

PAPER DETAILS

TITLE: Balıkesir/Antandros Antik Kenti Kazisi Toprak Örneklerinin Metagenomik Analizi

AUTHORS: Dilan BAL, Berceste BALCI, Alper YILMAZ, Gürcan POLAT, Ercan ARICAN

PAGES: 1-12

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/998136>

Balıkesir/Antandros Antik Kenti Kazısı Toprak Örneklerinin Metagenomik Analizi

Dilan BAL¹, Berceste BALCI¹, Alper YILMAZ², Gürcan POLAT³, Ercan ARICAN^{*1}

¹İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 34134, İstanbul, Türkiye

²Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 34210, İstanbul, Türkiye

³Ege Üniversitesi, Edebiyat Fakültesi, Arkeoloji Bölümü, 35040, İzmir, Türkiye

(Alınış / Received: 08.03.2020, Kabul / Accepted: 19.07.2021, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2022)

Anahtar Kelimeler

16S rRNA,
Metagenomik,
Mikroorganizma,
Toprak

Özet: Bugüne kadar, biyosferde bulunan mikroorganizmaların çok azı kültürlenme metoduyla tespit ya da teşhis edilebilmiştir. Kültürlenmemiş ya da kültürlenemeyen mikroorganizmalar ise, mikrobiyal çeşitliliğin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Metagenomik analiz, kültürlenme yapılmaksızın, çevreden direkt alınan örneklerin DNA izolasyonu sonrasında elde edilen mikroorganizmaların tür tayininin yapılmasına, genetik çeşitliliğinin, popülasyon yapısının ve bu mikroorganizmaların insan yaşantısını da etkileyen ekolojik rollerinin anlaşılmasına olanak vermektedir. Metagenomik; ilaç, biyoyakıt, biyoteknoloji, tarım, ekoloji gibi birçok farklı çalışma alanında yardımcı disiplin olarak önemli rol oynamaktadır. Paleomikrobiyoloji çalışmalarında da son yıllarda sıkça kullanılmaya başlanan metagenomik, insanlık tarihindeki mikrobiyal evrim araştırmalarına katkı sunar ve bize geçmiş zamanların mikro ekosistemini anlama perspektifi verir. Bu çalışmada, Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolünden kültürlenme yapılmaksızın direkt alınan toprak örneklerindeki mikroorganizmaların DNA izolasyonu yapıldı ve sonrasında 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgeleri PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgeler Illumina MiSeq sistemi ile dizilendi. Elde edilen dizilerin metagenomik analizi QIIME 1.9.1 kullanılarak yapıldı ve mikrobiyal çeşitlilik belirlendi.

Metagenomic Analysis of Soil Samples of Balıkesir/Antandros Ancient City Excavation

Keywords

16S rRNA,
Metagenomics,
Microorganism,
Soil

Abstract: Until now, very few of microorganisms in the biosphere have been detected and defined via cultivation methods. Microorganisms which, can not be cultured or haven't been cultured, make up of significant part of microbial diversity. Metagenomic analysis provides information about genetic diversity, population structure and ecological roles that affect human life of these microorganisms after DNA isolation of environmental samples without culturing. Metagenomics plays a significant role as discipline auxiliary to various different fields such as medicine, biofuels, biotechnology, agriculture, ecology. Metagenomics, which is started to be widely used in paleomicrobiology studies as well, contributes to microbial evolution studies in human history and gives us a perspective to understand ancient micro ecosystem. In this thesis, DNA isolation of microorganisms in culture-independent soil samples taken directly from Balıkesir/Antandros Ancient City Necropolis was performed and afterwards V3-V4 regions of 16S rRNA were multiplied by using PCR method. Replicated regions were sequenced using Illumina MiSeq system. Metagenomic analysis of these sequences was performed using QIIME 1.9.1 and microbial diversity was detected.

