



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**MAĞARACILIK AKTİVİTELERİNİN MAĞARA MİKROBİYAL
ÇEŞİTLİLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Nahdhoit AHAMADA RACHID

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

Ocak, 2021

İSTANBUL



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**MAĞARACILIK AKTİVİTELERİNİN MAĞARA MİKROBİYAL
ÇEŞİTLİLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Nahdhoit AHAMADA RACHID

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

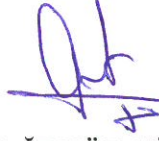
**DANIŞMAN
Doç. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR**

Ocak, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 22.01.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

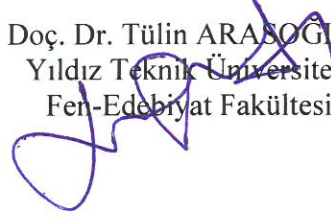


Doç. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ayten KİMİRAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 35041 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

İlk olarak, bu yolculuk boyunca sadece bir danışman değil, aynı zamanda bir öğretmen, eğitmen ve özellikle bir arkadaş olarak, sevgili ve sevgi dolu benim değerli hocam Doç. Dr. Nihal Doğruöz Güngör'e çok teşekkür etmek istiyorum. Onun nezaketi, cesareti ve adanmışlığı, akademik ve profesyonel kariyerim hatta hayatım boyunca ödemem gereken bir borç olarak kalacak. Hiçbir zaman onun emeğini ödeyemem.

İkincisi bugün bu aşamaya gelmemde büyük rol oynayan, sevgi dolu değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem Arslan Aydoğdu'ya nasıl teşekkür edeceğimi bilemiyorum. Emeğini sonsuza kadar ödeyemem.

Beni bu bölümde ilk kez karşılayan bölüm başkanımız Prof. Dr. Ayten Kimiran'a sevgi ve saygılarımı sunuyorum. Onun yardımlarını asla unutmayacağım ve profesyonel kariyerim boyunca hep ondan ilham alacağım.

Bölümde, laboratuvarı, ne zaman yardıma ihtiyacım olsa yanımda bulduğum yardım sever, değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Nazmiye Özlem ŞANLI'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Türkiye'ye gelmek için kapıyı açanlara, beni becerilerime ve yeteneklerime inanarak seçenlere, yüksek lisans derecem boyunca beni mali olarak destekleyen, değerli Türkiye Bursları'na teşekkürlerimi iletiyorum.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde emeği olan başta Alper Utku, Ümit Günhan ve Eray Güngör olmak üzere yaptıkları işbirliğinden dolayı ANADOLU SPELEOLOJİ GRUBU DERNEĞİ'ne (ASPEG) teşekkür ederim.

Şu anda buradan çok uzakta beni ahlaki olarak cesaretlendirmeye devam eden bana ve becerilerime inanmaya devam eden iki sevgili ebeveynim AHAMADA RACHID'e ve ECHATA BINTI IBOUROI' e hitap etmeden sözlerimi bitiremem. Her şeyden önce cesaretlerinden ilham aldığım ve her şeyden önce benimle gurur duymalarını isteyerek çalıştığım bu çalışmayı onlara adıyorum. Aramızda bizi ayıran kilometre ne olursa olsun beni her zaman desteklemeye devam edeceklerini biliyorum ve ne kadar teşekkür etsem de haklarını ödeyemeyeceğimi biliyorum.

Laboratuvardaki ilk günümünden bugüne kadar bu ustanın yolculuğunda emeği geçen tüm TEMA laboratuvar ekibime de teşekkür ederim. Sadece Yağmur Avcı, Burçin İren, Batu Çolak, Derya Nur Cömert ve Jale Nil Gürsoy isimlerinden bahsederek hepimizi sevdiğimi iletiyorum ve sizleri hep cesur ve azimli görmeyi çok istiyorum.

Bu çalışmayı ayrıca Türkiye'de bulunan, bana cesaret ve ilham veren başta sevgili ev arkadaşlarım olmak üzere, tüm uluslararası arkadaşlarıma ithaf ediyorum. Bunu ayrıca başarımdan her zaman gurur duyan sevgili kardeşlerime ve bulundukları yerden çok uzakta olan sevgili aileme adıyorum.

Ocak 2021

Nahdhoit AHAMADA RACHID

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. MAĞARA NEDİR VE NASIL OLUŞUR?	3
2.2. MAĞARA YAPILARI	5
2.3. MAĞARA EKOSİSTEMLERİNİN MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİ	6
2.4. MAĞARACILIK	11
2.5. MAĞARA MİKROORGANİZMALARININ ÖNEMİ.....	12
2.6. MAĞARA KAMPLARI	15
2.7. MAĞARACILARIN KEŞFETTİKLERİ YA DA GİRDİKLERİ MAĞARALARA ETKİLERİ	15
2.7.1. Mağaracıların mağaranın fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerindeki etkileri	16
2.7.2. Mağaracıların mağara biyoçeşitliliği üzerine etkileri	16
2.8. BİYOİNFORMATİK.....	17
2.9. OPERASYONEL TAKSONOMİK ÜNİTE (OTU) VE OTU İSTATİSTİKLERİ	17
2.9.1. Temel Komponent Analizi (PCA).....	18
2.10. ÇEŞİTLİLİK ANALİZLERİ	18
2.11. SICAKLIK HARİTASI (HEATMAP)	19
2.12. TEMEL KOORDİNAT ANALİZİ (PCOA)	19
2.13. KÜMELEME ANALİZİ (CLUSTER)	20
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	21
3.1. MORCA DÜDENİ'NİN KEŞİF TARİHİ/ HİKAYESİ.....	21
3.2. MORCA DÜDENİ KONUM VE ÖZELLİKLERİ.....	21
3.3. ÖRNEKLEME	22

3.4. DNA İZOLASYONU VE NANODROP ÖLÇÜMESİ	23
3.5. 16S RRNA AMPLİKON ANALİZİ	25
3.6. BİYOİNFORMATİK VE İSTATİSTİK ANALİZLER.....	25
4. BULGULAR.....	27
4.1. NANODROP SONUÇLARI.....	27
4.2.ÖRNEKLEME ALANLARININ TAKSONOMİSİ VE ALFA ÇEŞİTLİLİĞİ	27
4.2.1. Kamp yüzey oluşum alanı (NAR1 ve NAR2).....	28
4.2.2. Kamp alanı (NAR3 & NAR4): Sediment örnekleri	30
4.2.3. Tuvalet alanı 1 (NAR5 & NAR6)	31
4.2.4. Tuvalet alanı 2 (NAR9 & NAR10)	32
4.2.5. Kamp alanının uzağından alınan yüzey örnekleri (NAR11 ve NAR12	33
4.2.6. Kamp alanının uzağından alınan sediment örnekleri (NAR13 ve NAR14)	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
5.1. MORCA MAĞARASI'NIN -1040 M DERİNLİĞİNDEKİ MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİ	37
5.1.1. Archaea.....	37
5.1.2. Bacteria.....	38
5.2. BACTERIA VE ARCHAEA ÇEŞİTLİLİĞİ ÜZERİNDEKİ İNSAN ETKİLERİ.....	39
5.3. MAĞARALARIN KORUNMASI.....	42
5.4. SONUÇ	43
KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ	53

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Carroll Mağarası, MO'da büyük aragonit sütunu. Burada, beyaz aragonit ile sarı ve kahverengi kalsit speleothemleri arasındaki renk zıtlığına dikkat edilmelidir (Dreybrodt, 2019).	5
Şekil 2.2: Ohio Mağaraları'nda (West Liberty/ABD) havuç şeklindeki sarkıtlar (Dreybrodt, 2019).	5
Şekil 2.3: Postojna Mağarası'ndaki (Slovenya) dikitler (stalagmite) (Dreybrodt, 2019).	5
Şekil 2.4: Furong Dong Mağarası'ndaki akmetaşlar (flowstones), (Chongqing Eyaleti, Çin) (Dreybrodt, 2019).	5
Şekil 2.5: Site Mağarası'ndaki heliktik oluşumlar, Pendleton County, Batı Virginia (Dreybrodt, 2019).	6
Şekil 2.6: Butler Mağarası'ndaki inciler (Pearls), Bath County, Virginia (Dreybrodt, 2019).	6
Şekil 2.7: Charlottenhöle Mağarası'ndaki aysütü (Moonmilk) (https://www.showcaves.com/english/explain/Speleothem/Moonmilk.html)	6
Şekil 2.8: Mağaralarda oluşan mikrobiyal biofilmler (Engel, 2019).	10
Şekil 3.1: Taşeli Platosu (http://aspeg.org.tr/)	22
Şekil 3.2: Örneklem noktaları (ASPEG üyesi Ümit Günhan tarafından çizildi).	24
Şekil 4.1: Örneklerdeki Bacteria ve Archaea bulunma yüzdeleri.	30
Şekil 4.2: Örneklerde bulunan Bacteria ve Archaea filumları.	34
Şekil 4.3: Bacteria ve Archaea sınıf çeşitliliği (A) ve en baskın bulunan sınıflar (B).	35
Şekil 4.4: Örneklerde tespit edilen cins çeşitliliği (A) ve en baskın bulunan cinsler (B)	36

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Örnek ve örnekleme noktaları.	23
Tablo 4.1: Elde edilmiş DNA konsantrasyonları.....	27
Tablo 4.2: Örneklerin mikrobiyal alfa çeşitliliği.....	28



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

bp	: Baz çifti
°C	: Santigrat derece
dk	: Dakika
µl	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
rpm	: Dakika devir sayısı (round per minute)

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

16S rRNA	:16S ribozomal ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
KS	: Ketosentaz
NRPS	: Ribozomal olmayan peptid sentetaz (Non-ribosomal peptides synthetase)
PPS	: Protein Presipitasyon Solüsyonu
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAĞARACILIK AKTİVİTELERİNİN MAĞARA MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Nahdhoit AHAMADA RACHID

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

Doğal jeolojik yeraltı açıklığı olarak tanımlanan mağaralar, karanlık, düşük ancak sabit sıcaklık, yüksek nem ve kısıtlı besin maddesi gibi ekstrem çevre koşulları ile karakterizedir. Bu ekstrem ekosistemlerdeki mikroorganizmaların varlığı ilgi çekicidir, çünkü bu koşullara adaptasyonları, biyoteknolojik ve endüstriyel alanlarda kullanılabilecek önemli biyolojik maddelerin sentezi için önemli genlerin varlığını gösterebilir. Bu yeraltı ekosistemlerini keşfetmek için mağaraya giren mağaracılar, keşif gezileri boyunca mağaraların içinde kamp yaparlar. Ayrıca turizme açılan mağaralar da ziyaretçilerinin etkisi altındadır. Bu bağlamda, mağaracıların mağara içindeki faaliyetleriyle mağaranın mikrobiyal çeşitliliğine olası etkilerinin değerlendirilmesi çalışmamızın temel amacı olmuştur. Bu tez projesinde, Morca Mağarası'nın 1040 m derinliğinde kamp kurulan alanın belirlenen noktalarından, kamp kurulmadan önce ve kamp bittikten sonra alınan yüzey ve sediment örneklerinin mikrobiyal profili incelenmiştir. Çalışmamızda, Archaea'nın Thaumarchaeota, Euryarchaeota ve Nanoarchaeaeota filumları ile temsil edildiği belirlenmiştir. Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes ve Acidobacteria en baskın Bacteria filumları olarak tespit edildi. Kamptan sonra alınan örneklerde insan mikrobiyotasında bulunan mikroorganizmalar (Bacteria / Archaea) tespit edilmezken, ancak örnek alınan tuvalet 2 ve kamp alanı noktalarında mikrobiyal çeşitliliğin azaldığı belirlenmiştir. Mağaracı faaliyetlerinin daha az olduğu örnek noktalarında ise alfa çeşitliliğinin Shannon ve Simpson indeks değerleri, kamptan sonra mikrobiyal çeşitliliğin arttığını göstermiştir.

Ocak 2021, 67 sayfa.

Anahtar kelimeler: İnsan Etkisi, Mağara, Mağaracılık, Mağara Mikrobiyal Çeşitliliği, Yeni Nesil Dizileme



SUMMARY

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF THE EFFECT OF CAVING ACTIVITIES ON CAVE MICROBIAL DIVERSITY

Nahdhoit AHAMADA RACHID

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR

Caves defined as underground natural geological opening are characterized by extreme environmental conditions such as darkness, low but stable temperature, high humidity, and low nutrient. The presence of microorganisms in these extreme ecosystems is interesting. Their adaptation in these extreme conditions indicates the presence of important genes which can be used for the synthesis of important biological substances which could be used in biotechnological and industrial fields. However, to exploring these underground ecosystems, cavers are camping inside caves along their expedition. In this concept, this study had aimed to evaluate the impacts caused by caver activities on the cave microbial diversity. We studied the microbial profile of the surface and sediment samples taken before and after a camp period, from different areas around a camp installed at -1040m of Morca Cave, in Turkey. The Archaea and Bacterial taxonomy of this part of the cave was determined through the samples taken before the camp. Three phyla of Archaea, Thaumarchaeota, Euryarchaeota and Nanoarchaeaeota were identified. Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes and Acidobacteria were identified as dominated Bacteria. No human indicator microorganisms (bacteria/archaea) were identified in the samples taken after the camp period, but a decreasing of the microbial diversity was observed in the selected toilet 2 and near the camping areas. Besides, Bacteroidetes members were importantly increased, after the camp, in the sediment sample from the camp area. Furthermore, after the camp, the Gram-positive bacteria including Firmicutes were increased in all the samples with

an important increasing rate. At the end, as shown in Shannon and Simpson indexes of the alpha diversity, the sampled areas where human activities were less observed were noted with an increase of microbial diversity after the camp.

January 2021, 67 pages.

Keywords: Human Impact, Cave, Caving, Cave Microbial Diversity, Next Generation Sequencing



1. GİRİŞ

Yaşam dünya yüzeyi ile sınırlı değildir. Aksine yaşamın büyük kısmı deniz sedimentleri ve yeraltı katmanlarında bulunur (Ghosh ve diğ., 2017). Ekstrem yaşam koşullarına sahip çevrelerde bulunan mikroorganizmaların da standart koşullarda bulunan mikroorganizmalar gibi normal gelişip çoğaldığı bilgisine ulaşmak kolay olmamıştır. Çünkü ekstrem çevrelerdeki mikroorganizmaların araştırılması o ortamlara ulaşımı sağlayan teknik ve ekipmanların gelişmesine bağlıdır. Ekstrem ortamlarda yapılacak coğrafik, jeolojik ya da (mikro)biyolojik çalışmalar o ortamlara fazla müdahale etmeden ve hiç zarar vermeden olmalıdır (Baton, 2006).

Mağaralar, karanlık, yüksek nemli, organik madde açısından fakir, sabit sıcaklık (genellikle düşük) ile karakterize, doğal jeolojik açıklıklar olarak tanımlanan ekstrem yeraltı ekosistemleridir (Tomczyk-Żak ve Zielenkiewicz, 2016; Culver ve Pipan, 2009). Mağaralar sahip oldukları ekstrem koşullara rağmen, demir, kükürt ve diğer inorganik kimyasalları kullanan ve biyojeokimyasal döngülerde çok önemli yeri olan kemolitotrofik mikroorganizmaları içeren ve mikroorganizma çeşitliliği açısından zengin olan ekosistemlerdir (Northup ve Lavoie, 2001).

Yapılan araştırmalar sonunda, bazı mağara yapılarının, mikroorganizmaların oluşturdukları metabolitlerden kaynaklandığı ve özellikle bakterilerin, mağara minerallerinin çözünmesinde ve çökmesinde rol aldıkları belirlenmiştir. Böylece önceleri inanıldığı gibi mağaraların sadece jeokimyasal reaksiyonları içeren süreçler sonucu oluşmadığı, mikroorganizmaların metabolizmaları sonucu meydana gelen reaksiyonlar ile bu sürece destek verdikleri ortaya konmuştur (White ve Culver, 2019).

Mağaralar, yapısı ve çeşitliliği nedeniyle benzersiz bir ekosistem oluşturmaktadır. Dünyadaki her mağara özeldir ve diğerlerinden farklı özel bir ekosistem oluşturur. Mağaracılar, jeologlar ve biyologlar hala farklı mağaralardan yeni biyoaktif maddeler, makro ve mikroorganizmalar keşfetmektedir. Bu keşifler, bir mağaranın diğerinden farklılık gösterdiği kimyasal ve fiziksel koşullarından kaynaklanmaktadır. Mağara ekosistemleri oligotrofik yani besin açısından fakir ortamlardır dolayısıyla mikroorganizmalar arasındaki rekabet daha belirgindir. Bu bağlamda, yeni antimikrobiyal ürünlerin üretim potansiyeli bu mikroorganizmalarda daha yüksektir (Ghosh ve diğ., 2017; Çandroğlu ve Doğruöz Güngör, 2020). Ayrıca, mağara

mikroorganizmalarının ekstrem koşullar altında yaşayabilmeleri, enzimler gibi biyoteknolojik alanlarda önemli olabilecek bazı ürünleri üretme yeteneklerinin fazla olduğu çalışmalarla kanıtlanmıştır (Ghosh ve diğ., 2017; Doğruöz Güngör ve diğ., 2020).

Mağaraların yakınındaki veya içindeki insan faaliyetleri önlemler alınsa bile, hem mağara yapılarına hem de sahip olduğu (mikro)biyolojik çeşitliliğine zarar verebilir. Mağaralar içindeki insan varlığı karbondioksit seviyesini arttırabilir ve bu da doğal mağaranın mikrobiyal çeşitliliğinde bir değişikliğe neden olabilir. Bazı patojenler ve/veya fırsatçı patojenler mağara araştırması veya ziyareti sırasında turist veya mağaracılar tarafından mağara içine taşınabilir (Mammola ve ark., 2017). Bunlara ek olarak, turistik mağaralarda bu karanlık ekosistemi aydınlatmak için kullanılan lambalar fototrofik organizmaların yaşamasını sağlayarak mikrobiyal çeşitliliği etkiler (Mulec, 2014).

Çalışmamız, mağaracıların mağara keşfi sırasında mağaraların mikrobiyal çeşitliliği üzerindeki etkilerini belirlemeyi hedeflemiştir. Keşif döneminde mağaracılar keşif sürelerine bağlı olarak farklı derinliklerde geçici kamplar kurarlar. Çalışmamızda Morca Düdeni'nin keşfi esnasında -1040 metrede 4 gün süre için kurulan, belirlenen noktalardan kamp kurulmadan önce ve dört gün aktif olarak kullanıldıktan sonra örneklemeler yapılmış ve örneklerin metagenomik analizi sonrasında kamp öncesi ve sonrası mikrobiyal çeşitlilik değerlendirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. MAĞARA NEDİR VE NASIL OLUŞUR?

Mağaralar, yeryüzünün altında, alacakaranlık kuşağının ötesine uzanan ve en az bir insanın sığacağı büyüklükte olan doğal açıklıklar olarak tanımlanabilir (Northup ve Lavoie, 2001; White ve Culver, 2012). Speleogenez, doğal mağara oluşumunu ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Mağaralar, ekstrem koşullarda meydana gelen farklı kimyasal reaksiyonların sonucu olarak farklı mineral ve kristaller içeren oluşumlardır (White ve Culver, 2012). Bununla birlikte, mağara ortamı Dünya'nın yüzeyinden daha kararlı olan karanlık, nem, alkali ve oksitleyici koşullar ile karakterize edilir (White ve Culver, 2012; White ve Culver, 2019).

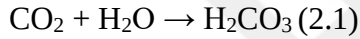
Mağaralar farklı şekillerde sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma şekillerinden biri mağaraların oluşum süreçleri göz önüne alınarak yapılan sınıflandırmadır. Doğal etkenler sonucunda kayalarda oluşan yeraltı boşlukları doğal mağaralar olarak isimlendirilir. Bu mağaralar birincil ve ikincil mağaralar olmak üzere ikiye ayrılır.

