve 4. 2'de verilmiştir.



Şekil 4. 1. Farklı besiyeri ortamlarında saflaştırılan suşlara ait deney fotoğrafı

Mağara mikroflorası üzerine yapılan çalışmalarda çeşitli Gram negatif bakterilerin yoğun olduğu saptanmıştır (Beveridge vd., 1994; Hose vd., 2000; Sarbu vd., 1996; Warthmann vd., 2000; Douglas ve Douglas, 2001; Northup vd., 2003; Barton vd., 2005). 2012' de Lechuguilla Mağarasında yapılan çalışmada 93 bakteri suşunun antimikrobiyal ajanlara direnci incelenmiştir. 93 suşun % 33'ünün Gram pozitif % 63'ünün ise Gram negatif olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 4. 1.** Aydınlık alan örneklerinden izole edilen suşlar ve kodları

<b>Suşun Kodu</b>	<b>İzole Edildiği Örnek</b>	<b>İzole Edildiği Besiyeri</b>	<b>Gram Boyama</b>	<b>Hücre Morfolojisi</b>
2A	Toprak	0,1x NA	Gram (+)	Basil
2B	Toprak	0,1x NA	Gram (+)	Basil
2C	Toprak	0,1x NA	Gram (-)	Kok
2D	Toprak	0,1x NA	Gram(-)	Basil
2F	Toprak	0,1x NA	Gram(+)	Kokobasil
2G-2	Toprak	0,1x NA	Gram(-)	Basil/spiral
2I	Toprak	0,1x NA	Gram(-)	Basil/kok
2J	Toprak	0,1x NA	Gram(+)	Kok
2L	Toprak	0,1x NA	Gram(+)	Streptobasil
2M-2	Toprak	R2A	Gram (-)	Kok
2G-1	Toprak	R2A	Gram(-)	Kok
4B	Toprak	R2A	Gram(-)	Kok
4D	Toprak	R2A	Gram(+)	Kokobasil
4E	Toprak	R2A	Gram(+)	Kok
4F	Toprak	0,1x NA	Gram(+)	Kok
4O	Toprak	M9	Gram(+)	Kok
4H	Toprak	M9	Gram(-)	Kok
4M	Toprak	M9	Gram(-)	Kok
6B-1	Süzüntü Su	R2A	Gram(-)	Basil
6D	Süzüntü Su	R2A	Gram(-)	Kok/ basil
6I-1	Süzüntü Su	R2A	Gram (+)	Basil
7A	Toprak	R2A	Gram (+)	Basil
7B	Toprak	R2A	Gram(-)	Basil
7C	Toprak	R2A	Gram (-)	Basil
7D-1	Toprak	R2A	Gram (+)	Streptobasil
7J	Toprak	R2A	Gram(-)	Basil
9A	Toprak	0,1x N.A	Gram(+)	Kok
9D	Toprak	0,1x N.A	Gram(-)	Kok
10B	Toprak	0,1x N.A	Gram (+)	Basil
11L	Toprak	0,1x N.A	Gram(+)	Kok
11M	Toprak	0,1x N.A	Gram(+)	Kok
12C	Toprak	0,1x N.A	Gram (+)	Belirlenememiştir
12F	Toprak	0,1x N.A	Gram (-)	Streptobasil
12G	Toprak	0,1x N.A	Gram (+)	Basil
12M	Toprak	0,1x N.A	Gram (-)	Basil
13A	Süzüntü Su	0,1x N.A	Gram (-)	Streptobasil
13C-1	Süzüntü Su	0,1x N.A	Gram (-)	Kok
13G	Süzüntü Su	0,1x N.A	Gram (-)	Basil
13H	Süzüntü Su	M9	Gram (-)	Kok

13I	Süzüntü Su	M9	Gram (-)	Basil
13J	Süzüntü Su	M9	Gram (+)	Basil
15F	Süzüntü Su	M9	Gram(+)	Basil
15D	Süzüntü Su	M9	Gram (-)	Basil

**Tablo 4. 2.** Karanlık alan örneklerinden izole edilen suşlar ve kodları

Suş Kodu	İzole Edildiği Örnek	Besiyeri Ortamı	Gram Boyama	Hücre Morfolojisi
K-1A	Toprak	R2A	Gram (+)	Kok
K-1C	Toprak	R2A	Gram (+)	Streptobasil
K-1E	Toprak	R2A	Gram (+)	Basil
K-2A	Toprak	R2A	Gram (-)	Basil
K-2B	Toprak	R2A	Gram (-)	Kok
K-2E	Toprak	R2A	Gram (+)	Kok
K-2G	Toprak	R2A	Gram (-)	Kokobasil
K-2H	Toprak	R2A	Gram (-)	Basil
K-2I	Toprak	R2A	Gram (-)	Kok
K-2J	Toprak	R2A	Gram(-)	Basil
K-2N	Toprak	R2A	Gram (-)	Basil
K-4B	Toprak	R2A	Gram(+)	Kok
K-4C	Toprak	R2A	Gram(-)	Kok
K-4E	Toprak	R2A	Gram (-)	Kok
K-4G	Toprak	R2A	Gram(-)	Kok
K-4H	Toprak	R2A	Gram(-)	Kok
K-4F	Toprak	R2A	Gram(-)	Kok
K-7B	Toprak	R2A	Gram (-)	Basil
K-7K	Toprak	R2A	Gram (+)	Basil
K-9M	Toprak	R2A	Gram(-)	Kok
K-11A	Toprak	0,1x N.A	Gram(-)	Kok
K-11D	Toprak	R2A	Gram(-)	Kok/basil
K-11G	Toprak	M9	Gram(-)	Basil
K-12E	Toprak	R2A	Gram(-)	Kok
K-13B	Süzüntü Su	R2A	Gram(-)	Basil
K-13J	Süzüntü Su	R2A	Gram(-)	Basil
K-13I	Süzüntü Su	R2A	Gram(-)	Basil
K-13F/1	Süzüntü Su	R2A	Gram(-)	Kok
K-15A	Süzüntü Su	0,1x N.A	Gram(-)	Basil/streptobasil
K-15C	Süzüntü Su	0,1x N.A	Gram(-)	Basil
K-15F	Süzüntü Su	R2A	Gram(-)	Kok
K-15G	Süzüntü Su	R2A	Gram(-)	Kok

#### 4.2. Biyokimyasal Test Sonuçları

Çalışma sonucunda kaydedilen bulgular İnsuyu Mağarasından elde edilen ve kültürü yapılan bakteri izolatlarından yaklaşık olarak %91'inin katalaz, %36'sının proteaz ve amilaz, %45'inin üreaz, %13'nün jelatinaz ve % 39'unun lipaz enzimlerini üretebildiklerini ortaya koymuştur. Biyokimyasal test sonuçları Tablo 4. 3 ve Tablo 4. 4.' te, deneylere ait fotoğraflar Şekil 4. 2'de verilmiştir.

Katalaz testi mikroorganizma kültürlerinde oluşan hidrojen peroksiti parçalayan katalaz enziminin mevcudiyetinin araştırılması esasına dayanmaktadır. Katalazlar, sterilizasyon veya ağartma için kullanılan hidrojen peroksidi çıkarmak için gıda ve tekstil işleme gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır (Zhang vd., 2010). Katalaz enziminin aerobik mikroorganizmaların birçoğunda mevcut olduğu bilinmektedir. Bu nedenle izolatların büyük çoğunluğunun katalaz testi için pozitif sonuç vermesi beklenen bir durumdur.

Amilazlar endüstriyel nişasta dönüştürme işlemlerinde kullanımları nedeniyle önem taşımaktadır. Amilolitik enzimler gıda endüstrisinde; glikoz şurupları, yüksek fruktoz içeren mısır şurupları ve maltoz şurupları üretimi, şeker şuruplarının viskozitesinde azalmanın sağlanması, daha uzun raf ömrü için berraklaştırılmış meyve suyu üretimi için türbiditenin azaltılması gibi alanlarda büyük ölçekli uygulamalara sahiptir (Sivaramakrishnan vd., 1999). Bira endüstrisinde nişastanın çözünürlüğünün sağlanmasında, fırın endüstrisi, ekmek ve diğer fırınlanmış ürünlerin parçalanmasını geciktirmek için amilazlar kullanılmaktadır (Pandey vd., 2000). Bununla birlikte kağıt endüstrisinde uygun kâğıt tabakasının elde edilmesi için nişasta viskozitesinin azaltılması, tekstil endüstrisinde tekstil liflerinin boyutlandırılmasında ve ilaç endüstrisinde sindirime yardımcı olarak amilazlardan faydalanılmaktadır (Li vd., 2013). Amilaz, bir polisakkarit olan nişastayı hidroliz etmekle birliktetüm mikroorganizmalarda bulunmayan bir enzimdir. Bu nedenle amilaz testi aynı türe ait suşlar arasında bile farklılık göstermektedir.

Proteolitik enzimler dünyadaki enzim endüstrisinin %60'ını oluşturmaktadır. Gıda, deri endüstrisi ve eczacılık gibi çok çeşitli alanlarda yaygın kullanımından dolayı proteaz enzimi üzerine yapılan çalışmalar ile bu çalışmaların biyokimyasal ve biyoteknolojik yaklaşımları önem taşımaktadır (Gupta vd., 2002; ElSafey vd., 2004). Proteazlar genel olarak yıkama tozu, tabakhane, gıda endüstrisi, deri işleme, ilaç

endüstrisi, moleküler biyoloji ve peptit sentezi çalışmalarında kullanılmaktadır (Pandey vd., 1999; Kumar ve Takagi, 1999). Çalışmamızda izole edilen suşların %36'nda ekstrasellüler proteaz varlığı belirlenmiştir.

Jelatinaz enzimi kimyasal ve medikal endüstrilerde ve aynı zamanda gıda ve temel biyolojik bilimlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hisano vd., 1989). Jelatin hayvansal bir proteindir. Mağaralar gibi habitatlardan elde edilen suşların jelatinaz enzimi üretmemesi beklenen bir durumdur. Çalışmamızda da sadece suşların %13'ünde jelatinaz üretimi belirlenmiştir.