1. Giriş

Günümüzde Balıkesir ili, Edremit ilçesi, Altınoluk beldesi sınırları içerisinde yer alan Antandros Antik Kenti'nde yapılan kazı çalışmaları Prof. Dr. Gürcan Polat'ın başkanlığında 2001 yılından beri devam etmektedir [1]. Kazı çalışmalarının yürütüldüğü dört

sektörden biri olan nekropolün, 700 yıl kesintisiz olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Nekropolün, konumlandığı tepenin yamacında yer alması ve kullanılan alanların sürekli erozyon sonucu toprak altında kalması, mezarların üst üste olmasını ve yapıların mezarların üstüne inşa edilmiş olmasını açıklamaktadır. Antandros Antik Kenti nekropolü

*İlgili yazar: earican@istanbul.edu.tr

uzun yıllar boyunca kullanmış olması dolayısıyla farklı kültür ve dönemlere ait mezar, gömü çeşitleri ve yapılar ev sahipliği yapmaktadır [2]. Antik kalıntılardaki mikroorganizmaların tespiti ve teşhisi ile mikroorganizmaların evriminin ve insan popülasyonu ile simbiyotik ilişkisinin anlaşılmasına olanak veren paleomikrobiyoloji, tarihsel ve arkeolojik kaynaklarda ortaya konan hipotezlerin, bilimsel olarak kanıtlı verilerle desteklenmesini sağlamaktadır. Metagenomik çalışmaların son yıllarda gelişmesiyle birlikte paleomikrobiyoloji çalışmaları da hız kazanmıştır [3].

Metagenomik, mikroorganizma topluluklarını içeren örneklerin kültür edilmesine gerek duyulmaksızın direkt olarak doğal ortamlarından alınıp, içindeki mikroorganizmaların DNA'larının izole edilmesi ve bu DNA'ların yeni nesil dizileme teknikleri kullanılarak analiz edilmesidir. Metagenomik alanında yapılan ilk çalışmalar, yaklaşık olarak 1.5 kb'lık 16S rRNA genlerini hedef alan Sanger dizileme yöntemini baz almıştır [4]. Bu 1.5 kb'lık kodlama yapan dizi, gene dağılmış halde bulunan 9 tane korunmuş (C1-C9) bölge, 9 tane çok değişken (V1-V9) bölge içermektedir [5]. Daha güncel çalışmalara bakıldığında metagenomik çalışmalarda dizileme için hedef bölge olarak bu çok değişken (V1-V9) bölgelerin, dizileme yöntemi olarak ise yeni nesil dizileme yöntemlerinden biri olan Illumina'nın tercih edildiği görülmektedir. Yeni nesil dizileme yöntemleri daha düşük maliyetle günde 5000 Mb'lık DNA dizileyebiliyorken, Sanger dizileme yöntemi daha yüksek maliyetle, günde yaklaşık 6 Mb'lık DNA dizileyebilmektedir [6]. Metagenomik çalışmalarda dizilenmek üzere hedeflenen DNA dizisinin boyutu, çevresel örneklerden elde edilen mikroorganizmaların çeşidi ve mikroorganizmalara ait DNA miktarlarının fazla olması sebebiyle Illumina dizileme yöntemi tercih edilmektedir [7].

Yapılan metagenomik çalışmalarda, 16S rRNA geninin çok değişken bölgelerini hedef alan dizileme yöntemi ile elde edilen verilerin metagenomik analizinde kullanılmak üzere genellikle QIIME programının tercih edildiği görülmektedir [8]. QIIME ile DNA dizileri kalite kontrolden geçirildikten sonra, dizilere ait işlevsel taksonomik birimler (OTU'lar) belirlenebilir ve belirlenen OTU'lara taksonomik atamalar yapılarak mikrobiyal çeşitlilik belirlenebilir [9].