Birincil mağaralar: Ana kaya ile birlikte oluşmuş, oluşum yaşları ana kaya ile aynı olan mağaralardır. Lav tünelleri, buz altı erime boşlukları, alüvyon boşlukları ve traverten arası boşluklar birincil mağaralara örnektir. Mağara kaşiflerinin büyük ilgisini çeken volkanik kayalarda bulunan Lav tünelleri (aynı zamanda tüpler, kanallar veya piritler olarak da bilinir), lav akıntıları içindeki yanardağların kenarlarında şişirme adı verilen bir işlemle veya kanalların kabuklanmasıyla oluşur. Akan lavın neden olduğu iç erozyon, genellikle bu kanalları genişleterek, çapı onlarca metreye ve kilometrelerce uzunluğa kadar varan geçitlere neden olur. Bu birincil mağaraları oluşturan süreçler, kireçtaşı ve diğer kayalarda ikincil mağaraları oluşturan süreçlerden tamamen farklıdır.

İkincil Mağaralar: Ana kayadan sonra oluşmuş dünyadaki en yaygın mağara grubudur. Deniz mağaraları, rüzgâr mağaraları, buzul mağaraları ve karstik mağaralar ikincil mağaralara örnektir. Karstik mağaralar, kireçtaşı, jips, dolomit, kaya tuzu, mermer, kumtaşı, çakıl taşı gibi çözünebilir kayaların yeraltı sularının fiziko-kimyasal etkileşimlerle aşındırıp biçimlendirdiği çok farklı yüzey oluşumlarını içerirler.

Karstik mağaraların oluşumu karstlaşmayı oluşturan şartların varlığına bağlıdır. Bunlar,

karstlaşmanın meydana gelebileceği uygun jeolojik ortamın bulunması; tektonik hareketler, yüzeyde bozunma ve erozyon süreçlerinin görülmesi ve Çözücü ajan olan suyun bulunmasıdır. Bu şartlardan birinin bulunmaması durumunda karstlaşma dolayısı ile karstik mağara oluşumu mümkün olamaz. Karstik mağara oluşumu sürecinde, karbonatlı (kireçtaşı, dolomit, mermer) ve sülfatlı (jips) kayaçların üzerinden akan suyun içerdiği CO₂ bu kayaçların kimyasal olarak çözünmesine neden olur. CO₂ içeren sular, karbonatlı kayaçların yarık ve çatlaklarından sızarak çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucu karbonik asite (H₂CO₃) doygun hale gelir (Denklem 2.1). Asidik özellikte olan bu sular kireçtaşlarını (CaCO₃), daha kolay çözünen kalsiyum bikarbonatlara dönüştürür (Denklem 2.2). Bu aşamada çözülmüş halde bulunan kalsiyum bikarbonat, ısınma, buharlaşma ya da basınç azalması gibi süreçlerle CO₂'yi kaybederlerse bu reaksiyonlar tersine döner ve CaCO₃ yeniden çökerek traverten, sarkıt ve dikit oluşumuna neden olur (Denklem 2.3).



Mikroorganizmalar, mağaralarda minerallerin birikmesi ile bağlantılı olduğu düşünülen birçok mineralizasyon sürecinde aktif rol oynadığı belirlenen canlı aktörlerdir. Yıllarca mağaranın oluşum süreci olan kalsit çökmesinin sadece abiyojenik süreçlerle meydana geldiği düşünülmüştür (Kendall ve Broughton, 1978). Mağara mikrobiyolojisi çalışmaları yapıldıkça mikroorganizmaların mağara oluşumlarında, karbonat presipitasyonu ve çözünme sürecini destekleyerek biyojenik etki oluşturdukları ve abiyojenik süreci destekledikleri ortaya konmuştur (Baskar ve diğ., 2009; Cheeptham, 2013; Li ve diğ., 2014; Daskalakis ve diğ., 2015).

Petrol yatakları gibi yer altı kükürt bölgelerinde, karbonik asitten çok daha güçlü olan sülfürik asit, kireçtaşlarının çözünme kaynağıdır. Buradaki hidrojen sülfürün yeraltı alanlarında yaşayan bakterilerden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Culver ve Pipan 2009; Northup ve Lavoie, 2001). Bu bölgedeki kireçtaşlarının çözünmesi mağaranın oksijenli bölgesinde hidrojen sülfürün okside olması ile oluşan sülfürik asitten dolayıdır (Northup ve Lavoie, 2001).

2.2. MAĞARA YAPILARI

Speleothemler mağaralardaki ikincil birikintilerdir ve mağaraların içinde sürekli olarak oluşabilirler. Speleothemler birçok mineralden oluşur, ancak en yaygın olanı üç mineralin birini veya karışımını içerir: Kalsit (CaCO_3), aragonit (kalsit gibi formülü CaCO_3 ancak kristal yapıları farklı) ve jips (alçıtaşı- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (White ve Culver, 2019). Bu mineraller, farklı kristal yapıları ve farklı kristal gelişim yolları ile karakterize edilir. Speleothemler farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır, ancak hiçbirisi tatmin edici değildir. Suyun akış özellikleri dikkate alınarak yapılan sınıflandırmaya göre bazı yaygın speleothem isimleri ve şekilleri görülmektedir (Şekil 2.1-2.7).



Şekil 2.1: Carroll Mağarası, MO'da büyük aragonit sütunu. Burada, beyaz aragonit ile sarı ve kahverengi kalsit speleothemleri arasındaki renk zıtlığına dikkat edilmelidir (Dreybrodt, 2019).



Şekil 2.2: Ohio Mağaraları'nda (West Liberty/ABD) havuç şeklindeki sarkıtlar (Dreybrodt, 2019).



Şekil 2.3: Postojna Mağarası'ndaki (Slovenya) dikitler (stalagmite) (Dreybrodt, 2019).



Şekil 2.4: Furong Dong Mağarası'ndaki akmataşlar (flowstones), (Chongqing Eyaleti, Çin) (Dreybrodt, 2019).



Şekil 2.5: Site Mağarası'ndaki heliktik oluşumlar, Pendleton County, Batı Virginia (Dreybrodt, 2019).



Şekil 2.6: Butler Mağarası'ndaki inciler (Pearls), Bath County, Virginia (Dreybrodt, 2019).



Şekil 2.7: Charlottenhöle Mağarası'ndaki aysütü (Moonmilk)

(<https://www.showcaves.com/english/explain/Speleothem/Moonmilk.html>)

2.3. MAĞARA EKOSİSTEMLERİNİN MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİ

Mağara ekosistemleri bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi farklı organizmaları içerir. Mağaradaki mikrobiyal çeşitlilik üzerine yapılan çalışmaların büyük bölümü bakteriyel çeşitlilik üzerinedir (Tomczyk-Żak ve Zielenkiewicz, 2016). Ekstrem koşullar altında yaşamak, mağara mikroorganizmalarının özgüllüğünü oluşturur. Çünkü mikroorganizmalar bulundukları ortamdaki pH, sıcaklık, ışık ve metal gibi çevresel fiziko-kimyasal parametrelerden etkilenir. Ekolojik ilkelere göre, bu oligotrofik ortamlarda çok çeşitli mikroorganizmaların olması çelişkilidir (Tomczyk-Żak ve Zielenkiewicz, 2016). Her mağara yapısı, çevre koşulları, mikrobiyal çeşitliliği ve kimyasal içeriği açısından kendine özgüdür. Genellikle, mağaranın

mikrobiyal çeşitliliği, özellikle de enerjilerini kimyasal maddelerin oksidasyonundan veya indirgenmesinden elde etme yeteneğine sahip kemolitotrofların çeşitliliği o mağarada bulunan kimyasal elementlere bağlıdır. Kemolitotroflar mağara ekosistemindeki birincil üreticilerdir (Engel, 2019). Bunun yanında Romanya’da bulunan Movile Mağarası, İtalya’daki Frasassi Mağarası ve New Mexico, ABD’de bulunan Lechuguilla Mağarası, sadece kemolitotrofik mikroorganizmaların bulunduğu mağaralardır (Chen ve diğ., 2009; Porter ve diğ., 2009). Mikroorganizmalar mağara yüzeylerinde ya da farklı renkler ve farklı yapılar olarak görünebilen speleothemlerde biyofilm oluşturabilir (**Şekil 2.8**).

Mağaraların mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi için ilk yapılan çalışmalarda kültüre dayalı yöntemler kullanılmıştır. Ekstrem yaşam koşulları nedeniyle, mağaradaki mikroorganizmaların çoğunun kültüre edilemediği tespit edilmiştir. Moleküler yöntemlerin gelişmesi ile mağara mikrobiyal çeşitliliğinin ne kadar zengin ve benzersiz olduğu ortaya konmuştur. Hatta mağara yapılarının gelişimine katkıda bulunduğu düşünülen bu ekstrem mikroorganizmaların keşfedilmesinde de moleküler yöntemlerden faydalanılmaktadır. Dünya çapında yaygın olarak kullanılan 16S rRNA gen bölgesi dizilimine dayanarak, mağaralarda çok sayıda Bacteria filumu tanımlanırken, Archaea ve mikrobiyal ökaryotların tanımlanması oldukça sınırlı olmuştur (Engel, 2019). Mağaralarda yapılan mikrobiyolojik çeşitlilik çalışmalarında kültür temelli yöntemler kullanıldığında Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes filumları baskın olarak tespit edilirken (Barton ve Jurado 2007; Jurado ve diğ. 2010; Barton 2015), moleküler temelli yöntemler kullanıldığında ise çoğunlukla Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroides, Firmicutes, Acidobacteria, Nitrospirae, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes, Plancomycetes Spirochetes ve Chloroflexi filumları belirlenmiştir (Chelius ve Moore 2004; Zhou ve diğ. 2007; Lee ve diğ. 2012; Oliveira ve diğ. 2017; Lavoie ve diğ. 2017).

Proteobacteria filumu biyojeokimyasal döngülerde anahtar rolü olan, kozmopolit bir bakteri grubu olarak kabul edilen, mağara ekosisteminde de bulunan çoğunlukla en baskın gruptur. Mağara ortamlarındaki organik maddenin az bulunması ya da olmaması nedeni ile Proteobacteria filumun kemolitotrofik üyeleri, aktivitelerinden dolayı mağaralarda birincil üreticiler olarak kabul edilmektedir. Proteobacteria Alfa, Beta, Gama, Delta ve Epsilon Proteobacteria olmak üzere beş sınıfı içerir. Mağaralarda bu beş sınıf içinde yer alan bakterilerin varlığı tespit edilmiştir. Mağara ekosistemlerinde Proteobacteria'nın inkâr edilemez

hakimiyetine rağmen, farklı ortamlarda belirli sınıfların temsili eden üyeleri farklılık göstermektedir (Tomczyk-Żak ve Zielenkiewicz, 2016).

Makroskopik olarak nemli mağara duvarlarında oluşan parlak altın, beyaz, pembe veya kahverengi koloniler çoğu zaman Actinobacteria filumunu işaret eder (Engel, 2019). Actinobacteria, yağmurdan sonra toprak kokusundan sorumlu olan *Streptomyces* cinsine sahip çoğunlukla toprak ortamında bulunan ve kromozomal DNA'larında yüksek oranda GC baz çifti ile karakterize edilen Gram pozitif bakteriler içeren filumdur (Engel, 2019). Actinobacteria mağara ortamlarına hâkim olan ikinci ve bazen de üçüncü filumdur (Tomczyk-Żak ve Zielenkiewicz, 2016). Bu filum, CaCO₃ yatakları gibi yüzey minerallerinin oluşumuna yol açan mağaralardaki biyomineralizasyon süreçlerindeki biyolojik rolleriyle bilinen *Streptomyces* ve *Rhodococcus* gibi üyeleri içerir (Maciejewska ve diğ., 2017).

Dünya'nın çok sayıdaki farklı mağaralarında gözlenen diğer bakteri filumları Bacteroidetes, Firmicutes, Acidobacteria, Nitrospirae, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes, Plancomycetes Spirochetes ve Chloroflexi üyelerinden oluşur. Mağaralarda tespit edilen bu mikrobiyal toplulukların mağara ekosistemlerinin önemli bir üyesi olduğu kabul edilirken, çoğunun mağara ekolojisine nasıl bir etkisi olduğu ortaya çıkarılamamıştır (Schabereiter- Gurtner ve diğ., 2002; Wiseschart ve diğ., 2018; Rusznyak ve diğ., 2012; Hathaway ve diğ., 2014 ve Pasic ve diğ., 2009).

Bacteroidetes filum üyeleri mağaralarda bulunsa da bu ekosistemlerdeki işlevsel rolleri hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Metal elementlerin döngüsüne dahil oldukları ileri sürülmektedir (Angert ve diğ., 1998; Chelius ve Moore, 2004; Ikner ve diğ., 2007; Macalady ve diğ., 2006). Firmicutes filumu en fazla mağara yüzeylerinde ve mağaralardaki sedimentlerde yaşayan mikrobiyal popülasyonlardır. Firmucutes çeşitli organik bileşiklerde üremeye izin veren metabolik çeşitliliğe sahiptirler. Proteobacteria filumuna kıyasla düşük miktarda besin ve dehidrasyonun neden olduğu strese karşı daha dirençli olduğundan mağara ekosistemi gibi besin miktarının kısıtlı olduğu ortamlarda bu filum üyelerinin sıklıkla tespit edilmesi şaşırtıcı değildir (Slepecky ve Hamphill, 1992 ; Chen ve diğ., 2009).

Mağaralarda küçük yüzdelerde bulunan Acidobacteria filumunun, metilotrofik büyüme yeteneğine sahip olduğu ve bu özelliği sayesinde düşük organik madde girdisine sahip olan

oligotrofik bir habitatta ekolojik bir avantaja sahip olabileceği belirtilmiştir (Kalyuzhnaya ve diğ., 2008). Bu filumun mağara ekosistemlerindeki ekolojik rolü bilinmemektedir.

Nitrospirae filum üyeleri farklı mağara ekosistemlerinde tespit edilmiştir (Macalady ve diğ., 2006; Schabereiter-Gurtner ve diğ., 2002; Pasic ve diğ., 2010). Özellikle Nitrospirales takımına ait üyelerinin mağara ortamında nitrit oksidasyonu yaparak nitrojen döngüsünde rol oynadığı tespit edilmiştir (Ortiz ve diğ., 2012).

Verrucomicrobia üyelerinin çok azı kültüre edilmiştir ve çok çeşitli ekosistemlerde bulunabilen bakterilerin farklı bir filogenetik grubunu temsil eder. Bazı üyeleri hücresel uzantılara ve hücre içi bölmelere sahiptir. Ayrıca tatlı su ve deniz suları, toprak, insan bağırsağı gibi çeşitli habitatlarda ve kaplıca, Antarktika gibi ekstrem ortamlarda bulunabilirler (Bergmann ve diğ., 2011; Op den Camp ve diğ., 2009). Verrucomicrobia'nın mağara ekosistemlerindeki ekolojik rolü henüz bilinmemektedir.

Gemmatimonadetes filumuna ait üyeler birçok karasal ve sucul ortamda bulunan, aerobik koşullarda büyüyen mezofilik heterotroflardır. Bu gruba mağara ekosistemlerinde nadiren rastlanır ve bu ortamlardaki ekolojik rolü bilinmemektedir. Mağarada bulunan Gemmatimonadetes o ortamda bulunan mikroorganizmaların küçük bir yüzdesini temsil etmektedir.

Hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında kompleks organik maddeyi parçalayan Plancomycetes karbon ve nitrojen döngülerinde önemli bir rol oynar. Bu bakteriler genellikle mağaralarda da bulunur, ancak mağaralardaki ekolojik rolleri bilinmemektedir.

Spirochetes filumuna ait bakteriler aerobik, mikraerofilik, fakültatif anaerobik veya zorunlu anaerobik olan kemoorganotroflardır ve mağara ekosistemlerinde çok nadir olarak tespit edilmiştir (Jones ve diğ., 2010; Chen ve diğ., 2009 ve Engel ve diğ., 2010). Spirochetes filumuna ait bakterilerin mağara ekosistemlerindeki ekolojik rolü bilinmemektedir.

Chloroflexi filumu, az sayıda kültüre edilmiş temsilciye sahip, ancak metagenomik çalışmalarda tanımlanan her geçen gün hızla biriken dizilere sahip sistematik bir gruptur. Sıcak ve soğuk nişler de dahil olmak üzere sedimentler, topraklar, nehirler ve okyanuslar gibi çeşitli doğal ve mühendislik ortamlarında bulunurlar (Yamada ve Sekiguchi, 2009). Morfolojik olarak çeşitli olmasına rağmen genellikle ipliksi yapıdadır. Bu gruptaki mikroorganizmalar genellikle

mağara popülasyonunun küçük bir bölümünü oluşturur. Chloroflexi filumu üyelerinin biyoremediasyonda rol oynadığı bilinmesine rağmen mağara sistemindeki ekolojik rolleri henüz belirlenememiştir (Yan ve diğ., 2019, Wu ve diğ., 2019).

Archaea domaininin belirlenmesinden sonra mağaralarda Arke çeşitliliği üzerine de araştırmalar yapılmıştır. Kültüre dayalı yöntemlerle hiç Archaea tespit edilemezken, moleküler yöntemler kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde Archaea çeşitliliğinin bakteri çeşitliliği kadar zengin olmadığı ancak mağara ekosisteminde var olduğu ortaya konmuştur. Araştırmalar, Archaea topluluklarının mağara ekosistemlerinde oldukça önemli rollerinin olduğunu, Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota, Thaumarchaeota ve Candidate filumlarının mağaralarda tespit edildiğini ortaya koymuştur. Ancak yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler hala sınırlıdır (Engel, 2010; Carmichael ve diğ., 2013; Jones ve diğ., 2014, Kieraitė-Aleksandrova ve diğ., 2015).



Şekil 2.8: Mağaralarda oluşan mikrobiyal biofilmler (Engel, 2019).

Mağaralarda bulunan mantar ve virüs ile ilgili çalışmalar bakteri çalışmalarına kıyasla sınırlıdır. Mağaralardaki yarasalardan virüs izole edildiği raporlanmıştır (Ghosh ve diğ., 2017). Ancak yarasalar dışında mağara ortamlarında virüs varlığının tespiti için mağaralardan alınan su, tortu ve yüzey örneklerinden viroloji çalışmalarının yapılması gerekmektedir (Ghosh ve diğ., 2017).

Mağara mikrobiyolojisi alanında yapılan çalışmalar, mağara havası, guano ve speleothem yüzeyleri örneklerinde mantarların varlığını bildirmiştir (Ghosh ve diğ., 2017). Bazı kültür tabanlı yöntemler, belirlenen mağara mantarı çeşitliliğinde Ascomycota filumunun hakimiyetini ortaya çıkarmış ancak mantarların mağaradaki rolü, en baskın bulunan Ascomycota üyeleri *Asperigillus* ve *Penicillium* da dahil olmak üzere tam olarak anlaşılamamıştır (Ghosh ve diğ., 2017; Engel, 2010). Bu durumda mantarların, mağaraya dış ortamdan gelebilecek yaprak ve besin atıkları gibi organik maddeleri ayrıştırarak diğer mağara mikroorganizmalarına besin sağlanmasına katkı sağlayabileceği ileri sürülmektedir (Engel,

2010). Bazı ABD mağaralarında *Pseudogymnoascus destructans* olarak bilinen yarasalarda White-Nose Sendromundan sorumlu bir yarasa patojeni izole edilmiştir (Engel, 2010; Ghosh ve diğ., 2017). Bu mağara mantarlarının dış ortamdan mağaraya girdiği düşünülmektedir. Özellikle moleküler tabanlı yöntemlerle yapılan çalışmalar, mağara mantarları ekolojisi ve çeşitliliğine dair yeni bilgilerin elde edilmesi için hala önemlidir (Engel, 2010).

2.4. MAĞARACILIK

Araştırmalar mağaraların Paleolitik dönemde bile kullanıldığını göstermektedir (Ghosh ve diğ., 2017). O dönemde mağaralar günümüzde olduğundan farklı bir şekilde habitat, mineral kaynağı ve korunma yerleri gibi amaçlarla kullanılmıştır (Ghosh ve diğ., 2017). Günümüzde ise insanlar bu ekosistemlere bilimsel ve sportif faaliyetler nedeniyle girmektedir.