Mağara mikroorganizmalarının enzim üretimi ile ilgili 2017 'de Hindistan' da yapılan bir çalışma kapsamında Gumki Mağarasının mikrobiyolojik çeşitliliği ve izole edilen bakterilerin enzim üretme potansiyelleri incelenmiştir. Çalışma Gumki mağarasının biyoaktif bileşik üretimi için mikrobiyal topluluk yapısını göstermektedir. Mağara örnekleri toplam 49 izolattan oluşmaktadır. Morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyon dokuz cinsi içeren bir topluluğu ortaya çıkarmıştır: *Bacillus* (% 27), *Paenibacillus* (% 21), *Staphylococcus* (% 20), *Streptococcus* (% 16), *Salimicrobium* (% 8), *Lysisnibacillus* (% 2), *Aeromonas* (% 2), *Proteus* (% 2) ve *Clostridium* (% 2). Bütün bu mikroorganizmalar farklı enzim üretimi için taranmış ve bu enzimler için yaklaşık% 90 izolat pozitif sonuç vermiştir. Biyokimyasal testler sonucunda izolatların % 75.51 oranında lipaz,% 47 amilaz ve % 24 proteaz ve % 12'si selülaz üretimini desteklediği görülmüştür (Rautela vd., 2017). Yaptığımız çalışmada ise selülaz aktivitesi incelenmemekle birlikte, amilaz ve proteaz enzimi için %37, proteaz için %39 pozitif sonuç tespit edilmiştir.

Biyokimyasal test sonuçları mağaralarda yaşayan mikroorganizmaların temel enzim gruplarının üretimini destekleyebildiklerini göstermektedir. Besin, sıcaklık, ışık gibi çeşitli faktörler bakımından sınırlandırılmış habitatlarda yerleşik olarak yaşayan mikroorganizmaların bu ortamlardaki sınırlandırılmış unsurlara uyum sağlamak için geliştirdiği adaptasyon mekanizmalarının sekonder metabolit üretiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Biyoteknolojik çalışmaların mağaralar gibi aşırı koşullar bulunduran çevrelerde yürütülmesi yeni mikrobiyal enzimlerin keşfi için olanak sağlayacaktır.

**Tablo 4. 3.** Aydınlık alan örneklerinin enzim testi sonuçları

Suş Kodu	Katalaz	Üreaz	Proteinaz	Lipaz	Amilaz	Jelatinaz
2A	+	-	+	+	+	-
2B	+	-	+	-	-	-
2C	+	-	+	-	-	+
2D	+	-	-	-	-	-
2F	+	-	+	+	+	+
2G-2	+	+	+	+	-	-
2I	-	-	-	-	-	-
2J	+	-	-	-	-	-
2L	+	-	+	+	-	-
2M-2	+	B	-	-	-	-
2G-1	+	+	-	+	-	-
4B	+	-	-	-	-	B
4D	-	+	-	-	-	B
4E	+	-		+	+	+
4F	+	-	+	-	+	-
4O	+	+	B	+	-	B
4H	+	+	B	B	-	+
4M	+	-	-	-	-	+
6B-1	+	+	-	+	-	-
6D	+	B	-	-	+	B
6I-1	+	+	-	+	-	-
7A	+	-	-	-	-	-
7B	-	+	-	+	-	+
7C	+	-	-	-	-	-
7D-1	+	-	-	-	B	B
7J	+	-	+	-	-	+
9A	+	-	+	+	-	+
9D	+	-	-	+	-	B
10B	+	-	-	+	-	-
11L	+	-		-	-	-
11M	+	-	-	+	-	B
12C	+	-	-	-	+	-
12F	+	-	-	-	-	-
12G	+	+	-	-	-	-
12M	+	+	-	-	-	-
13A	+	+	-	-		-
13C-1	+	+	-	+	-	B
13G	+	-	-	-	-	-

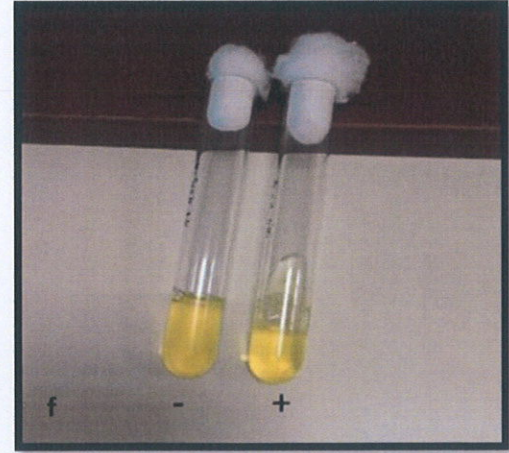
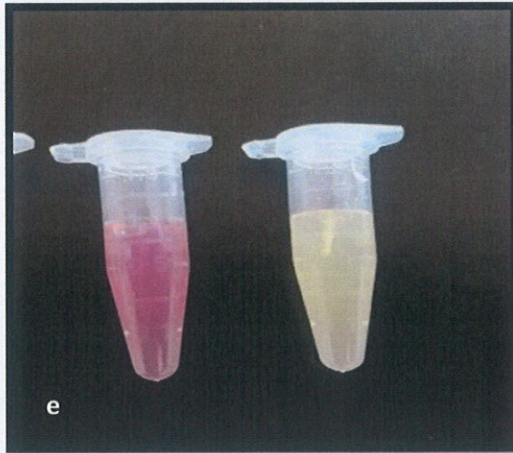
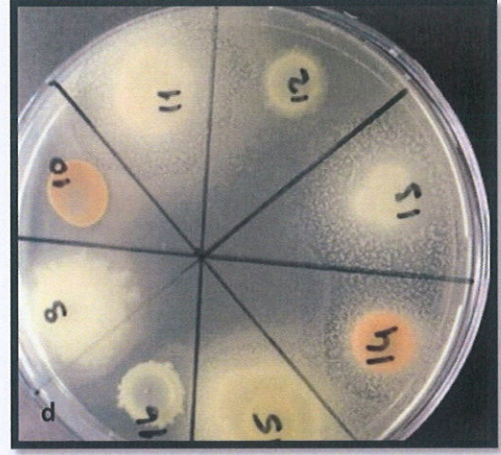
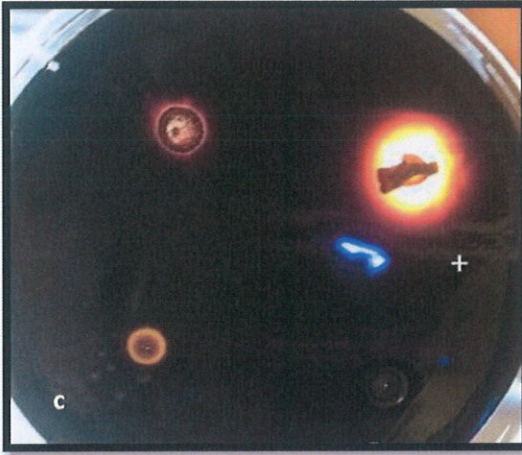
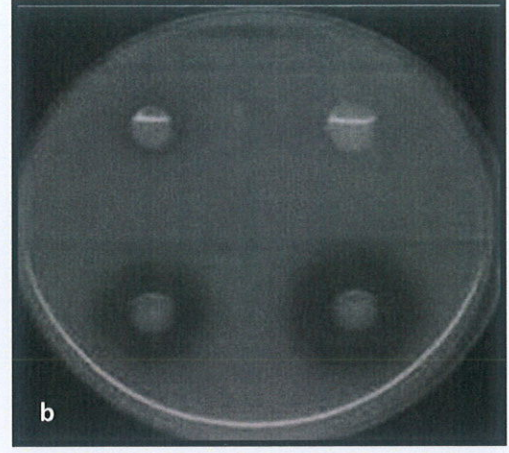


13H	+	+	-	-	-	-
13I	+	+	-	-	-	-
13J	+	+	-	-	B	-
15F	+	-	-	B	B	-
15D	+	+	-	+	-	B

\*B: Belirlenmemiştir

**Tablo 4. 4.** Karanlık alandan izole edilen örneklerin enzim testi sonuçları

Suş Kodu	Katalaz	Proteaz	Amilaz	Lipaz	Üreaz	Jelatinaz
K-1A	+	-	-	-	+	
K-1C	+	-	+	-	+	-
K-1E	+	-	-	+	+	-
K-2A	+	+	+	+	+	+
K-2B	+	-	+	-	+	-
K-2E	-	-	-	+	+	B
K-2G	-	-	-	-	+	-
K-2H	-	-	-	+	+	-
K-2I	+	+	+	+	+	+
K-2J	+	-	-	-	+	
K-2N	+	+	+	-	+	-
K-4B	-	-	+	-	-	-
K-4C	+	-	-	-	-	-
K-4E	+	B	B	B	B	B
K-4G	+	-	-	-	-	-
K-4F	+	B	B	B	B	B
K-7B	+	-	+	+	+	B
K-7K	+	-	+	-	B	-
K-9M	+	-	-	-	+	-
K-11A	+	-	-	+	+	B
K-11D	+	-	-	-	+	B
K-11G	+	-	-	-	+	B
K-12E	+	-	+	B	B	B
K-13B	+	+	+	+	+	-
K-13J	B	B	B	B	B	B
K-13I	B	B	B	B	B	B
K-15A	+	+	+	-	-	-
K-15C	+	+	-	+	-	-
K-15F	+	-	-	+	-	B
K-15G	+	B	-	B	B	B



Şekil 4. 2. Enzim Testleri: a. Katalaz, b. Proteaz, c. Amilaz, d. Lipaz, e. Üreaz, f. Jelatinaz

### 4.3. Antibiyotik MİK Testi Sonuçları

İzole edilen bakterilerin sefpodoksim, vankomisin, ampisilin, gentamisin, rifampisin, klindamisin ve penisilin antibiyotiklerine karşı farklı konsantrasyonlarda gösterdiği direnç MİK testi yapılarak incelenmiştir. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) testi sonucunda 75 izolattan 64 sefpodoksim, 6 rifampisin ve gentamisin, 18 vankomisin, 15 ampisilin, 44 klindamisin, 48' inin penisilin antibiyotiklerine karşı en yüksek konsantrasyonda direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Aydınlık alan örnekleri için MİK testi sonuçları Tablo4.5.' karanlık alan örnekleri için MİK testi sonuçları Tablo 4. 6' da verilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm antibiyotikler için MİK Testi deney fotoğraları Şekil 4. 3'te verilmiştir.