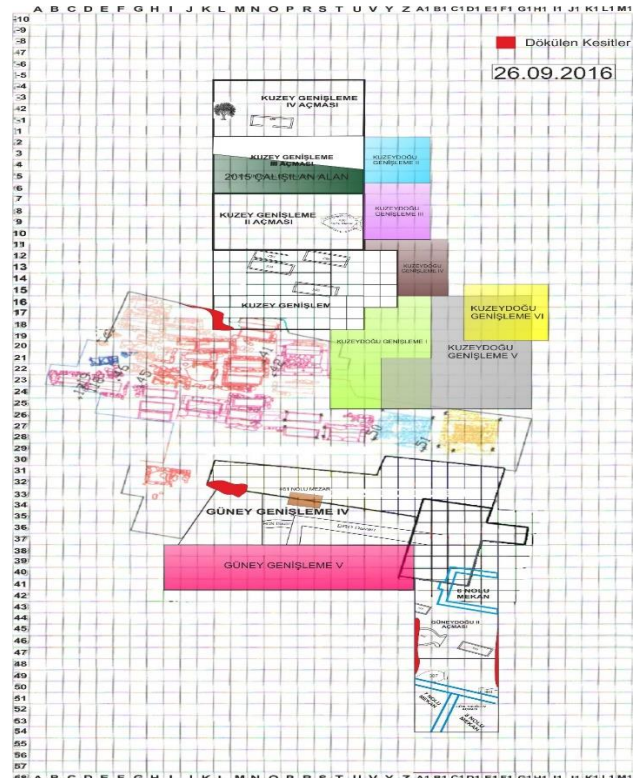
Bu çalışmada Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolünün farklı konumlarından alınan toprak örneklerindeki mikroorganizmaların kültürleme yönteminden bağımsız DNA izolasyonu işlemi sonrasında, 16S rRNA genlerinin çok değişken V3-V4 bölgesinin çoğaltılması, çoğaltılan bölgelerin Illumina dizileme yöntemiyle dizilenmesi, dizileme verilerinin metagenomik analizinde QIIME programı kullanılarak OTU'ların belirlenmesi, buna bağlı olarak taksonomik analizin yapılması ve örnek alınan bölgelerin

mikroorganizma çeşitliliğinin ortaya konması amaçlanmıştır. Elde edilen verilerle arkeolojik bulguların bilimsel olarak desteklenmesi beklenmektedir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Balıkesir/Antandros antik kenti toprak örneklerinin toplanması

Çalışma kapsamında kullanılan Balıkesir/Antandros Antik Kenti kazısı toprak örnekleri, arkeologlar gözetiminde açılan mezarlardan, çıkarılan mezar hediyelerinden, nekropolde bulunan ve depolama amaçlı kullanıldığı düşünülen pithoslardan alındı. Açılan mezarlardan örnek alınırken - bağırsaklardaki bakteriler göz önünde bulundurularak - örnek konumu olarak iskelet seviyesi karın bölgesi tercih edildi. Açılan mezarlardan çıkarılan mezar hediyelerinin (örneğin; koku kabı olarak kullanıldığı tahmin edilen buluntular) içerisinden de toprak örnekleri alındı. Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolü, farklı dönemlerde yerleşim alanı olarak da kullanıldığından, büyük depolama kaplarına (pithos) da rastlandı. Bu pithosların içerisinden de toprak örnekleri alındı.



Şekil 1. 2016 yılı nekropol genel plan kare.

Şekil 1'de Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolünün 2016 yılı genel plan karesi görülmektedir. 2016 yılı kazı sezonunda toplam 6 farklı mezardan (mezar kodları; 453, 480, 486, 487, 490, 493), Kuzeydoğu Genişleme V açması içerisinde bulunan depolama amaçlı kullanıldığı düşünülen pithostan, açılan mezarlarda bulunan 2 adet mezar

hediyesinden toplam 8 adet toprak örneği steril şekilde alındı. Örneklerin alındığı mezarlar çoğunlukla Kuzeydoğu Genişleme III ve Kuzeydoğu Genişleme IV açmalarında yer almaktadır. Alınan sadece bir örnek Kuzey Genişleme III açmasında yer almaktadır.

453 No'lu mezardaki buluntular göz önünde bulundurularak tarihlendirme, kazı ekibi tarafından M.Ö. 2. yy olarak yapılmıştır. Birincil kremasyonun küllerinin urne kabının içerisine konulduğu gözlemlenmiştir. 453 No'lu mezarda bulunan HTJ 3 kodlu mezar hediyesi içerisinden toprak örneği alındı. HTJ 3 kodlu mezar hediyesinin Şekil 1'de görülen plan karedeki konumu 2-3/S-T'dir.