Farklı disiplinlerdeki bilim insanları ve bilimle ilgili olmayan profesyonel mağaracılar, mağaraların keşfedilmeleri, araştırılmaları ve korunmaları için çok emek vermektedir (White ve Culver, 2012). Yeraltının bu doğal oluşumları, farklı dünya bölgelerinin tarihine de katkıda bulunur. Dünyadaki mağaraların çoğunluğu erişimi zor yerlerde olduğundan ile mağaracı olmayan bilim insanları tarafından neredeyse hiç erişilemez. Mağaracılar, mağaraların haritasını çıkarmak ve onlar hakkında daha fazla bilgi sağlamak için bu yeraltı açıklıklarına büyük bir merak ve tutku ile girerler. Sağlanan bu bilgiler sayesinde ve arkeoloji, jeoloji, jeomikrobiyoloji, paleontoloji, hidroloji, mineraloji konularındaki bilinmeyen sorular farklı disiplinlerin ortaklaşa yaptığı çalışmalar ile cevaplanabilir ve ortaya çıkan sorunlar kolaylıkla çözüme ulaştırılabilir (Kambesis, 2007).

Mağara oluşumları en çok, mikroorganizmalar ve çevresel mineraller arasındaki farklı kimyasal reaksiyonlar sonucunda değişir. Bu reaksiyonlar, farklı kayaların oluşumunu, farklı alt mağara yapılarının gelişmesini ve yeni su akış yollarını beraberinde getirir. Jeologlar, bölgelerin kimyasal zenginliğine katkıda bulunabilecek bu alanların kimyasal özelliklerinin sentezi için bu kayaları araştırırken, paleontologlar ise bu kayaların ve alanların tarihini belirlemek için oluşumları incelerler (Leucci ve Giorgi, 2005).

Öte yandan, mikrobiyologlar mağara ekosistemindeki ekstrem mikroorganizmalarla ilgilenir ve her bir mağaranın mikrobiyolojik çeşitliliğini ortaya çıkarmak için çalışır. Ayrıca bu ekstrem koşullar altında gelişebilen mikroorganizmalar biyoteknolojik kullanımlar için önemli bir potansiyele sahiptir. Antibiyotikler, enzimler ve anti kanser ürünleri gibi pek çok biyoaktif

maddenin mağara mikroorganizmaları tarafından üretildiği ortaya çıkarılmıştır (Doğruöz Güngör ve diğ; 2020). Mikrobiyologların yanı sıra inşaat mühendislerinin de biyobeton üretimi için özellikle karstik mağara yüzey oluşumlarından izole edilen bakterilere karşı ilgileri artmıştır (Omereg ve diğ., 2017).

Mağaraya ilgi duyanlar sadece mağaracılar ve bilim insanları değildir. Mağara turizmi, dünyadaki başlıca jeoturizmi oluşturmaktadır ve her sene turizme açılan çok sayıda mağara bulunmaktadır. Mağaraya gelen turistlerin çoğu mağaraların doğal görünümünden etkilenir. Bazıları, özellikle jeolojik oluşumlar olmak üzere yeni doğal alanlar keşfetmeye meraklıdır. Bunların dışında sağlık turizmine de hizmet etmektedir. Türkiye’de bulunan Balıca Mağarası (Pazar-Tokat), Damlatış Mağarası (Alanya-Antalya), Astım Dilek Mağarası (Mersin), Tuz Mağarası (Çankırı) ve Oylat Mağarası (İnegöl-Bursa) kronik solunum hastalıklarına sahip kişiler tarafından sıklıkla ziyaret edilen mağaralarına birkaç örnektir (Akca ve diğ., 2016).

2.5. MAĞARA MİKROORGANİZMALARININ ÖNEMİ

Mağara mikroorganizmaları benzersizdir ve birçok açıdan önemlidir. Bunlardan ilki daha önce değinilen mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen reaksiyonların mağaraların ve mağara yapılarının oluşumuna katkılarıdır. İkincisi mağaralarda ilk kez keşfedilecek mikroorganizmaların bulunma potansiyelinin yüksekliğidir. Diğeri ise yeni biyoteknolojik ürünlerin kaynağı olmasıdır. Mağara ekosistemlerinde yapılan mağara mikrobiyolojisi alanındaki son çalışmalar, mağara mikroorganizmalarından elde edilebilen yeni biyoteknolojik ürünleri keşfetmeye odaklanmıştır. Bu mikroorganizmalar, antimikrobiyal ürünler ve enzimler gibi ihtiyaç duyulan maddelerin üretimini artırmak için düşük besin maddelerine ihtiyaç duyması nedeniyle özeldir. Bununla birlikte, ekstrem koşullarının doğası nedeniyle bazı mağara mikroorganizmaları kültür ortamında üretilemez dolayısı ile keşfedilen ürünlerin doğrudan izolasyonunun gerçekleştirilmesi zor olabilir. Ancak bu ürünler, onların üretiminden sorumlu genin belirlenmesi, doğrulanması ve moleküler tabanlı yöntemlerle o genin fenotipik olarak ifade edebilecek hazır standart bakterilere aktarılması ile üretilir (Ghosh ve diğ., 2017).

Mağara mikroorganizmalarının mağara ve speleothem oluşumlarındaki önemli rolü ve ekstrem yaşam koşullarına karşı gösterdikleri direnç, bu organizmalar tarafından üretilen ikincil metabolitlerin yer yüzeyinde üretilenlerden daha özel olmasını sağlamıştır. Mağaralardaki heterotrofik bakteriler, mağaraya giren organik bileşiği enzimatik olarak ayrıştırır ve aynı

ekosistemin diğer mikroorganizmalarına basit karbon (CO₂) ve azot sağlar. Farklı mağaralardan izole edilen *Bacillus* sp. ve *Nitrococcus mobilis*'in sırasıyla amonyak ve nitrit oksitleyen bakteriler olduğu ortaya konmuştur (Banerjee ve diğ., 2019). Bu bakterilerin ürettikleri enzimlerin, biyoremediasyon ve arıtmada kritik bir anahtar oluşturabileceği öne sürülmektedir (Banerjee ve diğ., 2019). İtalya'daki kükürt bakımından zengin derin Frasassi Mağara sisteminden, kükürt oksitleyen bakteri türleri izole edilmiş ve bu bakterilerin CO₂ fiksasyonu, ekzopolimerik madde salgılama (EPS), sülfürik asit oluşumu ve kirlenmiş deniz sedimentlerinden arseniği uzaklaştırma potansiyeline sahip oldukları tespit edilmiştir (Beolchini ve diğ., 2017).

Lipaz, proteaz, karboksilaz, amilaz, DNaz gibi enzimlerin varlıkları ve aktiviteleri, dünyadaki farklı mağaralardan izole edilen farklı bakterilerde taranmıştır. Hindistan'daki Gumki Mağarası'ndan izole edilen bakterilerin % 90'ının lipaz, amilaz ve proteaz enzimlerine sahip oldukları gösterilmiştir (Bukelskis ve diğ., 2019). Magura Mağarasından izole edilen bakterilerde ise bu enzimlere ek olarak ksantan liyaz, β -glikozidaz ve fitaz enzimleri belirlenmiştir (Rautela ve diğ., 2017). Mandeepkhol Mağarası'ndan (Hindistan) izole edilen *Brevundimonas diminuta* ve *Bacillus* türlerinin ise yüksek pektinolitik aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (Beolchini ve diğ., 2017). Her mağaranın mikrobiyal çeşitliliği açısından benzersiz olmasından dolayı, üretilen ürünlerin çeşitliliği de bir mağaradan diğerine farklılık göstermektedir. Bu ürünler saflaştırılabilir ve farmasötik, tıbbi ve gıda işleme gibi farklı endüstriyel amaçlarla kullanılabilir.

Mağarada biyoaktif bileşiklerin yanı sıra antimikrobiyal ve antikanser bileşikler ilaçların hammaddeleri vardır. İlaçların keşfi, 7 milyardan fazla dünya nüfusunun önünde büyük bir meydan okumadır. Bu meydan okuma, bilim insanlarının araştırma alanlarını genişletmesine neden olmuştur. Aslında, mağara ekosistemleriyle ilgili biyoaktivite konusu yaklaşık 30 yılı aşkın süredir incelenmeye devam etmektedir (Ghosh ve diğ., 2017; Axenov-Gribanov ve diğ., 2016). Yeni ve yüksek potansiyelli biyoaktif bileşik üretiminin, daha çok yeni bakteri, arke ve mantar taksonlarının keşfi ile olacağından Dünya'nın her yerindeki mağaralar araştırma alanıdır.

Mağara ekosistemlerin sahip olduğu mikrobiyal çeşitlilik içinde en baskın grubun Bacteria olduğu bilinmektedir. Antibiyotiklerin ve diğer ilaçların üretiminde en bilinen bakteriyel filum Actinobacteria'dır (Ghosh ve diğ., 2017; Goodfellow ve Fiedler., 2010). Bu filum, mağara

ekosistemine en çok hâkim olan üç filum arasında yer aldığından, bu alandaki yeni ilaç keşif çalışmalarının tatmin edici sonuçlar verdiği görülmektedir (Goodfellow ve Fiedler., 2010). Spesifik kültür ortamları kullanılarak birçok mağaradan Actinobacteria suşları izole edilmektedir (Ghosh ve diğ., 2017; Adam ve diğ., 2018). Mağara mikrobiyolojisi çalışmalarında kültür yöntemi ve enzim aktiviteleini tarayan yönelik çalışmalarda fetopik analiz sonuçları negatif iken genotipik analizler olabileceğinden, izole edilen bakterilerde ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) ve ketosentaz (KS) gen bölgeleri de aynı amaç için taranmaktadır (Kovácsová ve diğ., 2013., ve Bukelskis ve diğ., 2019). Proteobacteria ve Firmicutes gibi diğer filumlar, antibakteriyel aktivite pozitif bakteriler ve patojenler bu iki gen açısından taranmış ve birçoğunda tespit edilmiştir (Ghosh ve diğ., 2017; Rautela ve diğ., 2017; Lukoseviciute ve diğ., 2020). Klusaite ve diğ., (2016), aynı mağaradan izole edilen Gram pozitif suşlara karşı antibakteriyel aktivite gösteren Bacillaceae familyasına ait iki bakteri suşu tespit etmiştir. Bununla birlikte, bu iki izolatın antibakteriyel aktivitesi, Gram pozitif patojen bakterilere karşı test edildiğinde sonuçların farklı olduğu belirlenmiştir. Mağara mikroorganizmalarından izole edilen antibakteriyel ürünlerin çoğu bilinmemektedir. Klusait ve diğ., (2006), önceki çalışmada gösterilen iki suştan birinin antibakteriyel bileşikleri pirrolopirazin pirol [1,2-a] pirazin-1,4-dion, heksahidro3- (2 -metilpropil) diğerinin ise pirol [1,2-a] pirazin-1,4-dion, heksahidro-3- (fenilmetil)- ve 1,2-benzendikarboksilik asit, bis (2-metilpropil) ester olarak belirlenmiştir (Klusaite ve diğ., 2016).

Bununla birlikte, peptit A12-C, servimisin AD, undesiprodigiosin, ksiakemisin A, sırasıyla İspanya'daki Cueva de Los Murciélagos, İtalya'daki Grotta Dei Cervi, Sırbistan'daki Miroc Dağı'nda ve Çin'in Chongqing şehrinde bulunan karstik mağaralardan izole edilen bakteri izolatlarından saflaştırılan antimikrobiyal aktif ürünlerden bazılarıdır (Ghosh ve diğ., 2017; Banerjee ve diğ., 2019). Ayrıca servimisin A-D ve ksiakemisin A'nın antimikrobiyal aktivite dışında sitotoksik aktiviteler gösterdiği yani antikanserojen bileşikler olduğu da bildirilmiştir (Banerjee ve diğ., 2019). Ek olarak, Tayland'daki Pha Tup Mağarası'ndan izole edilen nadir bir Actinobacteria cinsi *Nonomuraea*'nın, insan akciğer kanseri ve insan ağız boşluğu kanserine karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Banerjee ve diğ., 2019). Ayrıca tıbbi uygulamaları için taranan bakteri ve bileşikler hakkında daha fazla araştırma yapılmalıdır.

2.6. MAĞARA KAMPLARI

Mağaraların keşfi, mağaracılar ve bilim insanları özellikle de jeologlar için her zaman büyük zorluklar içermiştir. Teknolojinin dolayısı ile ekipmanların gelişmesine rağmen mağaraların keşif süreci hala zorluklar içermeye devam etmektedir. Ulusal Speleoloji Derneği'ne (National Speleological Society, Inc.) bağlı Amerikan mağaracılar 1940 yıllarının başında mağara içinde veya mağara girişinin yakınında kamp kurmaya başlamıştır (Clemmer, 2019). Bir mağarada geçirilen süre mağaracıların koydukları hedeflere bağlıdır. Mağaracılar mağarada bazen sadece birkaç saat veya bir gün geçirirken uzun keşiflerde süre bir günden hatta bir aydan uzun sürebilir. Mağaracıların keşif gezileri esnasında rahat etmeleri ve enerjilerini mağara keşfine daha fazla harcayabilmeleri için kampların mağara içine kurulması gereklidir. Genellikle mağaranın derinliklerine inildikçe de mağaranın içinde kamp kurulması kaçınılmazdır. Çünkü mağaracıların tüm enerjilerini harcayıp tükenmelerinden sonra aynı gün yeniden mağaradan çıkmalarını beklemek gerçekçi değildir. Üstelik derinlere indikçe, ağır çantaları taşımak gereksiz enerji kaybına yol açar, bu nedenle yiyecek ve içecekleri bırakmak ve uyumak için bir kamp alanına sahip olmaları gerekir. Ancak mağaranın doğal kalitesinin korunması ve mağara çeşitliliğinin bozulmaması için kurulan kamp alanlarında da çok dikkatli olunmalıdır.

2.7. MAĞARACILARIN KEŞFETTİKLERİ YA DA GİRDİKLERİ MAĞARALARA ETKİLERİ

Mağaralar, paha biçilemez bir değere sahip doğal ekosistemler olarak önemli bir araştırma alanını oluştururlar. Mağaracılar, bir mağaranın en derin noktasına kadar gitmenin yanı sıra mağaranın sahip olduğu tüm yan kollara da girerek tüm mağaranın haritasını çıkarmak gibi amaçlara sahiptirler. Mağaraya göre değişmekle beraber genellikle mağara ekosistemleri derinleştikleri sürece, bilimsel araştırmalar için daha ekstrem ve daha değerli hale gelebilir. Tüm mağaracılık protokolüne saygı duyulsa ve uygulansa da mağaracıların bu doğal ekosistemler üzerinde negatif etkileri vardır. Bu etkiler mağaraların fiziko-kimyasal çevre koşulları üzerinde olabileceği gibi mağaranın biyotik faktörleri (mağaranın faunası ve florası) üzerine de olabilir. Bunun tersi olarak mağaracılık protokolüne uymayan mağaracıların mağara ekosistemlerine verdikleri zarar çok büyük boyutlarda olacaktır.

2.7.1. Mağaracıların mağaranın fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerindeki etkileri

Mağara ekosistemleri, dünyadaki en hassas ekosistemler arasındadır. Bu karanlık ekosistemler çoğunlukla mağaracılık faaliyetlerinden etkilenir. Mağaracıların kullandığı lambaların sağladığı ışık mağara içinde bulunan kimyasal reaksiyonları etkileyebilecek negatif etkilerden sadece biridir. Bunun dışında mağaracılar mağara içinde uzun süre kaldıklarında mağara kirliliği riskini arttırmaktadır. Bu kirlilik saç, yiyecek artıkları, organik madde içeren mineral sulardan oluşabilir. Bu tür oligotrofik ortamda, bu organik maddeler, mağara faunası ve florasına toksik olabilecek maddeleri içerebileceği gibi mağaranın mineral konsantrasyonlarını da ekleyecektir. Bu kimyasal kirlilikler mağara yapısının doğal jeolojik oluşumunu da etkileyebilir. Ayrıca mağaracılar, bilimsel araştırmalar için örnek alırken speleothem ya da kayalarının zarar görmesine neden olabilir. Speleothemlerde, örnek alımından sonra renk değişimi gözlemlenebilir. Çünkü bu renk oluşumu bölgenin pH'ı gibi birçok faktöre bağlıdır. Burada sayılabilecek bir diğer çevresel etki, mağaracıların aktiviteleri sonucunda mağara içindeki CO₂ miktarının artmasıdır (Kurniwan ve diğ., 2017).

2.7.2. Mağaracıların mağara biyoçeşitliliği üzerine etkileri

Mağara ekosistemleri, yalnızca ekstrem organizmaların yaşadığı doğal habitatlar olarak tanımlanır. Bu organizmalar arasında mikroorganizmalar (bakteriler, mantarlar ve arkeler), bitkiler (vasküler bitkiler) ve yarasalar gibi bazı hayvanları sıralayabiliriz. Daha derin mağara alanlarında ışığın olmaması, bu bölgelerdeki bitki gelişimi için büyük bir problem oluşturmaktadır. Malezya'daki bir mağarada yapılan çalışmada, bitkilerin (çoğunlukla kapalı tohumlular) sadece mağara girişinde görüldüğü ve bu bitkilerin mağara dışından gelen ışığı kullandığını öne sürülmüştür (Kiew, 2014). Mağaraların karanlık olması nedeni ile fauna ve mikrobiyal biyoçeşitlilik üzerindeki antropojenik etkilerle ilgili çalışmalar fazla önem kazanmamıştır.

Mağaracılar, mikroorganizmaları mağaranın dışından mağara içine aktarabilirler. Mağaraya organik materyallerin girmesi, bu dışarıdan taşınan mikroorganizmaların gelişimini sağlayabilir (Lavoie ve Northup, 2005). Lavoie ve Northup, (2005) Lechuguilla Mağarasında insanlar tarafından kaynaklanan kontaminasyonunu incelemişler ve insan cilt florasında bulunan *Staphylococcus aureus*, normal insan bağırsak florasında yer alan *E.coli* ve güneş ışığı ile ısınan yüksek sıcaklıktaki topraklarda bulunan *Bacillus* bulmuşlardır. Bu insan kaynaklı bakterilerin,

mağaranın çok ziyaret edildiği süreçte sayılarının arttığı, aynı alanlarda ziyaretten sonra dinlenme halindeyken sayılarının azaldığı belirlenmiştir. Bu tür oligotrofik ekosistemde, bu insan kaynaklı bakteriler, organik maddelerin artması nedeniyle hayatta kalabilir. Organik maddelerin bitmesi ile ya da organik maddelerin kullanımına bağlı olarak ekstrem olmayan mikroorganizmalar azalır veya ortadan kalkabilir (Alonso ve diğ., 2019). Ayrıca, mağaraya dışardan giren materyalleri, mağara mikrobiyal biyokütlesi ve çeşitliliği üzerinde farklılaşmaya da neden olabilir. Çalışmalar, dışkı varlığında bakteri yoğunluğunda önemli bir değişiklik olduğunu göstermektedir. Bu veriler organik girdinin mağara mikrobiyal çeşitliliğindeki önemini açıklamaktadır (Chelius ve diğ., 2009; Alonso ve diğ., 2019).

Morca Düdeni'nin keşfi sırasında -1040 metre derinlikte kurulan 4 gün aktif olarak kullanılan kamp alanından belirlenen 6 farklı noktadan kamp kurulmadan önce ve kamp kaldırıldıktan sonra alınan toprak/sedimet ve yüzey örneklerinden DNA izole edilmiş ardından metagenomik ve biyoinformatik analizleri yapılmıştır. Sonuçlar değerlendirerek kamp alanını 4 gün aktif olarak kullanan mağaracıların Morca Düdeni'nin prokaryotik profilini nasıl etkilediği ortaya konmuştur.