**Tablo 4. 5.** Aydınlık alan suşlarının antibiyotik MİK testi sonuçları

İzolot No	Gram Boyama	Antibiyotikler*						
		Cli	Rif	Gen	Van	Pen	Cpdx	Amp
2A	Gram +	32+	4	32+	0,25	10	32+	32
2B	Gram (+)	32+	2	8	0,5	40+	32+	16
2C	Gram (+)	32+	1	8	32+	40+	32+	16
2D	Gram (-)	32+	4	2	4	40+	32+	32+
2F	Gram (-)	32+	4	0,25	1	40+	32+	0,5
2G-2	Gram (-)	32+	32+	32	0,25	40+	16	32+
2I	Gram(-)	32	32+	0,5	0,5	40+	32	4
2J	Gram(-)	32+	32	0,5	32+	40+	32+	0,5
2L	Gram(+)	32+	4	32+	16	40+	32+	16
2M-2	Gram(+)	8	8	32+	32+	40+	32+	32
2G-1	Gram(-)	32+	32+	4	16	40+	32+	32
4B	Gram(v)	32+	1	2	0,5	40+	32+	0,25
4D	Gram(-)	32	8	16	32+	40+	32+	4
4E	Gram(+)	32	4	2	32+	40+	32+	32+
4F	Gram(+)	32+	16	16	0,25	40+	32+	1
4O	Gram(+)	32+	0,25	32+	8	40+	32+	32
4H	Gram(+)	32+	4	16	32+	40+	32+	32+
4M	Gram(+)	32+	32+	8	4	40+	32+	32+
6B-1	Gram(-)	0,25	32	32	32+	40+	32+	32+
6D	Gram(-)	32+	8	32	32+	40+	32+	16
6I-1	Gram(-)	32+	16	0,25	8	40+	32+	16
7A	Gram (+)	32+	32+	1	32	40+	32+	4
7B	Gram (+)	32+	8	32	1	40+	32+	32
7C	Gram(-)	32+	0,5	4	0,5	40+	32+	32+
7D-1	Gram (-)	32	0,25	2	0,25	2,5	32+	0,25

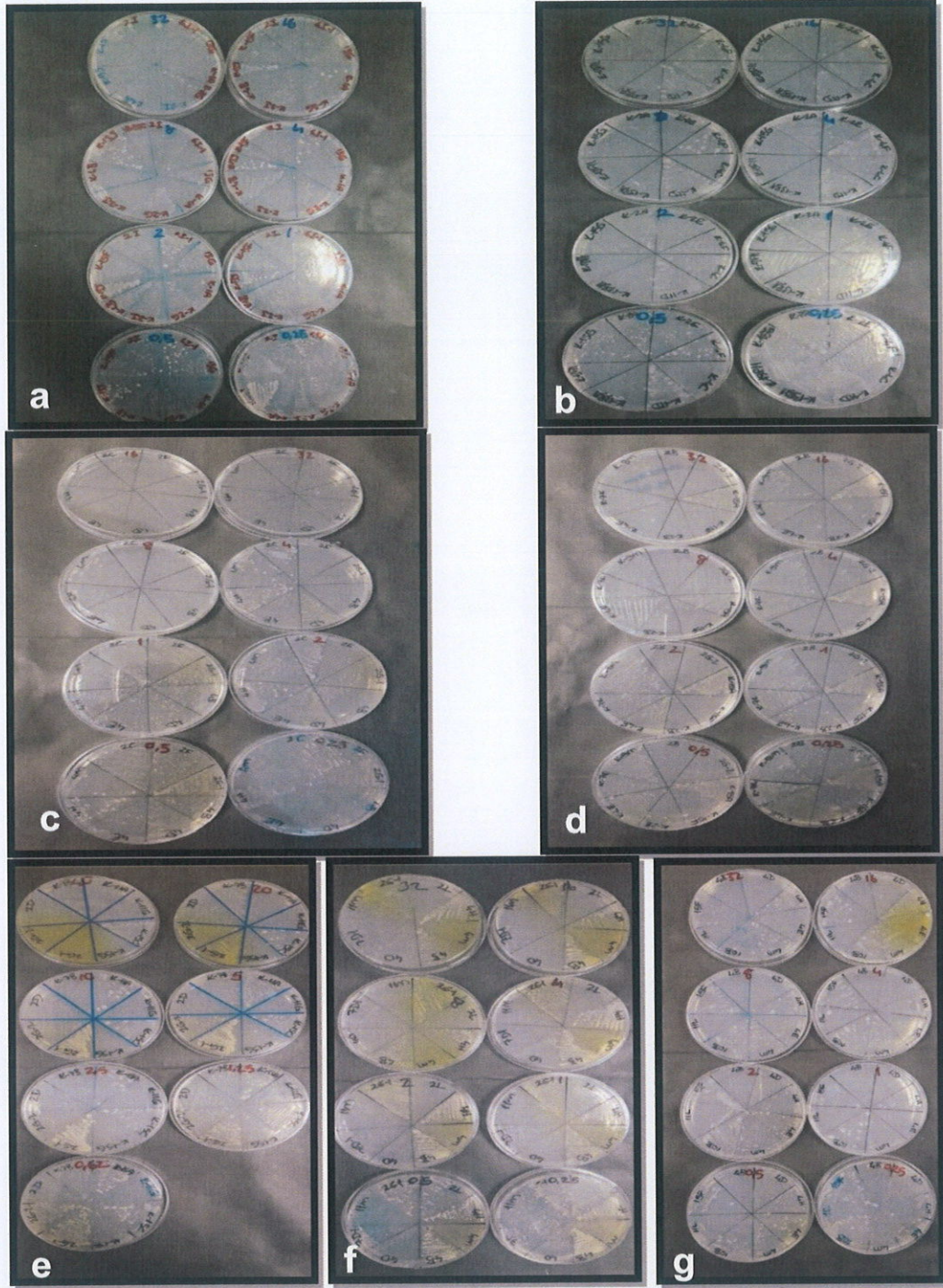
7J	Gram (+)	32+	0,5	4	4	40+	32+	4
9A	Gram(-)	32+	16	0,25	16	40+	32+	1
9D	Gram(-)	32	32	32+	32+	0,25	32+	8
10B	Gram(-)	32	16	4	32	40+	32+	32
11L	Gram (+)	4	0,25	4	8	40+	32+	0,25
11M	Gram(+)	32+	0,25	8	0,25	0,625	4	0,25
12C	Gram(+)	32+	8	4				
12F	Gram (+)	32	8	4	0,5	40+	32+	8
12G	Gram (-)	16	0,25	0,25	0,5	40+	32+	8
12M	Gram (+)	32	16	4	0,25	40+	32+	0,25
13A	Gram (-)	32+	8	4	0,5	0,625	32+	16
13C-1	Gram (-)		16	4	8	40+	32+	16
13G	Gram (-)	32	4	4	8	0,625	32+	32+
13H	Gram (-)	32+	32	8	0,5	40	32+	0,5
13I	Gram (-)	32+	4	4	0,5	20	32+	16
13J	Gram (-)	32	16	8	0,25	40	32+	0,25
15F	Gram (+)	32	8	1	0,25	0,25	32+	0,25
15D	Gram(-)	32+	4	2	0,25	40+	32+	32

\*cli: klindamisin, rif:rifampisin, gen:gentamisin, van:vankomisin, pen: penisilin, cpdx: sefodoksim, amp:ampisilin

**Tablo 4. 6.** Karanlık alan suşlarının antibiyotik MİK testi sonuçları

İzolat No	Gram Boyama	Antibiyotikler*						
		Cli	Rif	Gen	Van	Pen	Cpdx	Amp
K-1A	Gram (+)	0,25	32+	8	32+	1,25	32+	32+
K-1C	Gram (+)	32+	4	16	0,25	40+	32+	32+
K-1E	Gram (-)	0,35	0,25	4	32+	0,625	32+	0,25
K-2A	Gram (-)	32+	0,25	4	0,5	40+	32+	32+
K-2B	Gram (-)	32+	0,25	32	0,5	40+	32+	16
K-2E	Gram (+)	32	4	32	16	40+	32+	32+
K-2G	Gram (-)	32+	1	8	32+	40+	32+	4
K-2H	Gram (-)	32+	0,25	8	0,5	10	0,25	32
K-2I	Gram (-)	32+	8	4	0,5	40+	32+	8
K-2J	Gram(-)	32+	8	4	2	5	32+	0,25
K-2N	Gram (-)	32+	4	4	0,5	0,625	0,25	4
K-4B	Gram(+)	8	16	2	0,25	0,625	32+	0,25
K-4C	Gram(-)	32+	4	2	0,25	40+	32+	32+
K-4E	Gram (-)	0,25	32	4	4	0,625	32+	0,25
K-4G	Gram(-)	32	32	8	16	40+	32+	16
K-4H	Gram(-)	32+	4	4	32+	40+	32+	0,25
K-4F	Gram(-)	32+	16	8	32+	40+	32+	32+

<b>K-7B</b>	Gram (-)	0,25	8	4	32+	40+	32+	0,25
<b>K-7K</b>	Gram (+)	32+	8	2	32+	40+	32+	4
<b>K-9M</b>	Gram(-)	32+	0,25	8	32+	1,25	32+	2
<b>K-11A</b>	Gram(-)	32+	4	4	4	20	32+	8
<b>K-11D</b>	Gram(-)	32+	0,25	8	8	40+	0,25	32+
<b>K-11G</b>	Gram(+)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	32+	0,25
<b>K-12E</b>	Gram(-)	32+	8	32+	8	40+	0,25	32+
<b>K-13B</b>	Gram(-)	0,25	8	0,25	0,25	0,25	32+	0,25
<b>K-13J</b>	Gram(-)	32	0,25	16	0,25	1,25		0,25
<b>K-13I</b>	Gram(-)	32+	8	1	0,25	40	32+	16
<b>K-13F/1</b>	Gram(-)	0,25	32	32+	32+	40+	32+	0,25
<b>K-15A</b>	Gram(-)	32+	32+	32+	0,25	40+	32+	32
<b>K-15C</b>	Gram(-)	32+	0,5	4	0,25	40+	32+	32
<b>K-15F</b>	Gram(-)	8	4	16	0,25	0,625	32+	0,25
<b>K-15G</b>	Gram(-)	32+	0,25	8	0,25	10	0,25	4



Şekil 4. 3.MİK testi deney sonuçları (a: klindamisin, b: rifampisin, c:gentamisin, d:vankomisin, e: penisilin, f: sefodoksim, g:ampisilin)

Antibiyotik MİK testi sonuçlarının değerlendirilmesinde Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) tarafından yayınlanan “Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing” standardı kullanılmıştır. Bu standart genellikle hasta kaynaklı patojenler için değerlendirilmektedir.