480 No'lu mezarın tarihlendirmesi kazı ekibi tarafından M.Ö. 4. yy olarak yapılmıştır. 480 No'lu mezarın iskelet seviyesinin tahmini karın bölgesinden toprak örneği alındı. 480 No'lu mezarın Şekil 1'de görülen plan karedeki konumu 11/A1-B1'dir.

486 No'lu mezardaki buluntular göz önünde bulundurularak tarihlendirme, kazı ekibi tarafından M.Ö. 2. yy sonu olarak yapılmıştır. Bu mezar, birincil kremasyon çatı kiremiti mezardır. 486 No'lu mezarın iskelet seviyesinin tahmini karın bölgesinden toprak örneği alındı. 486 No'lu mezarın Şekil 1'de görülen plan karedeki konumu 13-14/ V-Z'dir.

486 No'lu çatı kremi mezarda bireyin kafatası kemiklerinin üst seviyesinden ele geçirilen mezar hediyesi HUI 5, khytridion formundadır. Tarihlendirmesi kazı ekibi tarafından 2. yy sonu -1. yy başı olarak yapılmıştır. Birincil kremasyon 486 No'lu mezar hediyesi olan HUI 5'in içerisinden toprak örneği alındı. HUI 5 kodlu mezar hediyesinin Şekil 1'de görülen plan karedeki konumu 13/Y'dir.

487 No'lu mezarın kazı ekibi tarafından M.Ö. 5. yy olarak yapılmıştır. 487 No'lu mezarın iskelet seviyesinin tahmini karın bölgesinden toprak örneği alındı. 487 No'lu mezarın Şekil 1'de görülen plan karedeki konumu 12/Y-Z'dir.

490 No'lu mezarın tarihlendirmesi kazı ekibi tarafından Hellenistik dönem (M.Ö. 330-30) olarak yapılmıştır. 490 No'lu mezarın iskelet seviyesinin tahmini karın bölgesinden toprak örneği alındı. 490 No'lu mezarın Şekil 1'de görülen plan karedeki konumu 12-13/Y'dir.

493 No'lu mezarın tarihlendirmesi kazı ekibi tarafından M.Ö. 6. yy olarak yapılmıştır. 493 No'lu mezarın iskelet seviyesinin tahmini karın bölgesinden toprak örneği alındı. 493 No'lu mezarın Şekil 1'de görülen plan karedeki konumu 13/Z-A1'dir.

Kuzeydoğu Genişleme V açmasında yer alan ve amphoralarla aynı açmada bulunması sebebiyle depolama amaçlı kullanıldığı düşünülen pithosun içerisinden toprak örneği alındı.

2.2. Toprak örneklerinden DNA izolasyonu

Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolünden alınan toprak örneklerinin DNA izolasyon işlemi, steril kabin içerisinde yapıldı. İzolasyon öncesinde kabin 20 dk. boyunca UV ışık ile sterilize edildi. İzolasyonu yapılacak toprak örneği, içerisindeki taşların fiziksel parçalanmasını hızlandırmak amaçlı otoklavlanmış havan içerisinde dövülüp toz haline getirildi. DNA izolasyon prosedürü, NORGEN firmasının, sadece topraktan DNA izolasyonu için tasarladığı Soil DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, Ontario, Kanada, Katalog no: 26500) prosedürünün bazı solüsyon miktarları optimize edilerek uygulandı.

2.3. PZR yöntemi ile 16S rRNA geni V3-V4 bölgesinin çoğaltılması

İzolasyonu yapılan toprak örneklerinin 16S rRNA geni V3-V4 bölgeleri PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Bu PZR çalışmasıyla, izolasyonu yapılan örneklerin çalışıp çalışmadığının kontrolü yapıldı. Bu protokolda kullanılan primer çiftleri (S-D-Bact-0341-b-S-17, S-D-Bact-0785-a-A-21), 16S rRNA geni, V3 ve V4 bölgesini hedeflemektedir [10].