2.8. BİYOİNFORMATİK

Biyoinformatik, biyolojik makromoleküller (DNA, proteinler, ...) ile ilişkili bilgileri anlamak ve düzenlemek için hesaplama tekniklerinin uygulanması olarak tanımlanabilir. Biyoinformatik, verileri araştırmacıların mevcut bilgilere erişmesine izin verecek şekilde düzenlemeyi amaçlar. Ayrıca verilerin analizine yardımcı olabilecek araçlar ve kaynaklar geliştirme amacına da sahiptir. Son olarak, biyoinformatik, verileri analiz etmek için bu araçları kullanmayı ve aynı zamanda sonuçları biyolojik olarak anlamlı bir şekilde yorumlamayı hedefler. Biyoinformatikte kullanılan araçların, bazıları FASTA, QIIME ve PSI-BLAST programlarıdır (Luscombe ve diğ., 2001).

2.9. OPERASYONEL TAKSONOMİK ÜNİTE (OTU) VE OTU İSTATİSTİKLERİ

Operasyonel Taksonomik Ünite (OTU), genetik olarak birbirine benzeyen marker dizi gruplarından oluşan taksonomik topluluklardır (Teresita ve Hajibabaei, 2018). Bakterilerde kullanılan yaygın bir benzerlik eşiği, çoğu suşun % 97 16S rRNA sekans benzerliğine sahip olduğunu gösteren deneysel bir çalışmadan türetilen % 97'dir (Nguyen ve diğ., 2016).

2.9.1. Temel Komponent Analizi (PCA)

Temel Komponent Analizi (PCA), veri setindeki varyasyonların çoğunu korurken verilerin boyutlarını azaltan matematiksel bir algoritmadır (Jolliffe, 2002). Bu indirgemeyi, verilerdeki varyasyonun maksimal olduğu ana bileşenler adı verilen yönleri belirleyerek gerçekleştirir. PCA analizinin amacı sahip olunan verinin daha az sayıda değişkenle belirtilebileceği en iyi dönüşümü sağlamaktır. Örnekler daha sonra grafiğe dönüştürülebilir, bu da örnekler arasındaki benzerlik ve farklılıkları görsel olarak değerlendirmeyi ve örneklerin gruplanıp gruplanamayacağını belirlemeyi mümkün kılar (Ringner, 2008). Grafiklerde birbirine yakın olan örnekler, OTU içeriği bakımından diğer örneklerle göre daha benzer olduklarını göstermektedir.

2.10. ÇEŞİTLİLİK ANALİZLERİ

Çeşitlilik analizi, “bir örnekte kaç tür var?”, “bir örnek diğerlerinden ne kadar farklı?” ve “örnekler ne kadar benzer?” gibi çeşitlilikle ilgili soruları inceler (https://drive5.com/usearch/manual/piper_diversity.html). Çeşitlilik analizi hem alfa hem de beta çeşitliliği yoluyla yapılabilir. Ekolojik mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında, bu çeşitlilikler tür zenginliği, eşitliği ve dağılımı açısından iki veya daha fazla yeri karşılaştırmak için kullanılır. Hem alfa hem de beta çeşitlilik ölçümleri, bir OTU (Operasyonel Taksonomik Birim) tablosuna göre hesaplanır.

Alfa çeşitliliği, tek bir bölge veya belirli bir topluluk içindeki taksonların zenginliğini inceler. Alfa çeşitlilik endeksleri, türlerin ekolojik kaynakları nasıl paylaştığını yansıtır (Sepkoski, 1988). QIIME paketi gibi bazı biyoinformatik programlar aracılığıyla farklı çeşitlilik ölçüleri hesaplanabilir. Bir yerin alfa çeşitlilik hesaplamaları Chao1, Shannon ve Simpson indeksleri aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Chao1 indeksi, bir bölgede bulunan türlerin zenginliğini belirler. OTU sayısına dayanarak ölçüm yapar ancak az sayıda elemana sahip taksonomik üniteleri de hesaplamanın içerisine düzeltme faktörü olarak katar. Böylece dominant olmayan türlerin çeşitliliği yüksek göstermesine engel olur. Shannon indeksi, bir örnekteki veya tek bir topluluktaki tür çeşitliliğini belirleyen bir çeşitlilik ölçüsüdür. Tür sayısının haricinde türlerin homojen bir dağılıma sahip olup olmadığını da hesaplamanın içine katar. Hem tür çokluğu hem de taksonların homojen bir şekilde dağılmış olması ile çeşitlilik tanımlanabilmektedir. Simpson, OTU frekansının OTU'larının toplamı olarak hesaplanan alfa

çeşitliliğinin bir eşitlik ölçüsüdür. Simpson endeksi, OTU'ların bir bölge içinde nasıl dağıldığına odaklanır (https://drive5.com/usearch/manual/alpha_metrics).

Beta çeşitliliği, topluluklar veya bölgeler arasında fauna veya floranın taksonomik farklılaşmasını değerlendirir. Çevresel gradyanlar boyunca tür kompozisyonundaki değişikliklerini değerlendirmek için kullanılabilir (Sepkoski, 1988). Bir beta çeşitlilik ölçütü, örneklerin ne kadar benzer veya farklı olduğunu belirtmek için seçilen tek bir sayıyı hesaplayarak iki veya daha fazla örnekteki OTU bolluğunu karşılaştırır (https://drive5.com/usearch/manual/beta_metrics.html).

2.11. SICAKLIK HARİTASI (HEATMAP)

Farklı türler veya hücreler arasındaki ilişkiyi göstermek için kullanılan başka bir yöntemdir. Dziuda, (2009) sıcaklık haritasını, bir matristeki tek tek değerlerin renkler olarak temsil edildiği verilerin grafik bir temsili olarak tanımlar. Sıcaklık haritaları, bir alandaki noktaların, hücrelerin veya türlerin yoğunluğunu gösterir. Renkler, bir türün bir alanda ne kadar bol olduğunu gösterir (DeBoer, 2015). Veri matrisinin karşılık gelen ögesinin değerini belirlemek için her bir döşemenin bir renk ölçeğinde gölgelendirildiği dikdörtgen bir döşemeden oluşur. Döşemenin sıraları (sütunları), benzer sütunlar birbirine yakın olacak şekilde sıralanır. Döşemenin dikey ve yatay kenarlarında hiyerarşik küme ağaçları yer alır (Wilkinson ve Friendly, 2009). Bu analiz, örnek gruplarının birbiri ile örtüşüp örtüşmediğini veya ayrı kümeler oluşturup oluşturmadığını görmemizi sağlar.

2.12. TEMEL KOORDİNAT ANALİZİ (PCOA)

PCoA, verilerin benzerliklerini veya farklılıklarını araştırmak ve görselleştirmek için kullanılan bir yöntemdir. PCoA örnekler arası farklılığı göstermektedir. Genelde filogenetik ya da mesafe matrix bilgileri kullanarak örneklerin karşılaştırılmasını sağlar yani birkaç boyutta bir dizi nokta arasındaki mesafelere göre mesafelerin/farklılıkların bir matrisini yaklaştırmak için spektral ayrışma kullanan bir ölçekleme yöntemidir. PCoA, değişkenler veya gözlemler üzerine uygulanabilir. PCoA için kullanılan diğer isimler metrik çok boyutlu ölçeklendirme ve klasik ölçeklendirmedir (Zuur ve diğ., 2007).

2.13. KÜMELEME ANALİZİ (CLUSTER)

Küme analizinde, örnek verileri hiyerarşik olarak kümelenir ve birbirleri ile olan ilişkileri tanımlanarak gruplanır. Bir grup içindeki benzerlik ne kadar yüksekse iki örnek arasındaki mesafe o kadar yakın, gruplar arasındaki fark ne kadar fazlaysa mesafe o kadar uzaktır (Steinbach ve diğ., 2005). Kümeleme analizi metagenomik analizlerde mikrobiyom profilinin aydınlatılmasında kullanılmaktadır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MORCA DÜDENİ'NİN KEŞİF TARİHİ/ HİKAYESİ

Morca Düdeni, 1989-1996 yılları arasında Boğaziçi Üniversitesi Mağaracılık Kulübü tarafından düzenlenen Çukurpınar keşif seferleri sırasında, gruba rehberlik eden bir köylü tarafından gösterilen mağaralardan biridir. Ancak 2012 yılına kadar o bölge tekrar araştırılmamıştır. 2012 yılında taş atma testi ile heyecanlandıran Morca Düdeni'ne ilk araştırma gezisi Ender USULOĞLU'nun başkanlığında 2013 yılında yapılmış ve -120 metreye inilmiş sonucunda da daha derine inme beklentisini oluşturmuştur. 2014 yılında haritalanmasına başlanmış ve -427 metre derinliğe kadar keşif gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki keşif seferi 2018 yazının sonunda yapılmış ve Morca -919 metre derinliği ve yaklaşık 3 km uzunluğu ulaşılmıştır. 2019 yılında örneklememizi yaptığımız keşif seferinde 1210 metre derinliğe 4 km uzunluğa ulaşılarak Türkiye'nin en derin 3. Mağarası olarak teyit edilmiştir.

Türkiye'nin en derin iki mağarasıyla (en derin mağara EGMA Peynirlikönü -1429 metre en derin ikinci mağara ise Kuzgun Düdeni -1400 metre) Morca mağarası Taşeli (Taşların Evi) adı verilen yüksek bir plato olan Orta Toros dağlarında bulunmaktadır. Bu plato yaklaşık 900 km²'dir. Ayrıca Morca mağarası, Türkiye'nin en derin iki mağarasının aynı jeolojik oluşumunda, her ikisine kıyasla 200 metre yükseklikte bir giriş ile yer almaktadır. Teorik olarak -1600 metre derinliğe ulaşabilir. Türkiye'nin ve dünyanın ilk 10 derin mağarası arasında en derin mağara olma potansiyeline sahiptir.

3.2. MORCA DÜDENİ KONUM VE ÖZELLİKLERİ

Morca Düdeni, Alp-Himalaya orojenik kuşağı üzerinde bulunan Toroslar'ın orta kesiminde (36° 18' 34.37'' K, 32° 39' 37.10'' D koordinatlarında) ve Taşeli Platosu güneyinde yer almaktadır (**Şekil 3.1**). Taşeli Platosu yapısal bir düzlük olup genel olarak kuzeybatı doğrultulu faylarla şekillenmiştir. Taşeli platosu yaklaşık 1600 metreye varan bir kalınlıkta farklı yaşlarda kireçtaşları bulundurmaktadır.



Şekil 3.1: Taşeli Platosu (<http://aspeg.org.tr/>).

Taşeli Platosu üzerinde bulunan Morca Düdeni ise platonun güneye yakın kesiminde miyosen ile Jura-Kretase yaşlı kireçtaşlarının dokanağında bulunmaktadır (**Şekil 9**). Bu alan Kuzey-Batı yönü tektonik hattı tarafından kontrol edilen fay, bindirmeye bağlı fay, kıvrım ve sistemli eklem takımlarının geliştiği genel olarak Kuzey-Doğu eğimli kireçtaşı, killi kireçtaşı ve şelf çökellerini barındırmaktadır. Bütün Kuvaterner buzul dönemlerinden etkilenen mağara, oluşumunu kar ve yağışla sürdürmektedir. Bunun yanı sıra hidrotermal ergiyik izleri taşıyan öz şekilli kuvars minerallerinin bulunduğu çatlak yüzeyleri gözlemlenmiştir. Mağara, yağış ve kar erimesine bağlı olarak sürekli -80, -120, -1030, -1040 ve -1015 metre su girişleriyle beslenir. Mağaranın 1120 metre derininde bulunan sifon ile son bulan koldaki şaftta yaklaşık 68 metre yükseklikten dökülen sular mağaranın diğer önemli su kaynağını oluşturmaktadır.

3.3. ÖRNEKLEME

Çalışma kapsamında, Morca Düdeni’nden mağaracıların keşfe devam edebilmeleri için kurulan kamp alanından, kamp kurulmadan önce ve kamp kaldırıldıktan sonra A, B, C, D, E, ve F noktalardan toprak/sediment ve sürüntü örnekleri steril kaplara aseptik koşullarda alınmış, soğuk zincir ile en kısa sürede mikrobiyoloji araştırma laboratuvarına ulaştırılmıştır. Örneklemeye noktaları **Tablo 3.1** ve **Şekil 3.2**’de gösterilmiştir. Örneklem alanının nem ve sıcaklık değerleri taşınabilir sıcaklık/nem ölçer cihazı (EcoSense® DO200A) ile ölçülerek sonuçlar kaydedilmiştir.

Tablo 3.1: Örnek ve örnekleme noktaları.

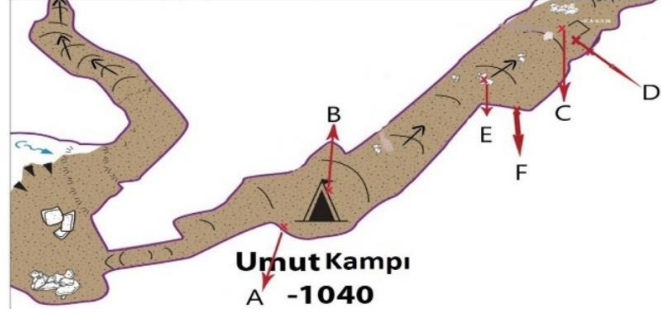
Örneğin tipi	Örnek kodu	Örnekleme zamanı	Örnekleme yeri	
Yüzey	NAR 1	Kamp Öncesi	Kamp alanı	A
Yüzey	NAR2	Kamp Sonrası	Kamp alanı	
Sediment	NAR3	Kamp Öncesi	Kamp alanı	B
Sediment	NAR4	Kamp Sonrası	Kamp alanı	
Sediment	NAR5	Kamp Öncesi	Tuvalet1	C
Sediment	NAR6	Kamp Sonrası	Tuvalet1	
Sediment	NAR9	Kamp Öncesi	Tuvalet2	D
Sediment	NAR10	Kamp Sonrası	Tuvalet2	
Yüzey	NAR11	Kamp Öncesi	İnsan etkisinden uzak	E
Yüzey	NAR12	Kamp Sonrası	İnsan etkisinden uzak	
Sediment	NAR13	Kamp Öncesi	İnsan etkisinden uzak	F
Sediment	NAR14	Kamp Sonrası	İnsan etkisinden uzak	

3.4. DNA İZOLASYONU VE NANODROP ÖLÇÜMESİ

Alınan toprak ve yüzey örneklerindeki DNA “FastDNA Spin Kit For Soil” kiti kullanılarak izole edilmiştir. Aşağıda “FastDNA Spin Kit For Soil” kit prosedürüne göre gerçekleştirilen DNA izolasyonu basamak basamak açıklanmıştır.

1. a) Toprak örnekleri aseptik koşullar altında yaklaşık 500 mg tartılmış ve kitin ‘Lysing Matrix E’ tüplerine konmuştur.
- b) Yüzey örneklerinin alındığı eküvyonlar vorteksenerek eküvyondaki mikroorganizmaların steril serum fizyolojik tuzlu suya geçmesi sağlanmış ardından mikroorganizmaların bulunduğu sıvı steril ependorflara paylaştırılmış ve 5 dk 14000 rpm

de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı dikkatli şekilde atılmış ve dip kısım aseptik koşullar altında ‘Lysing Matrix E’ tüplerine transfer edilmiştir.



Şekil 3.2: Örneklem noktaları (ASPEG üyesi Ümit Günhan tarafından çizildi).

2. Örneklerin alındığı ‘Lysing Matrix E’ tüplerine 978µl sodyum fosfat tamponu ve 122µl MT tamponu eklenmiştir.
3. Tüpler vortekslenmiş ardından FastPrep-24™ (MP Biomedical) cihazında 40 saniye, 6.0 m/s hız ile homogenize edilmiştir.
4. Ardından tüpler (15 dk, 14000 rpm) santrifüj edilmiştir.
5. Süpernatant dikkatlice steril 2ml lik tüplere transfer edilmiş. Üzerine 250µl PPS (Protein presipitasyon solüsyonu) eklenmiş ve tüpler 10 defa aşağı yukarı çevrilmiştir.
6. Ardından tüpler (5dk, 14000 rpm) santrifüj edildikten sonra üst kısım 15ml lik steril tüplere transfer edilmiştir.
7. Kitteki ‘Binding Matrix’ süspansyonu yavaşça karıştırılarak homojenize edilip 1000µl’si 15 ml’lik tüplere alınmıştır.
8. Tüpler 2dk sürece aşağı yukarı dikkatlice çevrilerek DNA’ların bağlanması sağlanmıştır. Tüpler 3 dk oda ısısında bekletilmiştir.
9. Tüpün altındaki çökeltiye dokunmadan 500µl üstteki sıvı alınmış ve atılmıştır.
10. Ardından tüpte kalan Binding Matrix solüsyonu pipet ile süspanse edilmiş ve bu karışımın yaklaşık 600 ul’si bir “SPİN” filtre içeren tüplere aktarılmıştır. Santrifüj (2 dk, 14000 rpm) edildikten sonra sıvının biriktiği alt kısım atılıp filtreler yeni tüplere (Catch Tube) yerleştirilmiştir. Kalan karışım da filtreye eklenmiş ve tekrar santrifüj edilmiştir. Altta tüpler yeniden değiştirilmiştir.
11. SEWS-M solüsyonundan 500µl filtreye eklenmiş ve 2dk santrifüj edilmiştir. Filtreler yeni tüplere konmuştur. Tüpler yeniden 2dk santrifüj edilmiştir.

12. Spin filtreler steril ependorflara konmuş oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir.
13. 30µl DES (DNase/Pyrogen-Free Water) solüsyonu (Elüsyon tamponu) filtreye eklenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2dk santrifüj edilmiştir. Ependorf tüpe biriken sıvı izole edilen DNA'yı içermektedir.
14. Nanodrop cihazı kullanılarak DNA konsantrasyonu belirlendikten sonra tüpler 4°C'e kaldırılmıştır.

3.5. 16S RRNA AMPLİKON ANALİZİ

İzole edilen DNA örneklerinden 16S rRNA gen bölgesi V4-V5 değişken bölgesi Bacteria ve Archaea'ye özgü universal 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') ve 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') primerleri Parada (2015) ve Walters ve diğ. (2015) metodlarına göre ileri ve geri primerlere eklenmiş barkod dizileri ile amplifiye edilmiştir. PZR amplifikasyonları bu kütüphane hazırlama kiti kullanılarak, PZR cihazında 94°C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben, 28 döngü 94°C'de 30 saniye, 53°C'de 40 saniye ve 72°C'de 60 saniye, sonrasında son uzatma aşaması olarak 72°C'de 5 dakika bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon sonrası PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek amplifikasyon kontrol edilmiş, her örneğe ait ürünlerin konsantrasyonları ölçülmüş ve iki molar miktarda karıştırılmıştır. Birleştirilen ampliconlar kit içeriğindeki AMPure XP (Beckman Coulter, USA) manyetik boncukları kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen birleştirilmiş ve saflaştırılmış örnekler, DNA kütüphanesi hazırlama kiti protokollerine göre, kütüphane kantifikasyonu da yapılarak, dizilemeye hazır hale getirilmiştir. Yeni nesil DNA dizileme (Next Generation Sequencing - NGS) hizmeti için, MiSeq cihazında her örnek için ortalama 50.000 okuma (2x300 bp) elde edilecek şekilde hizmet alımı gerçekleştirilmiştir.