Rifampisin, Gram-pozitif bakterilerde DNA’ya bağımlı RNA polimeraz enziminin  $\beta$ -altbirimine bağlanarak etki gösteren bir antibiyotiktir. Bununla birlikte rifampisinin hidrofobik bir bileşik olması nedeniyle dış zardan geçemediği için Gram-negatif bakterilerin çoğunun bu ilaca karşı doğal olarak direnç gösterdiği bilinmektedir (Spratt, 1994). CLSI tarafından belirlenen standartta rifampisin direnci için alt limit konsantrasyonu  $>4 \mu\text{g}/\text{ml}$  olarak belirlenmiştir. Çalışmada MİK testi sonuçlarında belirlenen konsantrasyona göre 39 suşun dirençli olduğu gözlemlenmiştir. 39 dirençli suştan 26’sının Gram negatif, 13’ünün Gram pozitif olduğu görülmüştür. Gram negatif bakterilerin rifampisin antibiyotiğine karşı Gram pozitiflerden daha çok direnç göstermesi beklenen bir sonuçtur.

Gentamisin; amnoglikozid grubu bir antibiyotik olmakla birlikte protein sentezini inhibe ederek bakterisit etki göstermektedir. Bu gruptaki antibiyotikler bakteri ribozomlarının 30S alt birimine bağlanarak kodonda değişikliğe neden olur ve mRNA’nın uygun şekilde bağlanmasını engellemektedir. Bu durum mRNA’nın taşıdığı mesajın yanlış okunmasına neden olmaktadır. Aminoglikozidler dar spektrumlu antibiyotikler olup aerop Gram negatif basiller üzerinde daha çok etkilidirler. Gram pozitifler üzerinde etkilerinin zayıf olduğu bilinmektedir. CLSI tarafından yayınlanan standartta gentamisin direnci için alt limit  $>16 \mu\text{g}/\text{ml}$  olarak belirlenmiştir. MİK testi sonuçlarına göre 75 izolattan 20’sinin gentamisin antibiyotiğine karşı dirençli olduğu görülmüştür. Literatürde belirtilen etkileri ile orantılı olarak gentamisine dirençli 20 izolattan 12’sinin Gram pozitif 8’inin Gram negatif olduğu belirlenmiştir.

Linkozamid grubunda yer alan klindamisin antibiyotiği ise protein sentezini bozarak etki göstermektedir. Bakteri ribozomu 50S alt-birimine bağlanarak aynı yere tRNA molekülünün bağlanmasını ve peptid zincirinin uzamasını önlemektedir. CLSI tarafından yayınlanan standartta gentamisin direnci için alt limit  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  olarak belirlenmiştir. Klindamisin antibiyotiğinin Gram pozitif ve Gram negatif koklara karşı etkili olduğu, Gram negatif basiller üzerinde etkisinin daha az olduğu bilinmektedir.

Yapılan MİK testinde 75 izolattan 40 tanesinin klindamisine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Dirençli suşların 19'unu Gram negatif basiller oluşturmaktadır.

Vankomisin glikopeptid grubunda yer alan bir antibiyotiktir. Bu grupta bulunan antibiyotikler peptidoglikan tabakasındaki peptidil D-alanin- D-alanin ucuna bağlanarak hücre duvarı sentezini daha erken evrelerde inhibe ederek etki gösterirler. Glikopeptid grubu antibiyotiklerin dış membrandan geçemediği ve bu nedenle Gram negatif bakterilerin bu antibiyotiklere karşı doğal olarak direnç gösterdiği bilinmektedir. CLSI tarafından belirlenen standartta vankomisin direnci için alt limit  $>32 \mu\text{g}/\text{ml}$  olarak kabul edilmiştir. MİK testi yapılan suşların 18'i vankomisine dirençli bulunmuştur. Bu suşların 10'unun Gram negatif, 8'inin Gram pozitif olduğu görülmüştür.

Penisilin ve ampisilin ise beta laktam antibiyotikler sınıfında yer almakta olup tüm beta-laktam antibiyotikler; bakterilerde hücre duvarı sentezinden sorumlu penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) transpeptidaz aktivitesini bloke ederek peptidoglikan sentezini engellemek suretiyle etki gösterirler. Bunun sonucunda hücre duvarı sentezi yapılamayan bakteri lizise uğrayarak ölmektedir. Beta laktam ajanlara karşı direnç; beta laktamazlar, PBP değişiklikleri ve dış membran proteinlerindeki değişiklikler sonucu meydana gelmektedir (Mayer vd., 1995) Ampisilin direnci CLSI tarafından  $> 32 \mu\text{g}/\text{ml}$  olarak kabul edilmiştir. Çalışma kapsamında MİK testi yapılan örneklerden 17'sinin ampisilin antibiyotiğine karşı dirençli olduğu görülmüştür. Direnç gösteren örneklerden 6'sını Gram pozitif, 11'ini Gram negatif bakteriler oluşturmaktadır. Penisilin antibiyotiği için ise  $>16 \mu\text{g}/\text{ml}$  konsantrasyon dirençli olarak kabul edilmiştir. MİK testi sonucunda tüm izolatların 55'i penisiline karşı dirençli, 20'si duyarlı bulunmuştur. Çalışmada kullanılan örneklerin büyük çoğunluğunu Gram negatif izolatlar oluşturmaktadır. Beta laktamaz grubu antibiyotiklerin çoğunlukla Gram pozitif bakteriler üzerinde etki göstermesi çalışmada kullanılan örneklerin çoğunluğunun bu gruptaki antibiyotiklere direnç göstermesinde etkili olduğu düşünülmektedir.

Sefpodoksim; sefalosporinler grubunda yer alan bir antibiyotiktir. Bu gruptaki antibiyotikler kimyasal yapıları bakımından ve etki mekanizmaları yönünden penisilinlere benzemektedir. Sefpodoksim direnci için alt limit konsantrasyonu CLSI tarafından  $> 32 \mu\text{g}/\text{ml}$  olarak belirtilmiştir. Çalışma kapsamında MİK testi yapılan 75 örnekten 68'inin sefpodoksim antibiyotiğine karşı dirençli olduğu görülmüştür.



Penisilin ve sefpodoksime karşı dirençli örneklerin sayısının fazla olması hücre duvarı üzerinde etkili antibiyotiklere karşı direnç kazandığını göstermektedir.

Mağara bakterilerinin antimikrobiyal ajanlara direncinin kültür temelli yöntemlerle incelenmesi üzerine 2012'de Lechuguilla Mağarasında yapılan bir çalışma mevcuttur. Çalışmada kullanılan 93 suşun % 33'ünün Gram pozitif % 63'ünün ise Gram negatif olduğu belirlenmiştir. Ortalama olarak, Gram-negatif suşların yaklaşık % 65'i 3-4 antibiyotik sınıfına direnç göstermiştir. Gram pozitif suşlarda %25 ampisilin, %10 sefpodoksim, %15 klindamisin, %15 gentamisin direnci gözlemlenirken vankomisine karşı direnç saptanmamıştır. Gram negatif suşlarda ise %50 ampisilin, %20 sefpodoksim, %60 klindamisin, %20 gentamisin direnci gözlemlenmiştir.

MİK testi sonuçları turizm faaliyetlerine açık olan ve insan girişinin olduğu ortamlarda yaşayan mikroorganizmaların antibiyotik direncin desteklediği görüşü ile orantılıdır. Mikroorganizmaların sahip olduğu antibiyotik dirençli genlerin araştırılması antibiyotik direncinin gelişimini anlamak için önemli sonuçlar sağlayacaktır. Bununla birlikte antibiyotik direnç çalışmalarının mağara ortamlarında yürütülmesi yeni antibiyotiklerin keşfi için de önemli gelişmeler sağlayacaktır.

Mağaralardan izole edilen Aktinomisetler üzerine yapılan bir çalışmada yeni biyoaktif bileşiklere sahip *Streptomyces* suşları izole edilmiştir. Biyoaktif bileşiklerin mağara yüzeylerinde kolonizasyonda etkili olduğu ve diğer mikroorganizmalara karşı avantaj sağladığı düşünülmektedir. Çalışmamızda izole edilen *Rhodococcus erythropolissu* antibiyotik dirençliliğine sahip bir aktinomisetir ve antibiyotik dirençliliğine sahip olma özelliğinin biyoaktif bileşikler gibi kolonizasyonda bir avantaj sağladığı düşünülmektedir (Gibanov vd., 2016 ).

#### **4.4. Mikroorganizmaların Moleküler Düzeyde Tür Tanısı**

MİK Testi sonuçlarına göre en yüksek konsantrasyonda ve çoklu direnç gösteren 10 suş ve negatif kontrol olarak kullanılmak üzere duyarlılık gösteren 3 suş seçilmiştir. Bu seçilen suşların tür tayinleri 16S rRNA gen bölgesine göre yapılmıştır. NCBI kayıt numaraları Tablo 4. 7' de verilmiştir.