S-D-Bact-0341-b-S-17 ♦ CCTACGGGNGGCWGCAG
S-D-Bact-0785-a-A-21 ♦ GACTACHVGGGTATCTAATCC

16S Amplikon PZR İleri Primer = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTAC
GGGNGGCWGCAG

16S Amplikon PZR Geri Primer = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAC
TACHVGGGTATCTAATCC

Koyu yazılan diziler; 16S rRNA geni V3-V4 bölgelerine özgü primer dizileridir. Normal yazılan diziler ise, Illumina evrensel adaptör dizileridir [11]. V3-V4 bölgelerine özgü primerler dizilerinde N harfi A,T,G ya da C; W harfi A ya da T; H harfi A, C ya da T; V harfi de A, C ya da G nükleotitlerini temsil etmektedir. PZR işleminde, N, W, H ve V'nin yerine gelebilecek nükleotitlerin bütün kombinasyonları ile tasarlanan primerleri eşit miktarda içeren karışım kullanıldı.

PZR işlemi, Tablo 1'de hazırlanan bileşenlerle C1000 Thermal Cycler (Biorad Laboratories, Inc., ABD) cihazı kullanılarak, Tablo 2'de belirtilen koşullar uygulanarak gerçekleştirildi.

Tablo 1. PZR için gerekli bileşenler.

Bileşen Adı	Hacim
Mikrobiyal DNA (5ng/µl)	2.5 µl
16S Amplikon PZR İleri Primer = 5'	5 µl
16S Amplikon PZR Geri Primer = 5'	5 µl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, KK2601)	12.5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 2. PZR koşulları.

Döngüler	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	3 dk	1
-Denatürasyon	95	30 sn	25
-Bağlanma	55	30 sn	
-Uzama	72	30 sn	
Son Uzama	75	5 dk	1
Bekleme	4	∞	

PZR sonrası, çoğaltılan ampikonların primer, primer dimer ve diğer PZR bileşenlerinden temizlenmesi için PZR pürifikasyon basamağı uygulandı. Temizlenen ampikonlara, ait oldukları örnekler öze, Illumina index dizileri eklendi ve ampikonlar tekrar pürifiye edildi [11].

PZR sonucunda yaklaşık 460 bç uzunluğunda ampikonlar çoğaltıldı. PZR çalışması ile V3-V4 bölgeleri çoğaltılan örnekler % 1.2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntüldü.

2.4. 16S rRNA geni V3-V4 bölgesi çoğaltılan örneklerin Illumina yeni nesil dizileme yöntemi ile dizilenmesi

Örneklerin DNA dizileme işlemi için Piya Biyoteknoloji şirketinden profesyonel hizmet alımı yapıldı. Örneklerin DNA dizilemesi Illumina MiSeq sistemi kullanılarak yapıldı. Örneklerin DNA dizileri fasta ve qual formatında elde edildi. Dizileme verilerinin metagenomik analizi için QIIME 1.9.1 versiyonu kullanıldı ve analiz protokolü Kuczynski ve diğ. tarafından 2011 yılında yayımlanan makale [9] referans alınarak uygulandı.

Yeni nesil dizileme işlemi sırasında her örneğe spesifik 8 nükleotid uzunluğunda barkod dizileri eklendi. Bu sayede her bir örnekten gelen DNA dizilerinin ayrıştırılabilmesi amaçlandı (Tablo 3).

Tablo 3. Örnekler için spesifik barkod dizileri.

Örnek Kodu	Örnek Adı	Barkod Dizisi
1A	453 mezar hediyesi HTJ 3	CAGTTCAT
2A	Kuzeydoğu Genişleme V	CAGTTGCA
3Y	490 iskelet seviyesi	CATGCGCA
4A	493 iskelet seviyesi	CATAACAA
5A	480 iskelet seviyesi	CATAATAG
6A	486 iskelet seviyesi	CATATTCT
7A	487 iskelet seviyesi	CATCAACA
8A	486 mezar hediyesi HUI 5	CATCACCG

2.5. Dizileme verilerinin metagenomik analizi

Metagenomik analizin ilk basamağında çoklu okuma sayıları, örneklerin barkod dizilerine göre atanır. Bu aşamada, her bir dizinin kalite filtrelemesi yapılır ve düşük kaliteli veya belirsiz okumalar kaldırılır.