3.6. BİYOİNFORMATİK VE İSTATİSTİK ANALİZLER

Dizileme sonrasında elde edilen tüm dizinin kalite kontrolü FASTQC programında gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA amplicon verisi, QIIME (Caporaso ve diğ., 2010) yazılım paketi kullanılarak analiz edilmiştir. İlk olarak demultipleksleme işlemi ile dizilerdeki barkod bilgisi kullanılarak her örneğe ait ileri ve geri diziler ayrılmıştır. Bu aşamada ileri/geri primer ve barkod dizilerinin tamamının eşleşmediği fragmanlar analiz dışı tutulmuş ve fragmanlardaki adaptör ve barkod dizileri kesilerek analize hazır hale getirilmiştir. Her fragmanın ileri ve geri dizileri en fazla %20 farklılık oranı ile birleştirilmiştir. Fragmanlar UCLUST (Edgar, 2010)

yazılımı ile %97 benzerlik seviyesinde OTU (operational taxonomic unit) birimlerine kümelendirilmiştir. OTU tespiti için %97 benzerlik oranı ile açık referanslı OTU seçimi (pick_open_reference_otus.py) protokolü işletilmiştir. Her OTU'yu temsil eden dizi seçilerek PyNAST (DeSantis ve diğ., 2006) yazılımı kullanılarak, Greengenes veri tabanına hizalaması (alignment) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca yalnızca 1 dizi içeren OTU birimleri tespit edilerek analizden değerlendirme dışı bırakılmıştır. Daha sonra, örneklerin her OTU kümesindeki dizilerinin miktarları belirlenerek OTU tablosu oluşturulmuştur. OTU tablosundaki OTU birimlerinin taksonomik sınıflandırması yine Greengenes veritabanı ve UCLUST algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taksonomik seviyelerin görselleştirilmesi bar ve alan grafikleri şeklinde yapılmıştır. Örneklerin alfa-çeşitlilik analizleri yine QIIME yazılımı ile OTU tablosu kullanılarak belirlenmiş olup, çeşitlilik seviyelerini belirten Chao1, Shannon, Simpson ve observed_otus indekslerinin hesaplanması yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. NANODROP SONUÇLARI

Tablo 4.1: Elde edilmiş DNA konsantrasyonları

Örnek	DNA konsantrasyonu
NAR 1	2,5 ng/μl
NAR 2	3 ng/μl
NAR 3	1,7 ng/μl
NAR 4	3 ng/μl
NAR 5	2,6 ng/μl
NAR 6	2,9 ng/μl
NAR 9	1,9 ng/μl
NAR 10	3,4 ng/μl
NAR 11	4,1 ng/μl
NAR 12	3,1 ng/μl
NAR 13	3,8 ng/μl
NAR 14	2,2 ng/μl

4.2.ÖRNEKLEME ALANLARININ TAKSONOMİSİ VE ALFA ÇEŞİTLİLİĞİ

Morca mağarasının kamp kurulan bölgesinin yerli mikrobiyal topluluğu, kamptan önce alınan NAR1, NAR3, NAR5, NAR9, NAR11 ve NAR13 örnekleriyle belirlenmiştir. Kamp alanında hem Bacteria hem de Archaea domaini tespit bulunmuştur. Bununla birlikte, kamp bölgesinde Bacteria grubunun Archaea grubuna göre baskın olduğu belirlenmiştir. En yüksek oranda Thaumarchaeota, ardından Euryarchaeota ve Nanoarchaeaeota olmak üzere toplam 3 Archaea filumu tespit edilmiştir. Her filumun bir sınıfla temsil edildiği gözlemlenmiştir. Cins düzeyinde, bu mikroorganizma üyelerinin bazılarının tanımlanamadığı, çoğunun ise kültüre edilemeyen Archaea olduğu belirlenmiştir. Tanımlanan tek cins Thaumarchaeota filumu, Nitrososphaeraceae familyasına ait *Candidatus Nitrososphaera* olarak kayıtlara geçmiştir.

Öte yandan, mağaranın kamp yapılan bu bölümünde, her örneğin en az 8 filum içerdiği toplam filum sayısının ise 20 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada en yüksek oranda bulunan Bacteria filumları Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes ve Acidobacteria üyeleri olarak belirlenmiştir. Bu filumların her bir örnekte farklı oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca incelenen altı örnekte kalan 12 filumdan en az biri gözlemlenmiştir.

Tablo 4.1 kamptan önce ve sonra her örnekleme alanındaki mikrobiyal dağılımı göstermektedir. Her alanın alfa çeşitliliği, Chao1, Shannon indeksi ve Simpson indeksi ile değerlendirilmiştir. Chao1 indeksi tür zenginliğini gösterirken, Shannon indeksi ve Simpson indeksi mikrobiyal çeşitliliğin varyasyonunu göstermektedir. Shannon indeksi, hem tür zenginliğini hem de eşitliği dikkate alırken, Simpson indeksi, çevredeki türlerin baskınlığıyla doğrudan ilişkilidir.

4.2.1. Kamp yüzey oluşum alanı (NAR1 ve NAR2)

Dizileme sonuçları incelendiğinde kamptan önce alınan NAR1 örneğinde toplam 143 OTU tespit edilmiştir. Gözlemlenen OTU sonuçlarına göre NAR1 ve NAR2 arasında önemli bir fark olmadığı ortaya konmuştur. OTU'ların % 100'ü Bacteria yelerinden oluşurken, bu örneklerde Archaea belirlenememiştir (**Şekil 4.1**). NAR2 örneğindeki Bacteria NAR1'e göre % 39,17 oranında artmıştır. NAR1 örneğinde, Proteobacteria (% 75), Firmicutes (%10), Bacteroidetes (% 8) ve Actinobacteria (% 3,6) başta olmak üzere 9 filum tespit edilmiştir. Aynı şekilde NAR2 örneğinde de Proteobacteria (% 52) ve Firmicutes (% 44) en baskın filumlar olarak belirlenmiştir. Ancak NAR2'de Proteobacteria üyelerinde % 23 oranında bir düşüş belirlenirken Firmicutes üyelerinde % 34 oranında artış tespit edilmiştir. Ayrıca, NAR2 örneğinde Bacterioidetes ve Actinobacteria üyelerinin azaldığı da kaydedilmiştir. Tespit edilen Planctomycetes, Acidobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes ve Patescibacteria filumlarının %1'den düşük oranda bulunmuştur. Yüksek oranda olmasa da (% 0,8), kamptan sonra alınan NAR2 örneğinde NAR1'de görünmeyen Dependitiae filumu belirlenmiştir (**Şekil 4.2**).

Tablo 4.2: Örneklerin mikrobiyal alfa çeşitliliği.

Örnek adı	observed_otus	Chao1	Shannon	Simpson
NAR1	143	143,84	4,33366683	0,89642167
NAR2	141	141,073171	3,21232636	0,77297703
NAR3	181	181,714286	5,55291075	0,94545035
NAR4	338	342,185567	5,57312221	0,92961233
NAR5	248	253,470588	5,29015907	0,91483449
NAR6	534	539,181818	6,58862234	0,96356608
NAR9	433	438	6,6201419	0,9687542

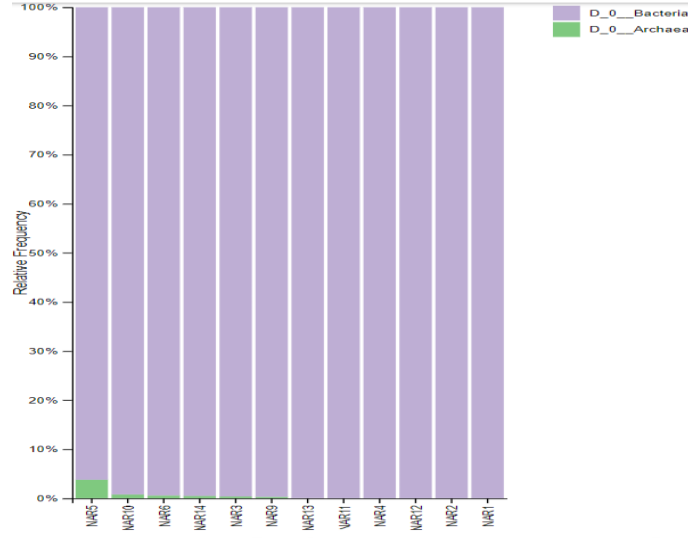
Tablo 4.2 (devam): Örneklerin mikrobiyal alfa çeşitliliği.

Örnek adı	observed_otus	Chao1	Shannon	Simpson
NAR10	259	260,971015	5,85763549	0,9538749
NAR11	99	99,3225807	2,72164891	0,70017731
NAR12	68	69,75	3,34706149	0,8126361
NAR13	457	461,093023	6,3075618	0,95749345
NAR14	580	585,948276	6,77339731	0,96690015

NAR1 örneğinde yüksek oranda tanımlanan sınıflar, Proteobacteria filumuna ait olan Gamma-proteobacteria (% 46) ve Alphaproteobacteria (% 29), Bacilli (% 10), Bacteroidia (% 8) ve Actinobacteria (% 2) olarak tespit edilmiştir. Kamp sonrası alınan NAR2 örneğinde ise Gama-proteobacteria ile birlikte Bacilli sınıfı aynı oranda (% 44) bulunmuştur. Alphaproteobacteria üyeleri NAR2'de % 7,4 oranına düşmüştür. Ayrıca, Firmicutes filumuna ait *Clostridium* (% 0,02) *Negativicutes* (% 0,02) sınıfları NAR1'de tespit edilmezken bu sınıflar NAR2 örneğinde bulunmuştur. Her iki örnekte de tanımlanan diğer sınıflar % 1 oranının altında bulunmuştur (Şekil 4.3).

Proteobacteria filumuna ait *Acinetobacter*, NAR1 örneğinde en baskın cins (% 23) olarak bulunurken, onu Alphaproteobacteria sınıfına ait *Brevundimonas* cinsi (% 19) izlemiştir. *Acinetobacter* üyeleri (% 30) NAR2'de % 7 oranında artmış olsa da, bu cins Bacilli sınıfına ait *Exiguobacterium* (% 35) cinsinin gerisinde kalarak ikinci baskın cins olarak belirlenmiştir. Betaproteobacteria sınıfına ait *Massilia*, *Pseudomonas*, *Noviherbaspirillum* ve *Wb1-P19*, Bacilli sınıfına ait *Aerococcus* ve *Exiguobacterium*, Bacteroidetes sınıfına ait *Flavobacterium* NAR1'de bulunma oranları % 1-10 aralığında olan diğer cinslerdir. Ayrıca, *Brevibacillus*, kamp öncesi alınan NAR1 örneğinde tespit edilmemişken NAR2'de gözlenmiştir. NAR2 örneğinde ise NAR1 örneğinden farklı olarak *Flavobacterium* ve *Pseudomonas* cinsi tespit edilememiş ayrıca en baskın cins *Exiguobacterium* olarak kaydedilmiştir. Bunun dışında bulunan cinsler ise önemli bir fark olmaksızın tanımlanmıştır. Diğer tanımlanan cinslerin her birinin bulunma oranı her iki örnekte de % 1 oranından düşüktür (Şekil 4.4).

Bölgenin tür bolluğunu gösteren Chao1, bu alanın kamp öncesi mikrobiyal türler açısından bolluk anlamında zengin olduğunu göstermiştir. Buradan alınan örneklerin Shannon indeksi ve Simpson indeksi değerleri, bu alandaki en yüksek çeşitliliğin kamp öncesi olduğunu göstermektedir (Tablo 4.2).



Şekil 4.1: Örneklerdeki Bacteria ve Archaea bulunma yüzdeleri.

4.2.2. Kamp alanı (NAR3 & NAR4): Sediment örnekleri

Kamptan sonra alınan NAR4 örneğinde % 100 oranında Bacteria, kamptan önce alınan NAR3 örneğinde ise % 99,6 oranında Bacteria ve % 0,35 Archaea tespit edilmiştir (**Şekil 4.1**). NAR3 örneğinde Euryarchaeota (% 0,2) ve Thaumarchaeota (% 0,1) tespit bulunmuştur. Tespit edilen bu filumların ise birer sınıf ile temsil edildiği (Euryarchaeota'ya ait Thermoplasmata ve Thaumarchaeota filumuna ait Nitrososphaeria) belirlenmiştir (**Şekil 4.2**). Cins düzeyinde ise tanımlanamayan bir suşun yanında iki kültüre edilemeyen Archaea olduğunu tespit edilmiştir.

NAR3 örneğinde Bacteria domainine ait Proteobacteria (% 60), Actinobacteria (% 22,8), Acidobacteria (% 4,3), Rokubacteria (% 2,9), Planctomycetes (% 2,7) ve Chloroflexi (% 2,4) baskın olmak üzere 13 filum tespit edilmiştir. Diğer filumlar % 1 oranından küçük ya da % 1 olarak bulunmuştur. NAR4 örneğindeki Bacteria filum sayısı 18 olarak tespit edilmiş ve kamp öncesi aynı noktadan alınan NAR3 örneğine göre filum sayısının fazla olduğu belirlenmiştir. NAR3 örneğinde olduğu gibi NAR4 örneğinde de Proteobacteria (% 70) en baskın filum olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, NAR4 örneğinde Acidobacteria üyeleri % 4,33 ve Bacteroidetes üyeleri % 1,89 oranında önemli bir artış gösterirken, Actinobacteria % 15,4 ve Chloroflexi üyeleri % 2,35 oranında düşüş göstermişlerdir (**Şekil 4.2**).

Hem NAR3 hem de NAR4 örneklerinde sırasıyla % 47 ve % 58,9 oranlarıyla Gammaproteobacteria sınıf üyelerinin hakim olduğu belirlenmiştir. % 16,6 ile Actinobacteria NAR3 örneğinde ikinci baskın sınıf iken, bu sınıfın üyeleri NAR4 örneğinde % 11,25 düşüş

oranıyla büyük ölçüde azalmıştır. Alphaproteobacteria, NAR3 örneğinde % 13 ile üçüncü baskın sınıf iken NAR4 örneğinde % 3 oranında düşüş göstermesine rağmen ikinci baskın sınıf olarak kayıtlara geçmiştir (**Şekil 4.3**). NAR3 örneğine *Pseudomonas* (% 17) ve *Acinetobacter* (% 14) cinsi hakim olurken, NAR4 örneğine *Wb1-P19* (% 17,6) ve *Limnobacter* (% 15,7) cinsi hakim olmuştur. Ayrıca NAR4 örneğinde bulunan *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* üyelerinde NAR3 örneğindeki oranlarına göre sırasıyla % 4 ve % 15,3 oranında düşüş belirlenmiştir (**Şekil 4.4**).

Alfa çeşitlilik indekslerinin (Chao1, Shannon ve Simpson indeksleri) değerleri, kamptan sonra alınan örnek olan NAR4'ün en yüksek tür bolluğuna ve en düşük mikrobiyal çeşitliliğe sahip olduğunu göstermiştir (**Tablo 4.2**).

4.2.3. Tuvalet alanı 1 (NAR5 & NAR6)

Çalışılan tüm örnekler içinde en yüksek Archaea % 3,7 oranıyla kamptan önce alınan NAR5 kodlu örnekte gözlenmiştir. Kamp sonrası alınan NAR6 örneğinde Archaea üyelerinin ve çeşitliliğinin azaldığı belirlenmiştir (**Şekil 4.1**). NAR5 örneğinde % 2,95 oranı ile baskın olan Euryarchaeota filumu dışında Thaumarchaeota (0.75 %) ve Nanoarchaeaeota (0.06 %)da tespit edilmiştir (**Şekil 4.2**). NAR5 örneği Archaea domainine ait Thermoplasmata, Woesearchaeia ve Nitrososphaeria sınıfları ile temsil edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde NAR5 örneğinde *Candidatus Nitrososphaera* cinsi % 0,1 oranında bulunurken bu örnekte tanımlanan Archaea'ların çoğunun kültüre edilemeyen Archaea olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 4.4**). Diğer yandan, Thaumarchaeota NAR6 örneğinde en baskın filum olarak belirlenirken Nanoarchaeaeota filumu bulunamamıştır (**Şekil 4.2**).

NAR5 örneğinde Actinobacteria (% 42,85), Proteobacteria (% 28,85), Rokubacteria (% 7,4), Acidobacteria (% 4,3) ve Chloroflexi (% 3,7) olmak üzere Bacteria domainine ait 18 filum belirlenmiştir. NAR6 örneğinde tespit edilen filum sayısı da 18 olarak bulunmuştur. 15 filumun NAR5 örneğindeki filumlar ile ortak olduğu belirlenmiştir. NAR6 örneğindeki üç yeni filum Dadabacteria, Verrucomicrobia ve Zixibacteria olarak tespit edilmiştir. Kamp öncesi alınan NAR5 örneğinde Firmicutes % 1 oranında bulunurken kamp sonrası NAR6 örneğinde Firmicutes % 53 olarak tespit edilmiştir. NAR6 örneğinde Proteobacteria % 19,14 oranında bulunmuş yani NAR5 örneğine göre % 9,71 azalma oranı belirlenmiştir (**Şekil 4.1**). Benzer

olarak Actinobacteria üyelerinde de NAR5 örneğine göre önemli bir düşüş (% 35,17) gözlenmiştir.

NAR5 örneğinde Actinobacteria (% 39) ve Gammaproteobacteria (% 25) sınıfları baskın olarak belirlenirken, NAR6 örneğinde Bacilli (% 45) ve Gammaproteobacteria (% 14) sınıflarının hakimiyeti tespit edilmiştir (**Şekil 4.3**). Burada, kamptan sonra alınan örnekteki Gammaproteobacteria sınıfındaki % 11 oranındaki düşüş dikkat çekicidir. Ayrıca NAR5 örneğinde bulunmayan NAR6 örneğinde bulunan Clostridia sınıfı üyelerinin % 8,49 oranında tespit edilmesi ilginçtir. NAR5 örneğinde *Nocardioides* cinsi üyeleri (% 19,5) en baskın cins olarak tanımlanırken, NAR6 örneğinde *Exiguobacterium* (% 14,7) ve *Brevibacillus* (% 12,1) en fazla bulunan cinsler olmuştur. Her iki örnekte de tanımlanmış cinslerin oranı % 10'dan daha az olarak tespit edilmiştir (**Şekil 4.4**).

Toplam gözlenen OTU türleri ve bu alanda alınan örneklerin Chao1indeksine göre kamptan sonra alınan NAR6 örneğinde mikrobiyal tür zenginliğinin arttığı belirlenmiştir. Simpson ve Shannon indeks değerleri de paralel olup kamp döneminden sonra mikrobiyal çeşitlilik artışını göstermektedir (**Tablo 4.2**).

4.2.4. Tuvalet alanı 2 (NAR9 & NAR10)

Bu örnekleme alanında kamptan önce alınan örnekte (NAR9) Archaea üyeleri sadece % 0,2 oranında belirlenmiştir (**Şekil 4.1**). Euryarchaeota, Thaumarchaeota ve Nanoarchaeota filumları ile temsil ettiği gözlenmiş ve en baskın filum Thaumarchaeota olarak tespit edilmiştir. Archaea topluluğunun, tanımlanan her bir filum için bir sınıf, bir ordo, bir familya ve bir cins ile temsil edildiği belirlenmiştir. Tanımlanan cinslerin kültüre edilemeyen Archaea olduğu tespit edilmiştir. Kamptan önce alınan örnekle karşılaştırıldığında, NAR10 örneğinde Archaea domainine ait üyelerde bir artış gözlemlenirken sadece Thaumarchaeota ve Euryarchaeota filumlarını içerdiği belirlenmiştir. Euryarchaeota % 0,67 bulunma oranı ile NAR 10 örneğinin baskın filumu olarak kaydedilmiştir (**Şekil 4.2**). Bu örnekteki filum düzeyi NAR9 örneğine göre azalmış olsa da sınıf ve ordo düzeyinde daha çeşitli olduğu tespit edilmiştir.