**Tablo 4. 7.** Tür tanısı yapılan bakteriler ve NCBI kayıt numaraları

Suş Kodu	Bakteri Türü	NCBI Kayıt Numarası
2G-2	<i>Pseudomonas spp.</i>	MH548897
2J	<i>Pseudomonas jesseni</i>	--
4D	<i>Sphingopyxis fribergensis</i>	MH549184
4M	<i>Microbacterium yannicii</i>	MH794238
6B	<i>Flavobacterium chungangense</i>	MH553177
7A	<i>Rhodococcus spp.</i>	--
9D	<i>Flavobacterium resistens</i>	MH549189
K-1E	<i>Flavobacterium chungangense</i>	MH549208
K-4F	<i>Pseudomonos spp.</i>	MH549212
K-4G	<i>Pseudomonas spp.</i>	MH549227
K11-G	<i>Rhodococcuserythropolis</i>	MH685563
K-15A	<i>Buttiauxella agrestis</i>	MH558274
K-15G	<i>Pseudomonas spp.</i>	MH549406

16S rRNA bölgesine göre gerçekleştirilen tür tayini sonucunda *Pseudomonas spp.*, *Sphingopyxis fribergensis*, *Flavobacterium chungangense*, *Flavobacterium resistens*, *Microbacterium yannicii* ve *Buttiauxella agrestis* türleri saptanmıştır.

*Pseudomonas sp.* türü *Proteobacteria* grubunda yer almakla birlikte *Proteobacteria* grubuna ait türler mağaralarda bulunan en baskın mikroorganizma grubunu oluşturmaktadır. En çok incelenen mağaralardan biri olan İspanya'da bulunan Altamira Mağarası'nda, duvarlardan damlayan sularda *Proteobacteria* grubunun baskın olduğu bildirilmiştir (Schabereiter- Gurtner vd., 2002). Ayrıca *Pseudomonas sp.* türünün doğada özellikle suda ve nemli ortamlarda yaygın olarak bulunduğu bilinmektedir. Magura Mağarasında yapılan çalışmalarda *Pseudomonas* cinsine ait türlerin baskın türler arasında olduğu belirtilmiştir (Tomova vd., 2013). *Pseudomonas* cinsi bakteriler günümüzde fırsatçı infeksiyonlara neden olan önemli gruplardan biri olma özelliğiyle de dikkat çekmektedir.

*Flavobacterium* cinsi üyelerinin çeşitli enzimleri üretebilme potansiyeline sahip olması nedeniyle çevresel yaşam ortamlarında önemli rollere sahip olabileceği

düşünülmektedir (Humphry vd., 2001; Tamaki vd., 2003; Aslam vd., 2005; Zhang vd., 2006). *Flavobacterium resistens* türü çoğu antibiyotik grubuna direnç göstermesi ile dikkat çekmektedir. Polymyxin B, gentamisin, kanamisin, oleandomisin, neomisin, ampisilin, streptomisin, penisillin G, lincomisin, kloramfenikol, tetrasiklin, karbenisilin ve novoniosin antibiyotiklerine direnç gösterdiği bildirilmiştir.

*Rhodococcus* cinsi ise topraktan derin deniz diplerine kadar çok çeşitli ortamlarda yaygın olarak bulunduğu bilinmekle birlikte endüstriyel öneme sahip türleri içermesiyle dikkat çekmektedir. Bazı suşlarının biyosümfaktan maddeler ürettiği bilinmektedir ve fenilalanin dehidrojenaz ve endoglikozidazlar gibi yararlı enzimlerin kaynağıdır. *R. erythropolis* çözücülere toleranslı olması bakımından biyoteknolojik öneme sahip bir türdür (DeCarvalho vd., 2005). *R. eritropolis*, kirlenmiş ortamlarda doğal olarak ortaya çıkabilir, bu nedenle kirli alanların biyoremediasyonunda da kullanılabilir.

Tok (2016) tarafından İnsuyu Mağarasının bakteriyel ve arkeal biyoçeşitliliği üzerine yapılan çalışmada mağara speleotemlerinden izolasyon yapılmış ve bu oluşumlar ile ilişkili olabilecek bakteri ve arkea örnekleri incelenmiştir. Bakteri ve arkea örnekleri mağaranın duvarları, koridorları ve tavanlarından toplanmıştır. Araştırma sonucunda toplam dokuz bakteri sınıfı tespit edilmiştir. En yaygın sınıf *Alfaproteobacteria* olmakla birlikte, temel olarak dört grupta toplanan toplam bakterilerin % 89,23' ünü oluşturmaktadır. Bunlar arasında en yoğun popülasyonların ise *Rhizobiales* (% 88,85) ve *Sfingomonadales* (% 0,21) olduğu belirlenmiştir. *Actinobacteria* (% 3,94), *Bacil* (% 2,92), *Gammaproteobacteria* (% 1,69) ve *Betaproteobacteria* (% 0,74) bu grubu takip etmektedir. Bu çalışma sonucunda 10 sınıftan toplam 14 cins tespit edilmiştir. En baskın olan cinsin, *Rhizobiales* sınıfından *Metilbacterium* olduğu belirlenmiştir (% 88,83). Bunu *Propionibacterium* (% 3,58), *Dolosigranulum* (% 1,69), *Streptococcus* (% 1,10) ve *Pseudomonas* (% 1,13) takip etmektedir (Tok, 2016). Çalışmamızda ise *Pseudomonas spp.* türü baskın olarak tespit edilmiştir.

Slovenya' daki karstik mağara sistemleri şekil ve renk bakımından farklılık gösteren, mağara duvarlarında gözle görülebilen mikrobiyal topluluklara ev sahipliği yapmaktadır. Bu mağara sistemlerinde yapılan çalışmalar sonucunda *Gammaproteobacteria* grubuna ait üyeler baskın olarak tespit edilirken bu grubu

*Actinobacteria* ve *Nitrospira* üyeleri takip etmiştir (Pasic vd., 2009). Karstik mağara örneği olan İnsuyu Mağarasında yürütülen çalışmamızda ise *Gammaproteobacteria* grubunda yer alan *Pseudomonas* cinsine ait türlere sık rastlanırken, *Actinobacteria* filumuna ait *Rhodococcus Erythropolis* türü tespit edilmiştir.

Kuzeydoğu Hindistan'da bulunan Mizoram'daki beş keşfedilmemiş mağarada bakteriyel komünite ve jeokimya üzerine odaklanan bir çalışma yapılmıştır. Toplam bakteriyel komünite analizleri *Actinobacteria*'nin % 65.1'e yakın bulunduğunu, bunu *Proteobacteria* (% 24, 8), *Acidobacteria* (% 4,2) ve *Firmicutes* (% 3,6) gruplarının izlediğini göstermektedir. Çalışma sonuçları bu mağaralarda en baskın bakteri grubunun *Actinobacteria* olduğunu göstermiştir. *Proteobacteria* grubunda *Rhodoplanes*, *Kaistobacter*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium*, *Alteromonas*, *Acidiphilium* ve *Halomonas* cinslerinin yaygın olduğu tespit edilmiştir (DeMandal vd., 2017). Çalışmamızda baskın olarak tespit edilen *Pseudomonas* cinsi bakterilerin Mizoram'da yapılan çalışmalardaki baskınlığının ise % 0,01'in altında olduğu bildirilmiştir.

Marte vd. (2014), tarafından yapılan çalışmada Bahama'daki mağaralardaki mikrobiyal çeşitlilik ve potansiyel patojenler belirlenmiştir. Çalışmada insanların özellikle temas ettikleri yüzeylerden toprak, su ve guano örnekleri toplanmıştır. Mağara içinde yarasalara ve kuş pisliklerine rastlanmıştır. Bu çalışmadaki ana amaç mağarayı ziyaret eden kişileri patojenlere karşı uyarmak ve bilinç oluşturmaktır. Yaptığımız çalışmada ise özellikle mağaranın kendine has mikrobiyal çeşitliliği belirlenmeye çalışılmıştır ve örnekleme özellikle gezi rotası dışından ve insanların direkt temas edemeyeceği noktalardan yapılmıştır. Su, sediment ve mağara duvarı kazıntı ve sürüntüleri çalışma materyalini oluşturmaktadır. Mağarada yarasa ya da kuş varlığına dair bir iz bulunmamıştır.

Brannen-Donnelly ve Engel (2015) tarafından yapılan çalışmada, mağara içi su akışı boyunca belli zaman aralıkları ile örnekleme yapılmış ve mikrobiyal komünitedeki değişiklikler belirlenmiştir. Çalışmamızda komünite değişiklikleri belirlenmesi amaçlanmamıştır.

Oylat mağarasının bakteriyel çeşitliliğinin ve kompozisyonunun belirlenmesine yönelik çalışmada klon kütüphaneleri oluşturularak ana gruplar belirlenmiştir (Gulecal-Pektas, 2016). Bu çalışmada ise bakteriyel çeşitlilik kültüre dayalı yöntemler ile belirlenmiştir.

#### 4.5. Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Antibiyotik direnç genlerinin PZR yöntemi ile belirlenmesi çalışmasının sonuçları Tablo 4. 8' de verilmiştir. Direnç genlerinin MİK Testi sonuçlarıyla karşılaştırılması ise tablo 4. 9' da verilmiştir. Kittinger vd. (2016), tarafından yapılan çalışmada yüzey sularında çoklu direnç gösteren bakterilerin varlığı belirtilerek, Danube nehri'nden *Pseudomonas* izolasyonu yapılmış ve kültüre dayalı yöntemler ile çoklu direnç durumu belirlenmiştir. Bu çalışmada izole edilen 520 *Pseudomonas* izolatının 16 tanesinin 3-5 farklı grup antibiyotiğe dirençliliği belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada çoklu direnç gösteren 5 *Pseudomonas* suşu saptanmıştır.

Çalışmamızda çoklu direnç gösteren 5 suşta bu gen bölgelerinin en az bir tanesi saptanmıştır. Gen bölgelerinin saptandığı çoklu direnç gösteren suşlar *Pseudomonas* sp. (2G-2), *Pseudomonas* sp. (K-4F) , *Pseudomonasjesseni*, *Pseudomonas* sp. (K-4G) ve *Flavobacterium chungangense* 6B'dir.