Yeni nesil dizileme sonucunda elde edilen ham dizilerin uçları kalite skor değerleri dikkate alınarak kısaltıldı. (Kalite skoru >25) Belirtilen işlemler için

split_libraries.py komut dizisi uygulandı. Uygulanan komut dizisi aşağıdaki gibidir:

```
split_libraries.py -m barkod-dosyaadi.txt -f
dizileme-dosyaadi.raw.fasta.gz -q dizileme-
dosyaadi.raw.qual.gz -o
split_Library_output_8bp/ -b 8
```

OTU belirleme aşamasında, benzerlik eşliğine (%97) bağlı kalınarak benzer diziler, kümeleme yöntemiyle işlevsel taksonomik birimlere (OTU'lara) atanır. Bu aşama için *pick_otus.py* komut dizisi uygulandı. Uygulanan komut aşağıdaki gibidir:

```
pick_otus.py -i split_Library_output_8bp/seqs.fna -
o picked_otus_default
```

Bir sonraki aşama, QIIME üzerinden varsayılan (default) Uclust parametreleri kullanılarak tamamlandı. Bu aşamanın sonucunda örnekler için dizilerin kalite kontrolleri yapıldı, kimerik diziler filtreldi ve kümelemeler gerçekleştirildi. OTU'ların belirlenmesinden sonra, diğer aşamalarda analizlerde kullanılmak üzere her bir OTU'dan temsili bir dizi seçilmesi gerekmektedir. Bu aşama için *pick_rep_set.py* komut dizisi uygulandı. Uygulanan komut aşağıdaki gibidir:

```
pick_rep_set.py -i
picked_otus_default/seqs_otus.txt -f
split_Library_output_8bp/seqs.fna -o rep_set1.fna
```

Bir sonraki aşamada, belirlenen her bir OTU'nun temsili dizilerine taksonomik atamalar yapıldı. Dizilerin taksonomik atamaları varsayılan (default) Uclust parametreleri ve Greengenes Veri tabanı (versiyon 13.8) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu aşamada *assign_taxonomy.py* komut dizisi uygulandı. Uygulanan komut aşağıdaki gibidir:

```
assign_taxonomy.py -i rep_set1.fna
```

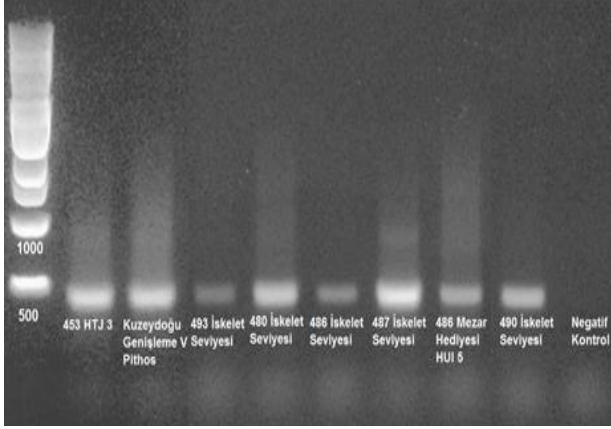
3. Bulgular

Alınan toprak örneklerinin DNA izolasyonu sonrasında spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen konsantrasyon değerleri Tablo 4'te belirtilmiştir.

Tablo 4. DNA izolasyonu yapılan örneklerin konsantrasyon değerleri.

Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/μl)
1A-453 No'lu mezar hediyesi HTJ 3	8.4
2A-Kuzeydoğu Genişleme-V Pithos	19.1
3Y-490 No'lu mezar iskelet seviyesi	9.2
4A-493 No'lu mezar iskelet seviyesi	6.7
5A-480 No'lu mezar iskelet seviyesi	8.4
6A-486 No'lu mezar iskelet seviyesi	8
7A-487 No'lu mezar iskelet seviyesi	10.7
8A-486 No'lu mezar hediyesi HUI 5	5.1

DNA izolasyonu yapılan örneklerin V3-V4 bölgesinin çoğaltılabilmesi için PZR yöntemi uygulandı. Daha sonra PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kalitatif analiz yapıldı ve agaroz jel üzerinde oluşan bantlar görüntüldü (Şekil 2).