NAR9 örneğinde tanımlanan mikroorganizmaların yaklaşık % 99'unu Bacteria üyelerinin temsil ettiği belirlenmiştir. NAR9 örneğinde 19 filum tespit edilmiştir. Proteobacteria (% 60) en baskın filum olarak bulunmuş onu sırasıyla Firmicutes (% 9,6), Acidobacteria (% 7,9), Rokubacteria (% 6), Actinobacteria (% 3,8), Planctomycetes (% 3,1), Chloroflexi (% 2) ve

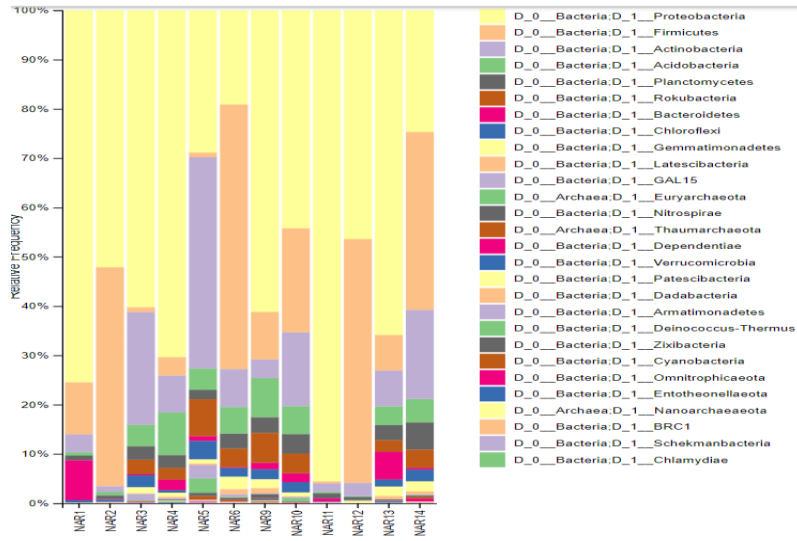
Bacteroidetes (% 1,3) izlemiştir. NAR10 örneğinde sadece Arkaea çeşitliliğinin filum düzeyinde azalması değil aynı zamanda Bacteria domaininin de 14 filuma düştüğü tespit edilmiştir. NAR9 örneğinde olduğu gibi, NAR10 örneğinde de Proteobacteria (% 44,23) ve Firmicutes (% 21,10) baskın olarak bulunmuştur. NAR10 örneğinin Firmicutes üyelerinde % 11,49, Actinobacteria üyelerinde % 11,2 artış oranı belirlenirken, Proteobacteria üyelerinde ise % 16,98 oranında azaldığı tespit edilmiştir (**Şekil 4.2**).

Hem NAR9 hem de NAR10 örneğinde baskın sınıflar Gammaproteobacteria ve Bacilli olarak gözlemlenmiştir. Gammaproteobacteria üyelerinin kamptan sonra alınan NAR10 örneğinde azaldığı, Bacilli ve Actinobacteria üyelerinin ise arttığını belirlenmiştir (**Şekil 4.3**). NAR9 örneğinde *Wb1-P19* (% 9,1) ve *Pseudomonas* (% 9,9) baskın cinsler olarak tespit edilmiştir. % 1 oranının üzerinde bulunan diğer cinsler ise *Massilia* (% 4,4), *Bacillus* (% 4,4), *Candidatus Methylohalobium* (% 3,4), *Brevibacillus* (% 2,7), *Lysobacter* (% 2), *Acinetobacter* (% 2), *Variovorax* (% 1,4), *Brevundimonas* (% 1,3), *Noviherbaspirillum* (% 1) ve *Shingomonas* (% 1)'dir. Kamptan sonra alınan NAR10 örneğinde *Acinetobacter* (% 16) en baskın cins olarak kaydedilmiştir. Bunun yanında *Acinetobacter*'in aksine *Pseudomonas* cinsinin % 3,65 oranında azaldığı tespit edilmiştir (**Şekil 4.4**).

Bu alandan alınan iki örnek incelendiğinde, bu alanın kamptan önce yüksek tür zenginliği (Chao1 index) içerdiğini gözlemlenmiştir. Ayrıca, Alpha çeşitliliğinin hem Shannon hem de Simpson indeksleri, en yüksek mikrobiyal çeşitliliğin kampın kurulmasından önce (NAR9) olduğunu göstermektedir (**Tablo 4.2**).

4.2.5. Kamp alanının uzağından alınan yüzey örnekleri (NAR11 ve NAR12)

Yüzey örnekleme yapılan bu alanda ne kamp öncesi ne de kamp sonrası yapılan örneklerde Archaea tespit edilmemiştir (**Şekil 4.1**). Tanımlanan tüm mikroorganizmalar Bacteria domainine ait bulunmuştur (**Şekil 4.1**). Kamptan önce alınan örnekte (NAR11) en baskın filum Proteobacteria (% 95) olarak belirlenmiştir. 12 filum içeren NAR11 örneğinin ikinci baskın filumu % 1,6 oranıyla Actinobacteria'dır. Kamptan sonrası alınan NAR12 örneğinde 8 filum belirlenmiştir. Bu alandaki bacteria zenginliği ve çeşitliliğinde bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

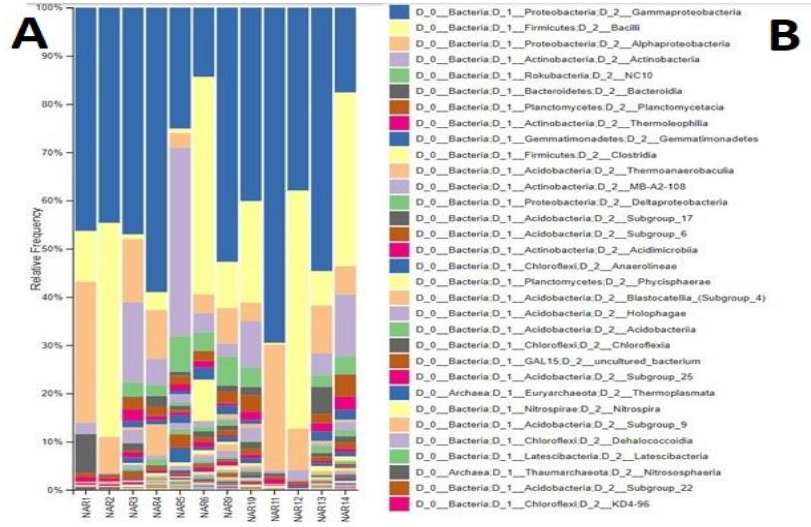


Şekil 4.2: Örneklerde bulunan Bacteria ve Archaea filumları.

Kamp sonrası alınan NAR12 örneğinde en baskın filum Firmicutes (% 49) ve Proteobacteria (% 46) olarak belirlenmiştir. Kamptan sonra alınan NAR12 örneğinde Proteobacteria üyelerindeki düşüş, Firmicutes ve Actinobacteria üyelerindeki artış kayıt altına alınmıştır (**Şekil 4.2**).

Gammaproteobacteria (% 69) ve Alphaproteobacteria (% 26) en baskın sınıflar olarak NAR11 örneğinde gözlenmiştir. Bununla birlikte, NAR12 örneğinde % 49 oranı ile Basilli sınıfı en baskın olarak belirlenirken Gammaproteobacteria (% 37,9), Alphaproteobacteria (% 8,4) ve Actinobacteria (% 2,3) gözlenen diğer sınıflardır. Kamptan sonra alınan NAR12 örneğinde Gammaproteobacteria ve Alphaproteobacteria üyelerinde bir azalma gözlenirken, Bacilli ve Actinobacteria üyelerinde artış kaydedilmiştir (**Şekil 4.3**). Kamptan önce alınan örnekte cins düzeyine % 56 oranında Proteobacteria üyesi olan *Acinetobacter* hakim olurken, bunu *Brevundimonas* (% 23), *Massilia* (% 7,7), *Wb1-P19* (% 1,5), *Enhydrobacter* (% 1,2) ve *Noviherbaspirillum* (% 1,15) takip etmiştir. Kamptan sonra, cins düzeyinde *Acinetobacter* % 28’lik oranla baskın olmaya devam etse de, bu cinsten % 28 oranında önemli bir azalma tespit edilmiştir (**Şekil 4.4**).

Alfa çeşitlilik tahminlerinin sonuçlarına göre, bu alan incelenen tüm mağara noktaları arasında en düşük tür zenginliğine ve en düşük tür çeşitliliğine sahip olduğunu göstermiştir. İki örnek karşılaştırıldığında, bunların Chao1 indeks değerleri, bu alanın kamptan önce tür açısından zengin olduğunu göstermiştir. Bununla beraber Shannon ve Simpson indeksleri kamp sonrası mikrobiyal çeşitliliğin arttığını göstermiştir (**tablo 4.2**).



Şekil 4.3: Bacteria ve Archaea sınıf çeşitliliği (A) ve en baskın bulunan sınıflar (B).

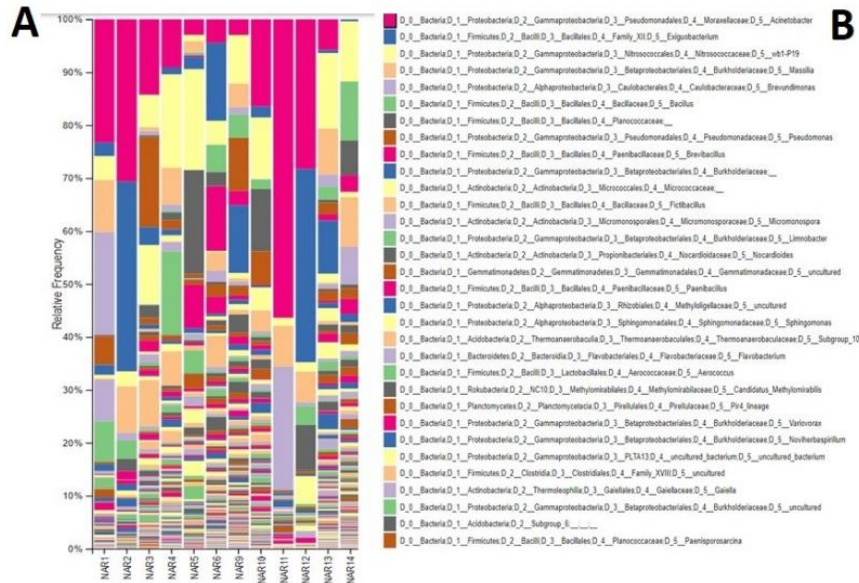
4.2.6. Kamp alanının uzağından alınan sediment örnekleri (NAR13 ve NAR14)

NAR13 örneğinde bulunan Archaea'nın tamamı Thaumarchaeota filumunun kültüre edilemeyen üyeleri olarak tanımlanmış ve % 0,02 oranında tespit edilmiştir. Kamptan sonra alınan NAR14 örneğinde ise tanımlanan Archaea'ların kültüre edilemeyen Euryarchaeota ve Thaumarchaeota filumlarına ait olduğu belirlenmiştir. Bu tespit edilen her filum ise sırasıyla Thermoplasmata Nitrososphaeria sınıfları ile temsil edilmektedir (Şekil 12). Kamptan sonra alınan NAR14 örneğinde filum sayısının artması ve Archaea üyelerinin de % 0,46 oranında arttığının bulunması nedeniyle bu alanda archaea çeşitliliği ve zenginliğinin arttığını söyleyebiliriz.

NAR13 örneğinde Proteobacteria'nın (% 66) baskın olduğu 17 farklı filum belirlenmiştir. Diğer yandan, NAR14 örneğinde 19 bacteria'nın filumu tespit edilmiş ve bu filumlardan Firmicutes (% 36), Proteobacteria (% 24) ve Actinobacteria'nın (% 18) baskın olduğu bulunmuştur. NAR13 örneğinde % 1 oranından fazla olan diğer filumlar ise Actinobacteria (% 7,3), Firmicutes (% 7,1), Bacteroidetes (% 5,6), Acidobacteria (% 3,7), Planctomycetes (% 3), Rokubacteria (% 2,3), Gemmatimonadetes (% 1,9) ve Chloroflexi (% 1,4) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1-4.2). Kamptan sonra alınan NAR14 örneğinde bulunan Proteobacteria (% 24) ve Bacteroidetes (% 0,3)'te düşüş belirlenmiştir. NAR14 örneğinde bulunan Patescibacteria (% 0,04), Omnitrophicaeota (% 0,02) ve Deinococcus-Thermus (% 0,02) filumları NAR13 örneğinde tespit edilememiştir.

NAR13 örneğinde sınıf düzeyinde Gammaproteobacteria (% 54)'nın baskın olduğu belirlenmiştir. % 1 oranından fazla olarak bulunan diğer sınıflar Alphaproteobacteria, Bacilli, Bacteroidia, Actinobacteria, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Thermoleophilia ve Deltaproteobacteria olarak tespit edilmiştir. NAR14 örneğinde ise Bacilli (% 36) sınıfının baskın olduğunu ve örnekte bulunan diğer sınıfların ise Actinobacteria, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria ve Planctomycetes olduğunu belirlenmiştir. Firmicutes ve Actinobacteria üyelerinde sırası % 28.8 ve % 10,81 oranlarında artış gözlemlenirken Proteobacteria üyelerinde % 41,19 oranında bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Bu örnekleme alanında NAR13 örneğinde *Wb1-P19*, NAR14 örneğinde ise *Wb1-P19* ve *Bacillus* cinslerinin baskın olduğu belirlenmiştir. *Massilia*, *Acinetobacter*, *Terimonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas*, *Pseudomonas*, *Lysobacter*, *Variovorax*, *Paenisporsarsaina*, *Brevibacillus* ve *Candidatus Methylomirabilis* üyeleri NAR13 örneğinde % 1 oranından fazla bulunmaktadır. NAR14 örneğinde belirlenen cins çeşitliliğine rağmen, en fazla tanımlanan cinslerin % 1 oranının altında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

Chao1 indeksine göre örnek NAR14'te (kamp sonrası) yüksek tür zenginliği gözlemlenmiştir. Ayrıca alpha çeşitliliğinin Shannon ve Simpson istatistik değerleri dikkate alındığında en yüksek mikrobiyal çeşitlilik de aynı örnekte de gözlemlenmiştir. Bu alanda kamp sonrası hem mikrobiyal biyokütlenin hem de çeşitliliğinin arttığı gösterilmiştir (Tablo 4.2).



Şekil 4.4: Örneklerde tespit edilen cins çeşitliliği (A) ve en baskın bulunan cinsler (B)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada mağaracıların mağarada gerçekleştirdiği aktiviteler ile mağaraların mikrobiyal çeşitliliği (Bacteria ve Archaea) üzerine nasıl etkileri olduğu değerlendirilmiştir. Kendilerine uygun bir ortamda bulunan ve yaşamlarını sürdüren canlı organizmalar sıcaklık, karbondioksit, besin, nem gibi ekolojik faktörlerinin değişmesinden etkilenirler. Bu değişim mikrobiyolojik düzeyde çok daha etkilidir hatta mikrobiyal toplulukların değişimine de neden olabilir. İnsanların mikrobiyal çeşitlilik üzerindeki etkisinin de aslında onların bu ekolojik faktörlerde neden olduğu değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. İnsanlar bu kapalı ekosistemlerin karbondioksit oranını, keşif sürecinde nefes alarak veya ısınmak için ateş yakarak arttırabilir. Ayrıca, insan, mağara keşfi sırasında mağaraya dış ortamdan mikroorganizmalar taşıyabilir. Bunun yanında çeşitli organik maddeleri, giysi / ayakkabı, saç teli, çamaşır tiftiği, yiyecekler veya dışkı ile mağara ekosistemine taşıyarak mağaradaki organik madde miktarını arttırabilir.

5.1. MORCA MAĞARASI'NIN -1040 M DERİNLİĞİNDEKİ MİKROBİYAL ÇEŞİTLİLİĞİ

Bu çalışma, Morca Mağarası'nın ilk mikrobiyolojik çalışmasıdır ve mağaranın ilk kez girilen yeni keşfedilmiş bir bölümünde yapılmıştır. Çalışmamız mağaracıların mikrobiyal çeşitlilik üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaçlasa da, aynı zamanda Morca Mağara'sının -1040 metre derinliğinde bulunan Bacteria ve Archaea çeşitliliğine de ışık tutmaktadır. Kamp kurulumundan önce alınan NAR1, NAR3, NAR5, NAR9, NAR11 ve NAR13 örneklerinde belirlenen Bacteria ve Archaea toplulukları, Morca Mağara'sının -1040 metredeki yerli mikroorganizmaları olarak kabul edilebilir. Alınan örneklerde hem Bacteria hem de Archaea toplulukları tespit edilmiştir ve Archaea'nın Bacteria'dan daha az olduğu belirlenmiştir.

5.1.1. Archaea

Bacteria topluluğuna kıyasla Archaea'nın az olması diğer mağara çalışmalarında da gözlenmiştir. New Mexico'daki Fort Stanton Mağarası'nda yapılan bir çalışmada, mikrobiyal topluluğun % 88'ini Bacteria, % 8,5'ini ise Archaea topluluklarının oluşturduğu tespit edilmiştir (Kimble ve diğ., 2018). Çalışmamızda yüksek orandan düşük orana göre sırayla Thaumarchaeota, Euryarchaeota ve Nanoarchaeaeota filumları tespit edilmiş, ayrıca her bir Archaea filumunun tek sınıfla temsil edildiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada tanımlanan tek cins Thaumarchaeota filumuna ait Nitrososphaeraceae familyasından *Candidatus Nitrososphaera* olarak kayıtlara girmiştir. Bu Archaea cinsi amonyum oksitleyici rolüyle bilinmektedir (Kimble ve diğ., 2018; Marques ve diğ., 2018; Başkaran ve diğ., 2020). Rui ve diğ. (2017), mağara ekosistemi gibi oligotrofik bir ortamda, *Candidatus Nitrososphaera*'nın, aynı ortamdaki diğer mikrobiyal topluluklara azot sağlayan başlıca kemolitotroflardan biri olduğunu bildirmiştir. Ayrıca çalışmalarında alkali mağara çökeltilerindeki amonyak oksitleyen topluluklardan amonyak oksitleyen Archaea'ların baskın olduğunu göstermişlerdir. Thaumarchaeota üyelerinin farklı mağara nişlerinde bulundukları çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Tomczyk-Zak ve Zielenkiewicz, 2016). Bu filum üyelerinin amonyum oksitlenme reaksiyonunda önemli bir rol oynadıkları dolayısıyla da mağara ekosistemlerinde nitrojen ve karbon döngüsüne katıldıkları tespit edilmiştir (Zhao ve diğ., 2017; Anda ve diğ., 2017).

5.1.2. Bacteria

Morca Mağarası örnekleme bölgesi toplam 20 farklı filum içermektedir. Bu bölgenin Bacteria topluluğu bakımından fakir olduğunu söyleyemeyiz. Bu çalışmada en çok tanımlanan Bacteria filumlarının, tüm örneklerde farklı oranlarda gözlenen Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes ve Acidobacteria olduğu tespit edilmiştir. Bu filumlar çok çeşitli mağara ortamlarında hem yaygın hem de baskın olarak gösterilmiştir (Tomczyk-Zak ve Zielenkiewicz, 2016 ve Çandiroğlu ve D. Güngör, 2020). Proteobacteria üyeleri bu oligotrofik mağara ekosistemlerinde bulunan çok sayıda organik materyali parçalayabildiği için kemoototrofik rolleriyle öne çıkmaktadır (Barton ve diğ., 2007; Tomczyk-Zak ve Zielenkiewicz, 2016).

Proteobacteria'nın üyeleri, Actinobacteria üyelerinin baskın olduğu NAR5 örneği dışında, çalışmamızın tüm örneklerinde (sediment ve yüzey) baskın olarak tespit edilmiştir. *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Wb1-P19*, *Brevundimonas* ve *Massilia* bu örneklerde en baskın belirlenen cinsler olmuşlardır. Bu cinsler çok sayıda karstik mağaralardan da çeşitli araştırmacılar tarafından izole edilmiştir (Barton ve diğ., 2007 ve Li ve diğ., 2004). *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türlerinin, kalsiyum karbonatı çökeltme kabiliyetine sahip olması nedeniyle mağara ve speleothem oluşumlarına katkı sağladığı düşünülmektedir (Lia ve diğ., 2019 ve Tomczyk-Zak ve Zielenkiewicz, 2016). Öte yandan, *Massilia* türleri çok sayıda karbonhidrat ve diğer organik bileşikler karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. Bu

reaksiyonlar, mağara oluşum süreçleri sırasında karstik kayaların çözünmesinde etkili olduğu düşünülen asitlerin üretilmesine neden olmaktadır (Barton ve diğ., 2007; Dworkin, 1998).