Molina ve diğ. (2014)tarfından yapılan çalışmada çoklu direnç gösteren *P. putida* HB3267'de direnç genleri araştırılmış ve bu suşta hem kromozomal hem de plazmid kaynaklı gen bölgeleri belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada özellikle rifampisin dirençliliği için plasmid genleri taranmıştır. Çalışmamızda seçilen gen bölgeleri kromozomal kaynaklıdır, plazmidin integrasyonunun varlığı rifampisin dirençliliği için araştırılmıştır. Seçilen gen bölgelerinden bir tanesi *Flavobacterium resistense* (9D)'te belirlenmiştir. Bu suş kültürel yöntemlerde rifampisin dirençli olarak değerlendirilmemiştir. Negatif kontrol olarak değerlendirilen *Rhodococcus erythropolis* (K-11G) suşunda plazmid kaynaklı rifampisin gen bölgesi belirlenmiştir.

Rifampisin dirençli suşların %90'nından fazlasında direnç *rpoB* geninin 81 baz çiftlik bir bölgesindeki mutasyonal değişim ile gerçekleşmektedir (Andre vd., 2017; Cai vd., 2017; Fonseca vd., 2008). Bununla birlikte direnç *arr* genlerinin bakteriler arasında geçişi ile de kazanılabilmektedir. Kazanılan *Arr* genleri rifampisini inaktive eden ADP-ribosiltransferaz enzimini kodlamaktadır. *Arr* genlerinin varlığı yüksek konsantrasyonlarda (>32 µg/ml) rifampisin varlığına karşı direnç sağlamaktadır (Fonseca vd., 2008). Çalışmamızda kültürel yöntemler ile rifampisin dirençli olarak belirlen 3 suşta *arr* genleri belirlenememiştir. Bu suşlarda direncin *rpoB* genindeki mutasyon ile sağlandığı düşünülmektedir.

Hastane atık suyundan izole edilen *E. coli* suşları ile yapılan çalışmada sefalosporin direnç genlerinden *blaCTX-M* ve *blaTEM* en sıklıkla belirlenirken, *blaSHV* ve *blaOXA-1* genlerine de rastlanmıştır (Chandran vd., 2014). Çalışmamızda çoklu direnç gösteren 10 suşun 8'nde *bla* genlerine rastlanmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan kültürel yöntemlerle vankomisin ve sefodoksin dirençli olarak belirlenen *Flavobacteriumchungangense* K-1E'de *blaSHV*, *blaOXA-1* ve klindamisin ve penisilin dirençli *Pseudomonas* sp. K-15G'de *blaSHV* genleri belirlenmiştir. Bu genler beta laktamazı kodlayan genlerdir.

**Tablo 4. 8.** Tür tanılaması yapılan suşlarda saptanan antibiyotik direnç genleri

Gen Bölgeleri	SUŞLAR													
	2G-2	K-4F	2J	K-4G	4D	4M	K15A	6B	7A	9D	K-1E	K-11G	K-15G	
aac (3)-IIa	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
aac (6)-Ib	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	X	
aph A1	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	
aph A2	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
aadB	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bla <sub>TEM</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bla <sub>SHV</sub>	-	-	X	-	-	X	X	-	X	-	X	-	-	
bla <sub>CTX M-3</sub>	-	-	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	
bla <sub>OXA1</sub>	-	-	X	X	-	-	X	X	-	X	-	-	-	
bla <sub>OXA7</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bla-TEM2	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bla-SHV2	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	
bla-CTX-M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
strA'	-	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	
strA	-	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
arr2-int2aint6b	-	-	X	X	-	-	X	-	-	-	-	-	X	
arr(4)-CATB3arr(4)-INB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	-	
arr(4)-INBarr(5)-INF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
vanA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	
vanB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	
vanC	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	

**Tablo 4. 9.** PZR ile saptanan direnç genlerinin MİK testi sonuçları ile karşılaştırılması

SUŞLAR	SAPTANAN GENLER	MİK TESTİ SONUCU
2G-2	aadB, aph A2, vanC	Cli, Rif, Gen, Pen, Cpdx, Amp
K-4F	aac(3)- IIA, aadB, strA	Cli, Van, Pen, Cpdx, Amp
2J	aadB, bla <sub>SHV</sub> , bla <sub>ctx M-3</sub> , bla <sub>oxa 1</sub> , bla <sub>tem 2</sub> , bla <sub>shv2</sub> , strA, arr2-int2a int6B	Cli, Rif, Van, Pen, Cpdx
K-4G	aadB, bla <sub>ctx M-3</sub> , bla <sub>oxa 1</sub> , bla <sub>shv2</sub> , str A', str A, arr2-int2a int6B, vanC	Cli, Pen, Cpdx
4D	bla <sub>ctx M-3</sub>	Cli, Van, Pen, Cpdx
4M	bla <sub>SHV</sub> , str A'	Cli, Rif, Pen, Cpdx, Amp
K-15A	aac(6)-Ib, aph A1, bla <sub>OXA1</sub> , arr2-int2a int6B, bla <sub>SHV</sub>	Cli, Rif, Gen, Pen, Cpdx, Amp
6B	Aph A1, bla <sub>ctx M-3</sub> , bla <sub>oxa 1</sub> , str A'	Van, Pen, Cpdx, Amp
7A	bla <sub>SHV</sub>	Cli, Rif, Pen, Cpdx, Van
9D	bla <sub>oxa 1</sub> , arr(4)-CATB 3, arr(4)-INB, vanA, vanB	Cli, Rif, Gen, Van, Cpdx
K-1E	bla <sub>SHV</sub> , bla <sub>oxa 1</sub> , vanA, vanB	Van, Cpdx
K-15A	arr(4)-CATB 3, arr(4)-INB, vanB	Cpdx
K-15G	aac(6)-Ib, bla <sub>shv2</sub> , arr2-int2a int6B, vanC	Cli, Pen

Chandrasekaran ve Lalithakumari (1998) tarafından yapılan çalışmada, topraktan izole edilen *Pseudomonas fluorescens* CAS 102 suşundan izole edilen pSCL plasmidinin *E. coli*'ye aktarılması sonucunda yapılan testlerde direnç mekanizmasının antibiyotik hücre içine alınmasının engellenmesi ile de gerçekleştiği belirtilmiştir. Çalışmamızda plazmid izolasyonu ve aktarılması yapılmamıştır. Bununla beraber plazmid kaynaklı intron bölgeleri ve genler belirlenmiştir (Tablo 4. 9).

Houang vd. (2003) yaptıkları çalışmada dizi analizi sonucunda, rifampin ADP-ribosiltransferaz (*Arr-2*), aminoglikozidasetiltransferaz (*Aac(6')*) ve sınıf II integron gen bölgelerinin gen bölgelerinin aynı gen kasetinde bulunduğunu belirlemişlerdir. Bu durumun çoklu direnci arttıracak düşünülmemektedir. Yaptığımız çalışmada *Buttiaouella agrestis* K-15A'da her iki gen bölgesi de belirlenmiştir.



Klinik örneklerden izole edilen 67 adet *P. aeruginosa* suşunun 14 tanesi test edilen beta-laktamazlara ve aminoglikozidlere karşı dirençli bulunmuştur. Yapılan çalışmada iki suş sınıf I integron için pozitif bulunmuştur (Budak vd., 2012).

Miele vd. (1995), yılında yapılan çalışmada Enterokoklar için vankomisin direnç genleri için spesifik primerler tasarlanmıştır. Yaptığımız çalışmada kullanılan primerler gen bölgesi spesifik primerlerdir.

## 5. SONUÇ

Çalışma sonucunda İnsuyu Mağarasının mikrobiyolojik açıdan tanımlanmış ve mağara bakterilerinin biyoteknolojik potansiyelleri ortaya koyulmuştur. Biyokimyasal test sonuçları mağaralar gibi aşırı çevrelere adapte olmuş mikroorganizmaların çeşitli enzimlerin üretimini destekleyebildiklerini göstermektedir. Antibiyotik duyarlılık testi ve moleküler yöntemler ile gen bölgelerinin taranması sonuçları ise doğrudan antibiyotik maruziyetinin olmadığı ortamlarda da bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda İnsuyu Mağarasının insan erişimine açık bir mağara olması mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara karşı direnç kazanmasında insan faaliyetlerinin etkili olduğu fenomeni ile tutarlıdır.

Mağaralar yeni biyoaktif bileşiklerin bulunması için kaynak olarak görülmektedir. Çalışmamızda antibiyotik dirençliliği yüksek suşlar arasında özellikle aktinomisetlerin de bulunması bu suşların biyoaktif bileşikler yönünden de değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Mağaradan izole edilen suşlar ile yeni biyoaktif bileşiklerin belirlenmesi çalışmaları için değerli bir koleksiyon oluşturulmuştur.

Biyoteknolojik çalışmaların mağaralar gibi aşırı ortamlarda yürütülmesinin enzimler, antibiyotikler gibi sekonder metabolitlerin üretilmesinde ve antibiyotik gen kaynaklarının araştırılmasında katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Andre, E., Goeminne, L., Cabibbe, A., Beckert, P., Kabamba, B., Mathys, V., Gagneux, S., Niemann, S., Ingen, J., Cambau, E., 2017. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated rpoB gene mutations in pathogenic mycobacteria, *Clinical Microbiology and Infection*, 23, 167- 172.
- Angert, E., Northup, D., Reysenbach, A., Peek, A., Goebel, B., & Pace, N., 1998. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave. *Amerikan Mineralogist*, 83, 1583-1592.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji (Cilt 49). Medisan Yayın Serisi.
- Banfield, J., Nealson, K., 1997. Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals, 35, Washington.
- Bariş, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlataşı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 135.
- Barlow, H., Hall, B., 2002. Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years, *Journal of Molecular Evolution*, 55, 314-21.
- Barr, T., 1968. Cave Ecology and the Evolution of Troglodites. *Evolutionary Biology*, 2, 35-102.
- Barton, H., Jurado, V., 2007. Whats Up Down There? Microbial Diversity in Caves. 132-138.
- Barton, H., Luiszer, F., 2005. Microbial metabolic structure in a sulfidic cave hot spring: Potential mechanisms of biospeleogenesis. *Journal of Cave and Karst Studies*, 67, 28-38.
- Barton, H., Northup, D., 2007. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69, 163-178.
- Beveridge, J., Urrutia, M., Terrance, J., 1994. Formation of fine-grained metal and silicate precipitates on a bacterial surface (*Bacillus subtilis*), *Chemical Geology*, 116, 261-280.
- Bhullar, K., 2011. Investigation of Antibiotic Resistance in Isolated Lechuguilla, M. Sc. Thesis McMaster University, Department of Biochemistry .