Actinobacteria karstik mağaraların sediment ve yüzeylerinden izole edilen ve en çok çalışılan mağara bakteri toplulukları arasında yer alır (Tomczyk-Zak ve Zielenkiewicz, 2016). Bu filum, antimikrobiyal maddeler, endüstriyel enzimler ve diğer biyoaktif bileşikler üretebilme kabiliyetine sahip üyeleri içerir. Ayrıca iyi kalsit çökeltme özellikleri ve pigment üretmeleri nedeniyle de önemli bir yere sahiptir (Cuezva ve diğ., 2012; Ghosha ve diğ., 2017). Çalışmamızda Actinobacteria'nın en baskın cinsi *Nocardioide*s olarak kaydedilmiştir. Bu cinsin türleri, örneğin *N. allogilvus* sp. nov., *N. cavernae* sp. nov. ve *N. speluncae* sp. nov farklı karstik mağaralardan izole edilmiştir (Zhang ve diğ., 2018; Han ve diğ., 2017; Fang ve diğ., 2019). Bu cinsin üyeleri ayrıca toksik biyo-bileşikler parçalayan bakteriler olarak da tanımlanmaktadır (Yoon ve diğ., 1999).

5.2. BACTERIA VE ARCHAEA ÇEŞİTLİLİĞİ ÜZERİNDEKİ İNSAN ETKİLERİ

Bu yeraltı ekosistemlerindeki mikrobiyal çeşitliliğinin azalmasının antropojenik etkilerden kaynaklandığı belirtilmektedir (Ikner ve diğ., 2007). Çalışmamızın sonuçları kamp sonrası tuvalet 2 alanından (NAR10) ve kamp alanından (NAR2 yüzey örneği) alınan örneklerdeki mikrobiyal çeşitliliğin, kamp kurulumundan önce alınan sırasıyla NAR9 ve NAR1 örneklerine göre azaldığına işaret etmektedir. Kamp alanındaki mikrobiyal çeşitlilik azalmasının, incelenen diğer alanlara kıyasla bu alanda gözlemlenen yüksek insan aktivitelerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

NAR6 örneği, kamptan önce aynı bölgeden alınan NAR5 örneği ile karşılaştırıldığında NAR6 örneğinin NAR5 örneğine göre düşük bir Archaea çeşitliliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kamp alanından kamp öncesi alınan örnekte (NAR3) Archaea bulunurken aynı noktadan kamp sonrası alınan NAR4 örneğinde ise hiç Archaea tespit edilememiştir. Alonso ve diğ. (2019), Lascaux Mağarası'nın mikrobiyal çeşitliliğini insan etkisinin olduğu turistik mağaralar ve sadece keşif için insanın girdiği 2 mağarayı referans alarak değerlendirdiklerinde bizim sonuçlarımıza benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Araştırmacılar, Lascaux Mağarası'nda, insan etkisinin olduğu referans mağarasına göre daha düşük bir Archaea çeşitliliği bulmuşlardır. Mağaracıların faaliyetlerinin sınırlı olduğu düşünülen noktalarda ise mikrobiyal çeşitlilik azalması görülmediğini belirtmişlerdir (Alonso ve diğ., 2019). İnsanların soluk alıp vermesinin,

bu tür ekosistemlerdeki göreceli karbondioksit miktarını artırarak mağara ortamının atmosfer sistemini etkilediği bulunmuştur (Kurniwan ve diğ., 2017). Atmosferdeki inorganik karbonun daha fazla olması, çevrede bulunan kemoototrof mikroorganizmaların azalmasına ya da yok olmasına neden olabilir veya enerji eldesi için organik bileşiklerin parçalanmasından oluşan metabolik aktivitelerini azaltabilir (Barton ve Jurado, 2007).

Ayrıca mağaracılar ile mağaraya giren organik maddeler oligotrofik ortamdaki karbon miktarını artırır. Ortama giren fazla organik maddeler geri dönüştürülemeyebilir ve bu durum Proteobacteria gibi Gram negatif bakterilerin yok olmasına Firmicutes gibi Gram pozitif bakterilerin ise artışına neden olabilir (Kukla ve diğ., 2018).

Çalışmamızda, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerin arttığı kamp alanı (sediment örneği) dışında, kamptan sonra alınan tüm örneklerde, Firmicutes üyelerinde bir artışa karşı Proteobacteria üyelerinde bir azalma olduğu ortaya konmuştur. Kartchner Mağarası'nda da turistlerin düşük ve orta düzeyde etkilediği mağara alanlarında yüksek oranda Firmicutes üyeleri tespit edilmiştir (Ikner ve diğ., 2007). Firmicutes üyelerinin insan etkilerinin düşük veya orta dereceli olduğu bölgelerde neden yüksek oranda bulunduğu henüz belirlenememiştir, ancak insan etkisinin orta düzeyde olduğu turistik Yarasa Mağarası'ndan alınan örneklerin metagenomik analizlerine göre de Firmicutes üyelerinin baskınlığı ortaya konmuştur (Urzi ve diğ., 2010 ve Tomczyk-Zak ve Zielenkiewicz, 2016)

Protobacteria üyelerinin azalması mağara ekosistemindeki besin zincirini etkileyebilir. Çünkü, daha önceki çalışmada gösterildiği gibi, Proteobacteria üyeleri genellikle mağara ekosistemlerinin birincil üreticileridir (Tomczyk-Zak ve Zielenkiewicz, 2016). Mağarada bulunan organik bileşikleri parçalayarak enerji kazanırlar ve diğer mikroorganizmalara inorganik karbon ve azot sağlarlar. Kamptan önce alınan tüm örneklerdeki Protobacteria üyelerinin bulunma oranları, Morca Mağarası'nın bu bölümünde yaşam kaynağı olarak önemli bir konumda olduklarına işaret etmektedir.

Öte yandan Ikner ve diğ. (2007), Kartchner Mağarası'nın insan aktivitelerinden yüksek düzeyde etkilenen bölgelerindeki Proteobacteria yoğunluğunun, mağaraların en çok ziyaret edilen bölgelerindeki organik madde girdisi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu, çalışmamızda en aktif çalışma alanındaki iplik, saç gibi organik madde girdisinin yüksek olması nedeniyle, kamp alanında (sediment örnekleri) gözlemlenen Proteobacteria üyelerinin artışı ile açıkça

görülebilir. Ayrıca Ikner ve diğ. (2007) tarafından incelenen mağaraların insan etkisinin yüksek olduğu alanlarında *Bacteroidetes* üyeleri de izole edilmiştir.

Çalışmamızda, kamp sahasından alınan sediment örneklerinin yapılan metagenomik analizi sonucunda *Bacteroidetes* üyelerinde kamp sonrası % 1,89 oranında artış görülürken, diğer bölgelerde bu filum üyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Tuvalet 2 alanında ise *Bacteroidetes* üyelerinde artış görülmüş ancak istatistiksel analizlere göre bu artış anlamlı bulunmamıştır.

Lavoie ve Northup (2006), *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* gibi insan mikrobiyota üyeleri ile termotolerant *Bacillus sp.*'nin mağaradaki insan etkilerinin göstergeleri olduğunu bildirmiştir. Bu türler özellikle turizme açılan ve insanların girdiği diğer mağaralarda da gözlemlenmekte ve mağara ortamlarının mikrobiyal topluluğu üzerindeki insan etkisinin derecesini belirlemektedir (Leuko ve diğ., 2017). Ayrıca *Propionibacterium* gibi insanla ilişkili diğer bakterilerin de mağaralardaki insanların kural ihlallerinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Alonso ve diğ., 2019).

Çalışmamızda kamp sonrası tuvalet alanları olarak belirlenen bölgelerden alınan örneklerde fazla oranlarda insan göstergesi olan mikroorganizmalar bulacağımızı tahmin etmiştik. Ancak, bu göstergelerin hiçbiri kamp sonrası alınan örneklerde tespit edilememiştir. Bunun nedeni, mağaracıların tuvalet olarak kullanılan alanları kurallara uygun kullanmalarında düşünülmektedir. Çünkü dışkıları mağaracılar tarafından bu alanlara doğrudan bırakılmamış, poşet veya başka malzemeler kullanılarak biriktirilmiş ve sonunda mağaradan dışarı çıkarılmıştır.

İnsan göstergelerin ortaya çıkmamasının bir başka nedeni de, bu mikroorganizmaların Morca Mağara'sının ekstrem çevre koşullarına uyumsuzluğu ve kısa bir süre sonra ölümleri olabilir. Ayrıca mağaranın daha az kontamine olmuş bölümlerinde, mağaranın doğal mikroorganizmalarının antimikrobiyal bileşikler veya enzimler gibi farklı biyoaktif maddeler salgılayarak bu mikroorganizmaları ortadan kaldırdığı ve mağaranın kendi kendine biyoremediasyonunu gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir (Jhonston ve diğ., 2012).

Mağaracıların kamp alanı olarak belirledikleri bölgeye ilk kez girip orada kamp yapmaları ve orada geçirdikleri sürenin Morca Mağarası'nın kendi kendine biyoremediasyonu için ideal olduğunu düşünmekteyiz.

5.3. MAĞARALARIN KORUNMASI

İnsan araştırmaları olmadan doğanın gizlerini ortaya çıkarmamız mümkün değildir. Ancak bunu yaparken de doğanın en az şekilde etkilenmesini sağlamalı ve bunun için çaba göstermeliyiz. Bununla beraber yine de doğanın kaynaklarından yararlanabilmek için incelenmesi gereken alanlar insan etkisi altında kalmadan incelenmelidir. Mağaraların korunması, endüstriyel ve biyoteknolojik doğal kaynakların sürekliliği için mağara kullanımları bir protokol oluşturularak detaylandırılmalıdır. Bazı ülkeler mağara dernekleri aracılığıyla, bu tür ortamların korunması için gerekli yasaları ve koşulları zaten oluşturmuşlardır. Mağaraların mikrobiyal çeşitliliğinin korunması için şunlar önerilebilir

- Mağaralara giren mağaracı sayısı ve mağarada geçirilecek süre sınırlandırılmalıdır.
- Mağaraların bağlı olduğu kurumlar, mağaraların içindeki yapay iyileştirmelerden kaçınmalıdır.
- Mağaraların ve mağara mikrobiyal çeşitliliğinin önemi eğitimler ve konferanslar aracılığıyla insanlara anlatılmalıdır.
- Mağaraların bağlı olduğu kurumlar, mağaracılar ve bilim insanları (özellikle mikrobiyologlar) arasında işbirliği kurulmalıdır.
- Mağaracılar veya mağaraya girenler mağara içinde hiç atık bırakmamaya özen göstermelidir. Atıklar torbalara konulmalı ve mağaradan çıkarılmalıdır.
- Mağaracılar ya da bilimsel gruplar tarafından mağara içinde kurulan kamplar olabildiğince küçük alana yayılmalı ve araştırma için kullanılan yeni teknikler mümkün olduğunca mağaralarda geçirilecek zamanı kısaltılacak şekilde geliştirilmelidir.
- Mağaracılar, özellikle bir mağaradan diğerine geçerken mağara giysilerini ve botlarını değiştirmeli veya yıkamalıdır.
- Mağara içindeki her dokunuş veya yürüme adımının görünmeyen mağara mikrobiyal yapısının bozulmasına neden olduğu unutmamalıdır.
- Mağara içinde ısınmak veya sigara için ateş kullanılması CO₂ artışı, organik madde girişi ve toksik madde girişinin kaynağı olduğu için yasaklanmalıdır.
- Bugüne kadar çok az sayıdaki mağara mikrobiyolojisi çalışmaları yapılmış olduğundan mağaralardaki mikrobiyoloji çalışmaları teşvik edilmelidir. Bunun için mağara derneklerinin çoğalması, farklı ülkelerdeki derneklerin işbirliği yapması gerekmektedir.

5.4. SONUÇ

Mağaralar, sınırlı besin, yüksek nem, düşük fakat sabit sıcaklık ve derinlik arttıkça azalan atmosferik oksijen gibi ekstrem koşullar nedeniyle ekstrem ekosistemler olarak kabul edilir. Bu ekstrem koşullara rağmen, ekstrem mikroorganizmalar için böyle bir ekosistemde yaşam imkânsız değildir. Bu tür mikroorganizmaların ekstrem koşullara adaptasyonu oldukça ilgi çekicidir ve biyolojik evrimi aydınlatmak için bu konuda yapılan çalışmalar oldukça önemlidir. Yapılan mikrobiyal çalışmalar, bu ekosistemlerin oluşumunda ve evriminde tanımlanan bazı mikroorganizmaların önemli rollerini, bunun yanında günümüzde biyoteknoloji ve endüstriyel kullanımlarda bu mikroorganizmaların potansiyellerini göstermiştir.

Bu nedenlerle bu doğal ekosistemlerin ve biyoçeşitliliğin korunması hayati bir önem taşımaktadır. Bu çalışmada, mağara keşfi sırasında mağaracıların mikrobiyal çeşitlilik üzerindeki olası etkileri, kamp alanının farklı noktalarından kamp kurulumu öncesi ve kamp sonrası alınan örnekler analiz edilerek incelenmiştir. Kamp yapıldıktan sonra alınan örneklerde insan indikatör mikroorganizmaları (Bacteria ya da Archaea) tespit edilmemiştir. Ancak, mağaracılık faaliyetlerinin olumsuz etkileri tuvalet alanlarında ve kamp alanlarında biyoçeşitliliğin azalması, Firmicutes üyeleri dahil olmak üzere Gram-pozitif bakterilerde önemli artış ve kamp alanı toprak örneğinde gözlenen Bacteroidetes filum üyelerinin artışı ile ortaya konmuştur.

Shannon indeksine göre, mağara faaliyetlerinin olduğu her örnekleme noktasında biyoçeşitliliğin azaldığı belirlenmiştir. Morca Mağarası'nda kurulan kamp dört gün sürmüştür. Elde edilen sonuçlar, insan göstergesi mikroorganizmaların tanımlanmaması nedeniyle yüksek derecede insan etkisi olmadığını, ancak özellikle kamp alanları ve tuvalet alanlarında mikrobiyal çeşitliliğin azalması, mağaracıların neden olduğu düşük bir etkiye işaret etmektedir. Mağaracıların mağara ekosistemine zarar vermeden içeride ne kadar süre kamp yapmaları gerektiğini belirlemek için hem farklı zaman dilimlerini kapsayan kamp süreleri hem de kamp sonrası farklı dönemlerde (aylar ve yıllar sonra) alınan örneklerin incelenerek daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Bu ileri çalışmalar, genel olarak mağara ekosistemlerinin ve özellikle mağara mikrobiyal çeşitliliğinin korunmasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

- Adam, D., Maciejewska, M., Naômé, A., Martinet, L., Coppieters, W., Karim, L., Baurain, D. and Rigali, S., 2018, Isolation, characterization, and antibacterial activity of hard-to-culture actinobacteria from cave moonmilk deposits, *Antibiotic*, 7(28), 1-20.
- Adetutu, E.M., Thorpe, K., Shahsavari, E., Bourne S., Cao X., Fard R.M.N, Kirby G. and Ball A.S., 2012, Bacterial community survey of sediments at Naracoorte Caves, Australia, *International Journal of Speleology*, 41(2), 137-147.
- Akca, H., Sayılı, M. and Cafri, R., 2016, Analysing expenditure of same-day visitors in cave tourism: the case of Turkey, *Tourism Economics*, 22 (1), 47–55.
- Alonso, L., Pommier, T., Kaufmann, B., Dubost, A., Chapulliot, D., Doré, J., Douady, C.J. and Moënné-Locco, Y., 2019, Anthropization level of Lascaux Cave microbiome shown by regional-scale comparisons of pristine and anthropized caves, *Molecular Ecology*, 28, 3383-3394.
- Anda, D., Krett, G., Makk, J., Márialigeti, K., Mádl-Szőnyi, J. and Borsodi, A.K., 2017, Comparison of bacterial and archaeal communities from different habitats of the hypogenic Molnár János Cave of the Buda Thermal Karst System (Hungary), *Journal of Cave and Karst Studies*, 79(2), 113-121.
- Anger, E., R., Northup, D.E., Reysenbach, A.L., Peek, A.S., Goebel, B.M. and Pace, N.R., 1998, Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky, *American Mineralogist*, 83, 1583-1592.
- Axenov-Gribanov, D.V., Voytsekhovskaya, I.V., Tokovenko, B.T., Protasov, E.S., Gamaïunov, S.V., Rebets, Y.V., Andriy, N.L. and Maxim, A.T., 2016, Actinobacteria isolated from an underground lake and moonmilk speleothem from the Biggest Conglomeratic Karstic Cave in Siberia as sources of novel biologically active compounds, *PLoS ONE* 11(3), e0152957.
- Banerjee, S., Jha, D.K. and Joshi, S.R., 2019, Cave Microbiome for Human Welfare, *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*, 1-29.
- Barton, H. A., and Jurado, V., 2007, What's up down there? Microbial diversity in caves, *American Society for Microbiology*, *Microbe*(2), 132-138.
- Barton, H.A., 2006, Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist, *Journal of Cave and Karst Studies*, 68(2), 43–54.
- Barton, H.A., Taylor, N.M., Kreate, M.P., Springer, A.C., Oehrle, S.A. and Bertog, L., 2007, The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments, *International Journal of Speleology*, 36(2), 93-104.
- Baskaran, V., Patil, P.K., M. Antony, L., Avunje, S., Nagaraju, V.T., Ghate, S.D., Nathamuni, S., Dineshkumar, N., Alavandi, V.S. and Vijayan, K.K., 2020, Microbial community

profiling of ammonia and nitrite oxidizing bacterial enrichments from brackishwater ecosystems for mitigating nitrogen species, *Scientific Reports*, 10:5201.