- Boquet, E., Boronate, A., Ramos-Cormenzana, A., 1973. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon, *Nature*, 246, 527-529.
- Bosak, T., Newman, D., 2005. Microbial Kinetic Controls on Calcite Morphology in Supersaturated Solutions, *Journal of Sedimentary Research*, 75, 190-199.
- Bosak, T., Newman, D., 2005. Microbial nucleation of calcium carbonate in the Precambrian. *Geology*, 31, 577-580.
- Brannen-Donnelly, K., Engel, A.S., 2015. Bacterial diversity differences along an epigenic cave stream reveal evidence of community Dynamics, succession and stability, *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Budak, F., Kasap, M., Kolaylı, F., Karadenizli, A., Vahapoğlu, M., 2012. Integron-associated resistance genes among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42, 149-156.
- Bullen, H., Oehrle, S., Bennett, A., Taylor, N., Barton, H., 2008. Use of Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy To Identify Microbial Metabolic Products on Carbonate Mineral Surfaces, *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (14), 4553-4559.
- Cai, X., Xi, H., Liang, L., Liu, J., Liu, C., Xue, Y., Yu, X., 2017. Rifampicin-Resistance Mutations in the rpoB Gene in *Bacillus velezensis* CC09 have Pleiotropic Effects, *Frontiers in Microbiology*, 8: 178.
- Cappuccino, J., Sherman, N., 2007. In: *Microbiology A Laboratory Manual*. TATA rt. Printers, India.
- Chandrasekaran, S., Lalithakumari, D., 1998. Plasmid-mediated rifampicin resistance in *Pseudomonas fluorescens*, *Journal of Medical Microbiology*, 47, 197-200.
- Carattoli, A., 2002. Use of a Light Cycler *gyrA* mutation assay for identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter coli*, *FEMS Microbiology Letters*, 214, 87-93.
- Castainer, S., Le Metayer-Levrel, G., Perthuisot, J., 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis-the microbiogeologist point of view, *Sedimentary Geology*, 126, 9-23.
- Caumartin, V., 1963. Review of the microbiology of underground environments, *National Speleological Society*, 25, 1-14.
- Cavicchioli, R., Charlton, T., Ertan, H., Mohd Omar, S., Siddigui, K., Williams, T., 2011. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial Biotechnology*, 4, 449-60.

- Cheeptam, N., Sadoway, T., Rule, D., Watson, K., Moote, P., Soliman, L., 2013. Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. *International Journal of Speleology*, 35-47.
- Chelius, M.K., Moore J.C., 2004. Molecular phylogenetic analysis of archaea and bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*. 21, 123-34.
- Christensen, W., 1946. Urea Decomposition as a Means of Differentiating Proteus and Paracolon Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *Journal of Bacteriology*, 52, 461-466.
- Culver, D.C., Pipan, T., 2009. The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats. *Acta Carsologica*, 38, 168.
- Cushnie, T., Lamb, A., 2006. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, 181.
- Danielli, H., Edington, M., 1983. Bacterial calcification in limestone caves, *Geomicrobiology Journal*, 3, 1-16.
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, 417-33.
- DeCarvalho, C., 2011. Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes. *Biotechnology Advances*, 25, 75-83.
- DeLong, E., 1999. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8, 649-654.
- DeManda, S., Chatterjee, R., Kumar, N.S., 2017. Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiology*, 17, 90. Docampo, S., Trigo, M., Recio, M., Melgar, M., Garcia-Sanchez, J., Calderon-
- Ezquerro, M., 2010. High incidence of *Aspergillus* and *Penicillium* spores in the atmosphere of the cave of Neija (Malaga, Southern Spain). *Aerobiologia* , 26, 89-98.
- Douglas, S., Douglas, D., 2001. Structural and Geomicrobiological Characteristics of a Microbial Community from a Cold Sulfide Spring. *Geomicrobiology Journal*, 18, 401-422.
- Du, Y., Shi, P., Huang, H., Zhang, X., Luo, H., Wang, Y., 2013. Characterization of three novel thermophilic xylanases from *Humicola insolens* Y1 with application potentials in the brewing industry. *Bioresour Technol*, 130, 161-167.

- Engel, A., Porter, M., Kinkle, B., Kane, T., 2001. Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, *Geomicrobiology Journal*, 18, 369- 372.
- Engel, A.S., 2010. Microbial diversity of cave ecosystems. *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*, Springer, Netherlands, 219–238.
- Fonseca, E. L., Freitas F., Amorim, J. C., Vicente, C. P., 2008. Detection of New *arr-4* and *arr-5* Gene Cassettes in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* Strains from Brazil, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 1865–1867.
- Ford, D., Williams, P., 2007. Karst Hydrogeology and Geomorphology, 562.
- Gabriel, C., Northup, D., 2013. Microbial ecology: caves as an extreme. Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery, 85–108.
- Gianese, G., Argos, P., Pascarella, S., 2001. Structural adaptation of enzymes to low temperatures, *Protein Engineering*, 14, 141-148.
- Goodfellow, M., Fiedler, H., 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematic, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98, 119-142 .
- Groth, I., Schumann, P., Laiz, L., Sanchez-Moral, S., Canaveras, J.C. and Saiz-Jimenez, C., 2001. Geomicrobiological Study of the Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy, *Geomicrobiology Journal*, 18, 241-258.
- Grupta, R., Beg, Q., Lorenz, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 15-32.
- Gulecal-Pektas, Y., 2016. Bacterial diversity and composition in Oylat Cave (Turkey) with combined Sanger/ Pyrosequencing approach, *Polish Journal of Microbiology*, 65, 69–75.
- Hardiman, E., Gibbs, M., Reeves, R., Bergquist, P., 2010. Directed Evolution of a thermophilic beta-glucosidase for Cellulosic Bioethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161, 301-312.
- Harley, J., Prescott, L., 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, The McGraw-Hill Companies.
- Hisano, T., Abe, S., Wakashiro M., Kimura, A., Murata, K., 1989. Isolation and properties of a collagenase with caseinolytic activity from a *Pseudomonas sp.* *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 68, 399-403.
- Hose, L., Palmer, A., Palmer, V., Northup, D., Boston, P., DuChene, H., 2000. Microbiology and geochemistry in a hydrogen-sulphide-rich karst environment. *Chemical Geology*, 169, 399-423.

- Houang, E., Chu, Y., Lo, W., Chu, K., Cheng, A., 2003. Epidemiology of Rifampin ADP-Ribosyltransferase (*arr-2*) and Metallo- $\beta$ -Lactamase (*blaIMP-4*) Gene Cassettes in Class 1 Integrons in *Acinetobacter* Strains Isolated from Blood Cultures in 1997 to 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 1382–1390.
- Howarth, F., 1993. High-stress subterranean habitats and evolutionary change in cave-inhabiting arthropods. *The American Naturalist*, 142, 65-67.
- Hoyos, Lascano., 1988. Nutritive value and preference for native forage species on the well drained savannas in the Eastern Llanos of Colombia, *Pasturas Tropicales*, 2-7.
- Hughes, V., Datta, N., 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature*, 302, 725- 726.
- Jones, B., 2001. Microbial activity in caves: A geological perspective. *Geomicrobiology Journal*, 18, 345-357.
- Jones, B., Motyka, A., 1987. Biogenic structures and micrite in stalactites from Grand Cayman Island, British West Indies. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 24, 1402-1411.
- Kay, S., Cheeptham, N., 2013. Screening for antimicrobial activities of cave actinomycetes against honeybee pathogen. *Chiang Mai Journal of Science*, 40, 26-33.
- Kittinger, C., Lipp, M., Baumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., Liebmann, A., Grisold, A. J., Farnleitner, A., Kirschner, A., Zarfel, G., 2016. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. *Frontiers in Microbiology*, 7, 586.
- Knapp, C., McCluskey, S., Singh, B., Campbell, C., Hudson, G., Graham, D., 2011. Antibiotic Resistance Gene Abundances Correlate with Metal and Geochemical Conditions in Archived Scottish Soils. *PLOS One*, 6, 11.
- Konhauser, K., 1997. Bacterial iron biomineralisation in nature. *FEMS Microbiology Reviews*, 20, 315–326.
- Kujumgiev, A., Serkedjieva, Y., Tsvetkova, I., Popov, S., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 235-40.
- Kumar, C.G., Takagi, H., 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17, 561–594.