- Bendia, A.G., Calleo, F., Araújo, M.N., Sanchez, E., Teixeira, V.C., Vasconcelos, A., Battilani, G., Pellizari, V.H., Rodrigues, F. and Galante, D., 2020, Metagenome-assembled genomes from Monte Cristo Cave (Diamantina, Brazil) reveal prokaryotic lineages as functional models for life on Mars, *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.02.185041>.
- Beolchini, F., Fonti, V., Özdemiroğlu, S., Akcil, A. and Dell'Anno, A., 2017, Sulphur-oxidising bacteria isolated from deep caves improve the removal of arsenic from contaminated harbour sediments, *Chemistry and Ecology*, 33, 2, 103-113.
- Bukelskis, D., Dabkeviciene, D., Lukoseviciute, L., Bucelis, A., Kriau, I., Lebedeva, J. and Kuisiene, N., 2019, Screening and transcriptional analysis of polyketide synthases and non-ribosomal peptide synthetases in bacterial strains from krubera–voronja cave, *Frontier of Microbiology*, 10, 2149.
- Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L. and Takai, K., 2006, The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats, *Nature Publishing Group*, 4, 458.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelly, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, sequencing data, *Nature Methods*, 7, 333-336.
- Carmichael, M.J., Carmichael, S.K., Santelli, C.M., Strom, A. and Bräuer S.L., 2013, Mn (II)-oxidizing bacteria are abundant and environmentally relevant members of ferromanganese deposits in caves of the upper Tennessee River Basin, *Geomicrobiology Journal*, 30, 779-800.
- Chelius, M.K. and Moore J.C., 2004, Molecular phylogenetic analysis of Archaea and Bacteria in Wind Cave, South Dakota, *Geomicrobiology Journal*, 21(2), 123-134.
- Chelius, M.K., Bresford, G., Horton, H., Quirk, M., Selby, G., Simpson, R.T., Horrocks, R. And Moore, J.C., 2009, Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind Cave, South Dakota, USA, *International Journal of Speleology*, 38(1), 1-10.
- Chen, Y., Wu, L., Boden, R., Hillebrand, A., Kumaresan, D., Moussard, H., Baciú, M., Lu, Y., and Murrell, J.C., 2009, Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave, *The ISME Journal*, 3, 1093-1104.
- Clemmer, G.S., 2019, *Cave in the Encyclopedia of caves*, 3rd ed., White, Culver, and Pipan, Elsevier, ISBN 978-0-12-814124-3.
- Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Porca, E., Pasčić, L., Jurado, V., Hernandez-Marine, M., Serrano-Ortiz, P., Canaveras, J.C., Sanchez-Moral, S. and Saiz-Jimenez, C., 2012, The

- biogeochemical role of Actinobacteria in Altamira Cave, Spain, *FEMS Microbiology Ecology*, 81, 281–290.
- Culver, D.C. and Pipan, T., 2009, *The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats*, Oxford, ISBN 978-0-19-921992-6.
- Curl R.L., 1966, Caves as a measure of karst, *Journal of Geology*, 74, 798–830.
- Çandiroğlu, B. and Doğruöz-Güngör, N., 2020, The Biotechnological potentials of Bacteria isolated from Parsik Cave, Turkey, *Johnson Matthey Technology Review*, 64(4), 466-479.
- DeBoer, M., 2015, Understanding the heat map, Cartographic perspectives, 80, 39-43.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Keller, K., Brodie, E.L., Larsen, N., Piceno, Y.M., Phan, R. and Andersen, G.L., 2006, Nast, a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16s rRNA genes, *Nucleic Acids Research*, 34, 394-399.
- Doğruöz-Güngör, N., Çandiroğlu, B. and Altuğ, G., 2020, Enzyme profiles and antimicrobial activities of bacteria isolated from the Kadiini Cave, Alanya, Turkey, *Journal of Cave and Karst Studies*, 82(2), 106-115.
- Dowrkin M., 1998, *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*, New York: Springer-Verlag, 3rd ed., https://books.google.com.tr/books/about/The_Prokaryotes.html?id=HOvgjwEACAAJ&redir_esc=y
- Dreybrodt, W., 2019, Speleothem deposition, in *the Encyclopedia of Caves*, 3.ed., White, Culver, and Pipan, Elsevier, ISBN 978-0-12-814124-3.
- Dziuda, D.M., 2010, Data mining for genomics and proteomics: analysis of gene and protein expression data, *Hoboken, NJ: Wiley*, doi: 10.1002/9780470593417.
- Edgar, C., 2010, Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- Engel, A.S., 2010, Microbial diversity of cave ecosystems, in *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*, Barton, Mandl and Loy, Springer, Dordrecht, ISBN: 978-90-481-9204-5.
- Engel, A.S., Meisinger, D.B., Porter, M.L., Payn, R.A., Schmid, M., Stern, L.A., Schleifer, K.H. and Lee, N.M., 2010, Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiraling in microbial mats from Lower Kane Cave (USA), *The ISME journal*, 4, 98-110.
- Fang, B.Z., Han, M.X., Jiao, J.Y., Zhang, X.T., Xie, Y.G., Hozzein, W.N., Alkhalifah, D.H.M., Xiao, M. and Li, W.J., 2019, *Nocardioides speluncae* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a karstic subterranean environment sample, *Antonie van Leeuwenhoek*, 112, 857–865.
- Fiedler, H.P., 2010, A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. Michael Goodfellow, *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 119-142.

- Gan, M.H., Wengert, P., Barton, H.A., Hudson, A.O. and Savka, M.A., 2020, Insight into the resistome and quorum sensing system of a divergent *Acinetobacter pittii* isolate from an untouched site of the Lechuguilla Cave, *Access Microbiology*, 2.
- Ghosh, S., Kuisienseb, N. and Cheepthama, N., 2017, Review The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream?, *Biochemical Pharmacology*, 134, 18-34.
- Gillieson, D., 1996, Caves: Processes, Development and Management, Blackwell, ISBN 0-631-17819-8.
- Goodfellow, M. and Fiedler, H.P., 2010, A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics, *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 119-142.
- Groth, I., Vettermann, R., Schumann, P. and Saiz-Jimenez, C., 1999, Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo), *Journal of Microbiological Methods*, 36, 115-122.
- Han, M.X., Fang, B.Z., Tian, Y., Zhang, W.Q., Jiao, J.Y., Liu, L., Zhang, Z.T., Xiao, M., Wei, D.Q. and Li, W.J., 2017, *Nocardioides cavernae* sp. nov., an actinobacterium isolated from a karst cave, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 633-639.
- Hathaway, J.J.M., Garcia, M. G., Balasch, M.M., Splide, M.N., Stone, F.D., Dapkevicius, M.D.L.N.E., Amorim, I.R., Gabriel, R., Borges, P.A.V., Northup, D.E., 2014, Comparison of bacterial diversity in Azorean and Hawai'ian Lava Cave microbial mats, *Geomicrobiology Journal*, (31)3, 205-220.
- <http://aspeg.org.tr/>
- https://drive5.com/usearch/manual/alpha_metrics
- https://drive5.com/usearch/manual/beta_metrics.html
- <https://www.showcaves.com/english/explain/Speleothem/Moonmilk.html>
- Ikner, L. A., Toomey, R. S., Nolan, G., Neilson, J. W., Pryor, B. M., and Maier, R. M., 2007, Culturable microbial diversity and the impact of tourism in Kartchner Caverns, Arizona, *Microbial Ecology*, 53(1), 30-42.
- Johnston, M.D., Muench, B.A., Banks, E.D. and Barton, H.A., 2012, Human urine in Lechuguilla Cave: the microbiological impact and potential for bioremediation. *Journal of Cave and Karst Studies*, 74(3)278–291.
- Jolliffe, I.T. *Principal Component Analysis*, 2002, Springer, New York.
- Jones, A.A. and Bennett, P. C., 2014, Mineral microniches control the diversity of subsurface microbial populations, *Geomicrobiology Journal*, 31, 246-261.

- Kalyuzhnaya, M. G., Lidstrom, M. E. and Chistoserdova, L., 2008, Real-time detection of actively metabolizing microbes by redox sensing as applied to methyloph populations in Lake Washington, *The ISME journal*, 2, 696-706.
- Kambesis, P., 2007, The importance of cave exploration to scientific research, *Journal of Cave and Karst Studies*, 69(1), 46–58.
- Kendall, A.C., and Broughton, P., 1978, Origin of fabrics in speleothems composed of columnar calcite crystals, *Journal Of Sedimentary Petrology*, 48(2), 519-538.
- Kieraite-Aleksandrova, I., Aleksandrovas, V. and Kušienė, N., 2015, Down into the Earth: microbial diversity of the deepest cave of the world, *Biologia*, 70, 989-1002.
- Kiew. R., 2014, Checklist of vascular plants from Batu Caves, Selangor, Malaysia, *Check List*, 10(6), 1420-1429.
- Kimble, J.C., Winter, A.S., Splide, M.N., Sinsabaugh, R.L. and Northup, D.E., 2018, A potential central role of Thaumarchaeota in N-Cycling in a semi-arid environment, Fort Stanton Cave, Snowy River passage, New Mexico, USA. *FEMS Microbiology Ecology*, 94, fyy173.
- Klusaite, A., Vickackaite, V., Vaitkevičienė, B., Karnickaite, R., Bukelskis, D., Kieraite-Aleksandrova, I. and Kušienė, N., 2016, Characterization of antimicrobial activity of culturable bacteria isolated from Kruber-Voronja Cave. *International Journal of Speleology*, 45(3), 275-287.
- Kováčsová, S., Javorková, S., Majerčíková, K. and Medo, J., 2013, Screening of antimicrobial activity and genes coding polyketide synthetase and nonribosomal peptide synthetase of actinomycete isolates, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(3), 255-258.
- Kurniawan, I.D., Rahmadi, C., Ardi, T.E., Nasrullah, R., Willyanto, M.I. and Rahayu, S., 2017, The detection of human Activities' impact on show caves environment in Pacitan, Indonesia, in *Proceedings of the 17th International Congress of Speleology*, Sydney, NSW, Australia, 22-28.
- Lavoie, K.H., and Northup, D.E., 2006, Bacteria as indicators of human impact in caves, in *Proceeding of the 17th National Cave and Karst Management Symposium*, 40- 46.
- Lavoie, K.H., Winter, A.S., Read, K.J.H., Hughes, E.M., Splide, M.N. and Northup, D.E., 2017, Comparison of bacterial communities from lava cave microbial mats to overlying surface soils from Lava Beds National Monument, USA, *PloS one*, 12(2), e0169339.
- Leucci, G., and Giorgi, D.L., 2005, Integrated geophysical surveys to assess the structural conditions of a karstic cave of archaeological importance, *Natural Hazards and Earth System Sciences*, 5, 17-22.
- Leuko, S., Koskinen, K., Sanna, L., D'Angeli, I.M., Wael, D.J., Marcia, P. and Rettberg, C.M.E.P., 2017, The influence of human exploration on the microbial community

structure and ammonia oxidizing potential of the Su Bentu limestone cave in Sardinia, Italy, *Plos One*, 12(7), e0180700.

- Li, Y., Kawamura, Y., Fujiwara, N., Naka, T., Liu, H., Huang, X., Kobayashi, K. and Ezaki, T., 2004, *Sphingomonas yabuuchiae* sp. nov. and *Brevundimonas nasdae* sp. nov., isolated from the Russian space laboratory Mir, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 819-825.
- Lukoseviciute, L., Lebedeva, J. and Kuisiene, N., 2020, Diversity of Polyketide Synthases and Nonribosomal Peptide Synthetases revealed through metagenomic analysis of a deep oligotrophic cave, *Microbial Ecology*, 81, 110-121.
- Maciejewska, M., Adam, D., Naome, A., Matinet, L., Tenconi, E., Calusinska, M., Delfosse, P., Hanikenne, M., Baurain, D., Compere, P., Carnol, M., Barton, H.A. and Rigali, Sebastien., 2017, Assessment of the potential role of *Streptomyces* in cave moonmilk formation, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1181.
- Mammola, S. and Isaia, M., 2017, Spider in caves, *proc. R. Sac. B*, 284: 20170193.
- Mammola, S., Piazza, D.S., Zotti, M., Badino, G. And Isaia, M., 2017, Human-induced alterations of the mycobiota in an Alpine show cave (Italy, SW-Alps), *Acta Carsologica*, 46(1), 112-120.
- Marques, E.D.L.S., Gross, E., Dias, J.C.T., Pirovani, C.P. and Rezende, R.P., 2018, Ammonia oxidation (*amoA*) and nitrogen fixation (*nifH*) genes along metasandstone and limestone caves of Brazil, *Geomicrobiology Journal*, 35(10), 869-878.
- Mulec, J. and Oarga, A., 2014, Ecological evaluation of air and water habitats in the Great Cavern of Santo Tomás, Cuba, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 910-917.
- Mulec, J., 2014, Human impact on underground cultural and natural heritage sites, biological parameters of monitoring and remediation actions for insensitive surfaces: case of Slovenian show caves, *Journal for Nature Conservation* 22, 132-141.
- Nakaew, N., Sungthong, R., Ortega-Calvo, J.J. and Lumyong, S., 2012, Antibiotic activity and anticancer potential of a new *Nonomuraea* sp. strain PT708 originated from Thai cave soil, *Microbes in Applied Research*, 474-480.
- Nguyen, NP., Warnow, T., Pop, M. and White, B., 2016, A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity, *npj Biofilms Microbiomes*, 2(16004).
- Northup, D.E. and Lavoie, K.H., 2001, Geomicrobiology of Caves: A Review, *Geomicrobiology Journal*, 18(3), 199-222.
- Northup, D.E., Barns, S.M., Yu, L.E., Spilde, M.N., Schelble, R.T., Dano, K.E., Laura, J.C., Connolly, C.A., Boston, P.J., Natvig, D.O. and Dahm, C.N., 2003, Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves, *Environmental Microbiology*, 5(11), 1071-1086.

- Northup, D.E., Melim, L.A., Splide, M.N., Hathaway, M.G., Gracia, M.N., Moya, M., Stone, F.D., Boston, P.J., Dapkevicius, M.L.N.E. and Riquelme, C., 2011, Lava Cave microbial communities within mats and secondary mineral deposits: implications for life detection on other planets, *Astrobiology*, 11(7), 601-616.
- Omoregie, A.I., Khoshdelnezamiha, G., Senian, N., Ong, D.E.L. and Nissom, P.M., 2017, Experimental optimisation of various cultural conditions on urease activity for isolated *Sporosarcina pasteurii* strains and evaluation of their biocement potentials, *Ecological Engineering*, 109, 65-75.
- Ortiz, O. M., 2012, Kartchner Caverns: Habitat scale community diversity and function in a carbonate cave, *Phd Thesis, The University Of Arizona Graduate College*.
- Pasic, L., Kovce, B., Sket, B. and Herzog- Velikonja, B., 2010, Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia, *FEMS Microbiology Ecology*, 71, 50-60.
- Porca, E., Jurado, V., Zgur-Bertok, D., Saiz-Jimenez, C. and Pasic, L., 2012, Comparative analysis of yellow microbial communities growing on the walls of geographically distinct caves indicates a common core of microorganisms involved in their formation, *FEMS Microbiology Ecology*, 81, 255–266.
- Ramachandran, L.A., Polat, P., Mukherjee, A. and Dhama, N.K., 2020. Understanding and creating biocementing beachrocks via biostimulation of indigenous microbial communities, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 3655–3673.
- Rasigraf, O., Kool, D. M., Jetten, M.S.M., Damsté, J.S.S. and Ettwiga, K.F., 2014, Autotrophic carbon dioxide fixation via the Calvin-Benson-Bassham Cycle by the denitrifying methanotroph “*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2451-2460.
- Rautela, R., Rawat, S., Rawat, R., Verma, P. and Bhatt, A.B., 2017, Microbial diversity of Gumki cave and their potential role in enzyme production, *Environment Conservation Journal*, 18(3) 115-122.
- Ringnér, M., 2008, What is principal component analysis?, *Nature biotechnology*, 26(3), 303-304.
- Riquelme, C., Marshall Hathaway, J.J.M., Dapkevicius, M.L.E., Miller, A.Z., Kooser, A., Northup, D.E., Jurado, V., Fernandez, O., Saiz-Jimenez, C. and Cheeptham, N., 2015, Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions, *Frontier in Microbiology*, 6, 1342.
- Rusznayak, A., Akob, D.M., Nietzsche, S., Eusterhuses, K., Totsche, K.U., Neu, T.R., Frosch, T., Popp, J., Keiner, R., Geletneky, J., Katzchmann, L., Schulze, E.D. and Küsel, K., 2011, calcite biomineralization by bacterial isolates from the recently discovered pristine karstic Herrenberg Cave, *Applied and Environmental Microbiology*, 1157-1167.

- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Pinar, G., Lubitz, W. and Rolleke, S., 2002, Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities, *FEMS Microbiology Letters*, 211, 7-11.
- Sepkoski Jr, J. J., 1988, Alpha, beta, or gamma: where does all the diversity go?, *Paleobiology*, 221-234.
- Slepecky, R.A. and Hemphill, H.E., 1992, The genus *Bacillus*—nonmedical: The Prokaryotes, 2nd ed., Springer Verlag, NY; v. III, p 1663.
- Steinbach, M., Kumar, V. and Tan, P., 2005, Cluster analysis: basic concepts and algorithms in Introduction to data mining, 1st edn. Pearson Addison Wesley.
- Tomczyk-Żak, K. and Zielenkiewicz, U., 2016, Microbial diversity in caves, *Geomicrobiology Journal*, 33(1), 20-38.
- Tomova, I., Lazarkevich, I., Tomova, A., Kambourova, M. and Vasileva-Tonkova, E., 2013, Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria, *International Journal of Speleology*, 42(1), 65-76.
- Urzi, C., Leo, D.F., Bruno, L. and Albertano, P., 2010, Microbial diversity in Paleolithic Caves: a study case on the phototrophic biofilms of the Cave of Bats (Zuheros, Spain), *Microbial Ecology*, 60(1), 116-129.
- Velikonja, B.H., Tkavc, R., Pašić, L., 2014, Diversity of cultivable bacteria involved in the formation of macroscopic microbial colonies (cave silver) on the walls of a cave in Slovenia, *International Journal of Speleology*, 43, 45-56.
- Walters, W., Hyde, E.R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., Gillbert, J.A., Jansson, J.K., Caporaso, J.G., Furhman, J.A., Apprill, A. and Knight, R., 2015, Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys, 1(1), e00009-15.
- White, W. B. and Culver. D.C., 2012, Cave, Definition of, in *the Encyclopedia of Caves*, 2.ed., White and Culver, Elsevier, ISBN: 978-0-12-383832-2.
- White, W. B. and Culver. D.C., 2019, Cave microbiome, in *the Encyclopedia of Caves*, 3.ed., White, Culver, and Pipan, Elsevier, ISBN 978-0-12-814124-3.
- Wilkinson, L. and Friendly, M., 2009, The history of the cluster heat map, *The American statistician*, 63(2), 179-184.
- Wiseschart, A., Mhuanthong, W., Thongkam, P., Tangphatsonnruang, S., Chantasingh, D. and Pootanakit, k., 2018, Bacterial diversity and phylogenetic analysis of type II Polyketide Synthase Gene from Manao-Pee Cave, Thailand, *Geomicrobiology Journal*, 35(6), 518-527.
- Wu, J.H., Chen, W.Y., Kuo, H.C. and Li, Y.M. , 2019, Redox fluctuations shape the soil microbiome in the hypoxic bioremediation of octachlorinated dibenzodioxin-and dibenzofuran-contaminated soil, *Environmental Pollution*, 248, 506-515.

- Yan, Y., Fu, D. and Shi, J., 2019, Screening and Immobilizing the Denitrifying Microbes in Sediment for Bioremediation, *Water*, 11, 614.
- Yoon, J.H., Cho, Y.G., Lee, S.T., Suzuki, K.I., Nakase, T. and Park, Y.H., 1999, *Nocardioides nitrophenolicus* sp. nov., a p-nitrophenol-degrading bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), 675-680.
- Zhang, L.Y., Ming, H., Zhao, Z.L., Ji, W.L., Salam, N., Jiao, J.Y., Fang, B.Z., Li, W.J. and Nie, G.X., 2018, *Nocardioides allogilvus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a karst cave, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 2485-24.
- Zhao, R., Wang, H., Yang, H., Yun, Y. and Barton, H.A., 2017, Ammonia-oxidizing Archaea dominate ammonia-oxidizing communities within alkaline cave sediments, *Geomicrobiology Journal*, 34(6), 511-523.
- Zhou, J.P., Gu, Y.Q., Zou, C.S. and Mo, M.H., 2007, Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou Province, Southwest of China, *The Journal of Microbiology*, 105-112.
- Zhu, H.Z., Zhang, Z.F., Zhou, N., Jian, C.Y., Wang, B.J., Cai, Lei. and Liu, S.J., 2019, Diversity, distribution and co-occurrence patterns of bacterial communities in a karst cave system, *Frontier in Microbiology*, 10, 1726.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N. and Smith, G. M., 2007, Principal coordinate analysis and non-metric multidimensional scaling, *Analysing ecological data*, 259-264.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Nahdhoit Ahamada Rachid
Doğum Yeri	Moroni-Komor Adaları
Doğum Tarihi	07.04.1994
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer: Komor Adaları
Telefon	05387447266
E-Posta Adresi	Nahdhoit7@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İskenderiye Üniversitesi- Mısır
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Mikrobiyoloji/Biyokimya
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji

Makale ve Bildiriler
Nahdhoit AHAMADA RACHID and Nihal DOĞRUÖZ-GÜNGÖR “Microplastics in our planet: source, distribution, effects and biodegradation.” Eskişehir Technical University Journal of Science and Technology C- Life Sciences and Biotechnology, 2020, 9 (2), pp.284-303, DOI: 10.18036/estubtdc.656857
Nahdhoit Ahamada Rachid and Nihal Doğruöz Güngör Caving impacts on cave bacterial diversity: A case study of camping in Morca cave, Turkey. International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry (BioTechBioChem 2020) December 16-18, 2020 www.BioTechBioChem.org , pp. 100.
Nahdhoit Ahamada Rachid and Nihal Doğruöz Güngör, Economic values of cave bacteria. International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry

(BioTechBioChem 2020) December 16-18, 2020 www.BioTechBioChem.org, pp. 463-468.