- Lee, I., Liu, J., Lin, C., Oyama, K., Chen, C., Chen, C., 2012. Ionospheric plasma caves under the equatorial ionization anomaly, *Journal of Geophysical Research*, 117, 1-9.
- Lee, S. H., Jeoni, H., Lee, K. J., 2011. Evolution of TEM Beta-lactamase genes identified by peR with newly designed primers in Korean clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 7, 88-102.
- Lee, N. M., Meisinger, D.B., Aubrecht, R., Kovacik, L., Saiz-Jimenez, C., Baskar, S., Baskar, R., Liebl, W., Porter, M. L., Engel, A.S., 2012. Caves and Karst Environments, Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival. *Centre for Agriculture and Bioscience International*, 320-343.
- Levy, S., 2002. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 25-30.
- Li, Y., Niu, D.; Zhang, L.; Wang, Z.; Shi, G, 2013. Purification, characterization and cloning of a thermotolerant isoamylase produced from *Bacillus* sp. CICIM 304. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40, 437– 446.
- Loenstam, H., Weiner, S., 1989. On Biomineralization, New York: Oxford University Press, 16.
- M, B., 1996. Master's Thesis. Infiltration pathways at Carlsbad Caverns National Park determined by hydrogeologic and hydrochemical characterization and analysis, Colorado.
- Macalady, J., Jones, D., Lyon, E., 2007. Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environmental Microbiology*, 1402-1414.
- Man, B., Wang, H., Xiang, X., Wang, R., Yun, Y., Gong, L., 2015. Phylogenetic diversity of culturable fungi in the Heshang Cave, Central China, *Frontal Microbiology*, 6, 1158.
- Marte, M.G., Reed, D. L., Soto-Centeno, J. A, 2014. Identification of Microbial Diversity and Potential Pathogens in Bahamian Caves. *Journal of Undergraduate Research*, 15(3).
- Miele, A., Bandera, M., Goldstein, B.P., 1995. Use of Primers Selective for Vancomycin Resistance Genes To Determine *van* Genotype in Enterococci and To Study Gene Organization in VanA Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 1772–1778.
- Mir, R. A., Weppelmann, T.A., Johnson, J.A., Archer, D., Morris, J. G., Casey, K., Jeong, I., 2016. Identification and Characterization of Cefotaxime Resistant Bacteria in Beef Cattle. *Plos One*, 9



- Montville, T. J., 1983. Dual-substrate plate diffusion assay for proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 200-204.
- Nigam, P., Pandey, A., Prabhu, K., 1987. Cellulase and ligninase production by Basidiomycetes culture in solid-state fermentation, *Biological Wastes*, 20, 1-9.
- Nigam, P., Pandey, A., 2009. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, Publisher Springer Science Business Media B.V., 1-466.
- Northup, D., Lavoie, K., 2001. Geomicrobiology of Caves: A Review. *Geomicrobiology Journal*, 18, 199- 222.
- Northup, D., Barns, S., Yu, L., Spilde, M., Schelble, R., Dano, K., 2003. Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves, *Environmental microbiology*, 5, 1071- 1086.
- Nováková, A., 2009. Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system, Slovak Karst National Park, Slovakia. *International Journal of Speleology*, 38, 71-82.
- Ortiz, M., Neilson, J.V., Nelson, W.M., Legatzki, A., Byrne, A., Yu, Y., Wing, R.A., Soderlund, C.A., Pryor, B.M., Pierson, L.S., Maier, R.M., 2013. Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns. *Microbial Ecology*, 65 , 371-38.
- Ozansoy, C., Mengi, H., 2006. *Mağarabilimive Mağaracılık*, Ankara: Tübitak Popüler Bilim Kitapları.
- Paksuz, S., Ozkan, B., Postawa, T., 2007. Seasonal changes of cave-dwelling bat fauna and their relationship with microclimate in dupnisa cave system (Turkish Thrace). *Acta Zoologica Cracoviensia*, 50, 57-66.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R.; Soccol, V.T.; Singh, D.; Mohan, R., 2000. Advances in Microbial Amylases, *Biotechnological Applied Biochemistry*, 31, 135-152.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C., P., N., 1999. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes, *Current Science*, 77, 149-162.
- Pasic, L., Kovce, B., Sket, B., Herzog-Velikonja, B., 2009, Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiology Ecology*, 71 , 50-60.
- Poulson, T., Lavoie, K., Wilkens, H., Culver, D., Humphreys, W., The trophic basis of subsurface ecosystems. *Ecosystems of the World 30: Subterranean Ecosystems*, 231-249.
- Rajput, Y., Biswas, J., Rai, V., 2012. Potentiality test in antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of subterranean *Streptomyces* strains isolated from

- Kotumsar Cave of India. *The International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6, 53-60.
- Rautela, R., Rawat, S., Rawat, R., Verma, P., Bhatt, A., 2017. Microbial diversity of Gumki cave and their potential role in enzyme production. *Environment Conservation Journal*, 18, 115-122.
- Reddivari, M., Chirumamilla, R., Nigam, P., 2002. Understanding lipase stereoselectivity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 81-97.
- Riquelme, C., Hathaway, J., Dapkevicius, M., Miller, A., Kooser, A., Northup, D., 2015. Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions. *Frontiers Microbiology*, 6, 1342.
- Romero, A., 2009. *Cave Biology: Life in Darkness*, Cambridge University Press, 1334-1336.
- Russell, N., 1998., Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 61, 1-21.
- Saiz- Jimenez, C., Hermosin, B., 1999. Thermally assisted hydrolysis and methylation of dissolved organic matter in dripping water. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 49, 337-347.
- Sallstedt, T., Ivarsson, M., Lundberg, J., 2014. Speleothem and biofilm formation in a granite/dolerite cave, Northern Sweden. *International Journal of Speleology*, 43, 305-313.
- Samad, M., Razak, C., Salleh, A., Yunus, W., 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 9, 51-56.
- Sand, W., 1997. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates—A general mechanistic overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40, 183-190.
- Sarbu, S., Kane, T., Kinkle, B., 1996. A Chemoautotrophically Based Cave Ecosystem. *Science*, 272, 1953-1955.
- Satyanarayana, T., Raghukumar, C. and Shivaji, S., 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, 89, 78-90.
- Schabereiter- Gurtner, C., Pinar, G., Saiz-Jimenez, C., Rölleke, S., 2002. Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiology Letters*, 211, 7-11.

- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., Pandey, A., 2006.  $\alpha$ -amylases from microbial sources- An overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 173–184.
- Spear, J., Barton, H., Roberts, K., Francis, C., Pace, N., 2007. Microbial biofabrics in a geothermal mine adit, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6172-6180.
- Spector, W., Porter, J., Mello, G., 2012. Antibiotics Literary Licensing. Handbook Of Toxicology, 2.
- Stankovic, N., Radulovic, V., Petkovic, M., Vuckovic, I., Jadranin, M., Vasiljevic, B., 2012. Streptomyces sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1217-31.
- Şen, M., Bayburt , C., Aydın, .S, Onder N.I., Incesu, Z., Atli, B., Yamac, M., 2011. Düz kır Mağarasından (Aladağlar) Elde Edilen Bakteri İzolatlarının Biyolojik Aktiviteleri, 5. Ulusal speleoloji sempozyumu, 18-21 Mart, İstanbul.
- Tamaki, H., Hanada, S., Kamagata, Y., Nakamura, K., Nomura, N., Nakano, K., Matsumura, M., 2003. Flavobacterium limicola sp. nov., a psychrophilic, organic-polymer-degrading bacterium isolated from freshwater sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 519–526.
- Teixeira, B., Rodulfo, H., Carreno N., Guzman, M., Salazar, E., De Donato, M., 2016. Aminoglycoside Resistance Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cumana, Venezuela. *The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 58, 13.
- Tenover, F., Hugles, J., 1996. The challenges of emerging infectious diseases development and spread of multiply resistant bacterial pathogens. *The Journal of the American Medical Association*, 275, 300-304.
- Tok, E., 2016. The Bacterial and Archeal Biodiversity of Insuyu Cave, M. Sc. Thesis. İstanbul Technical University, Eurasia Institute of Earth Sciences, İstanbul, Türkiye.
- Tomova, I., Lazarkevich, I., Tomova, A., Kambourova, M., Vasileva-Tonkova, E., 2013. Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria. *International Journal of Speleology*, 42, 65-76.
- Tyson, G., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E., Ram, R., Richardson, P., 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* , 37-43.

- Sharma, J., Sharma, M., Ray, P., 2010. Detection of TEM & SHV genes in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital from India. *Indian Journal of Medical Research*, 132, 332-336.
- Walsh, C., 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance, *Nature*, 406, 775-781.
- Warthmann, R., Lith, Y., Vasconcelos, C., McKenzie, J., Karpoff, A., 2000. Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiments. *Geology*, 28, 1091-1094.
- White, M., 2013. Living in a Bacterial World: Antibiotic-Resistant Bacteria Everywhere Pacific Standard. [online]. Available from <http://www.psmag.com/science/living-bacterial-world-66260/>
- Woese, C., Kandler, O., Wheelis, M., 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 4576-4579.
- Wu, Y., Tan, L., Liu, W., Wang, B., Wang, J., Cai, Y., 2015. Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China. *Frontiers Microbiology*, 6, 244.
- Yamaç, M., 2008. Bir Mikrobiyoloğun Gözü ile Karstik Mağaralar. 4. Ulusal Speleoloji Sempozyumu, Ankara, 135-154.
- Yücel, S., Yamaç, M., 2010. Selection of streptomyces isolates from Turkish karstic caves against antibiotic resistant microorganisms, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology*, 23.
- Zhang, R., Yip, V.L.Y., Withers, S.G., Mander, L., Liu, H. W., 2010. Mechanisms of enzymatic glycosyl transfer, *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, 385- 492.
- Zhou, J. P., Gu Y.Q., Zou C. S., Mo M., 2007. Phylogenetic Diversity of Bacteria in an Earth-Cave in Guizhou Province, Southwest of China. *Journal of Microbiology*, 45, 105-12.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Fatma Seçil KOÇ  
Doğum Yeri ve Yılı : Afyonkarahisar- 1992



<u>Eğitim Durumu</u>		<u>Yıl</u>
Lise	: Afyonkarahisar Sandıklı Anadolu Lisesi	2006- 2011
Lisans	: Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi	2011- 2015

### **Bilimsel Toplantı, Kongre ve Sempozyum Sunumları**

- 1. Fatma Seçil KOÇ**, Nermin SARIGÜL, 2016. “Mağaralardaki Mikrobiyal Biyoçeşitlilik”, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Akademik Gelişim Günleri 10-12 Mayıs 2016, Burdur
- 2. Fatma Seçil KOÇ**, Nermin SARIGÜL, 2017. “Biochemical Characteristics of Gram Positive Bacteria from İnsuyu Cave”, International Ecology Symposium (Poster Presentation), Erciyes Üniversitesi, 11-13 Mayıs 2017, Kayseri.
- 3. Fatma Seçil KOÇ**, Nermin SARIGÜL, 2018. ‘İnsuyu Mağarasından İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Dirençliliğinin İncelenmesi’, International Health Science and Life Congress (Oral Presentation), Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, 2-5 Mayıs 2018, Burdur.
- 4. Fatma Seçil KOÇ**, Nermin SARIGÜL, 2018. ‘İnsuyu Mağarasından İzole Edilen Bakterilerin Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi’ , International Health Science and Life Congress (Poster Presentation), Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, 2-5 Mayıs 2018, Burdur.