Şekil 2. V3-V4 bölgesi PZR yöntemiyle çoğaltılan örneklerin elektroforez jel görüntüsü.

DNA izolasyonu ve PZR işlemi sonucunda örnekler, yeni nesil dizileme yöntemi ile Illumina MiSeq sistemi kullanılarak Piya Biyoteknoloji şirketi tarafından dizilendi. Dizileme sonuçları fasta ve qual formatında elde edildi. Dizileme sonucunda elde edilen DNA dizilerinin başında 8 nükleotit uzunluğunda spesifik barkod dizileri bulunmaktadır.

1A-453 No'lu mezar hediyesi HTJ 3 örneğine ait bir DNA dizisi;

```
CAGTTCATCCTACGGGGGGCAGCAGCGAGGAATCTTGGG
CAATGGGCGCAAGCCTGACCCAGCGACGCCGCTGAGGGA
TGAAGGCCTTCGGGTGTAACCTCTTTTGTGAGGGAAGA
AGTTCTGACGGTACCTCAGCAATAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT
CCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGCTTGTAGGCGGTTCTGTT
AAGTCCGGTGTGAAATCTCCCGGCTCACTGGGAGGAGCC
ATCGGAAACTGGCGAGCTAGAGGTGGGAGAGGAAAGCG
GAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAG
GAACACCACTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGGCCTATCCTGA
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCAAACCGGATTAGA
TACCCACAGTAGTC
```

2A-Kuzeydoğu Genişleme V, Pithos örneğine ait bir DNA dizisi;

```
CAGTTGCACCTACGGGGGGCTGCAGTGGGAATCTTGGCG
AATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCGCTGCGGGAT
GACGGCCTTCGGGTGTAACCGCTTTCAGTGGGAGCGAA
ACCAGACGGTACCCACAGAAGAAGCCCGGCCAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGTAACACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCC
GGAATCATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTCAGTAA
GTCGGGTGTGAAACCTCAGGCTCAACCTGGGAGCGCCAC
TCGATACTGCTGTGGCTAGAGTCCAGTAGAGGAGTGTGGA
ATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGGGAGGA
ACACCAACGGCGAAGGCAGCACTCTGGGCTGGAATGACG
CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGAT
```

3Y-490 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğine ait bir DNA dizisi;

```
CATGCGCACCTACGGGAGGCTGCAGTGGGGAATTTTGGCG
AATGGGCGAAAGCCTGACGCAGTAACGCCGCGTGAGGAT
GAAGGCATTTCGGGTGTAACCTCTGTCTAGGGGGAACGAC
GGGAAAGGGTGATAAATCCTTTCTCCAGACGGTACCTC
CAAAGGAAGCCCGGCTAATTCCTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAAAGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATCATTGGGCGT
AAAGGGCGCGTAGGTGGTTCTGTATGTCTACCGTGAAAGC
GTACGGCTCAACCGTGCATTGTCTGTAGAACTGCAGGAC
TTGAGGCTGGGAGGGGCTGGTGAATTCCTGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATGGGGGAGAACACTCGTGGCGAAG
GCGGCCAGCTAGACCAGTTCTGACACTGAGGCGCGACAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
```

4A-493 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğine ait bir DNA dizisi;

```
CATAACAACCTACGGGGGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG
CAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
TGAAGGTCTTCGGATCGTAAACCTCTGTTATTAGGGAAGA
ACAAATGTGTAAGTAAGTATGCAGTCTTGACGGTACCTA
ATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATGGAACTGGAAAC
TTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCG
GTGAAATGCGCAGAGATATGGGAAACACCACTGGCGAA
GGGACCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAG
CGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCGTGTAGTC
```

5A-480 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğine ait bir DNA dizisi;

```
CATAATAGCCTACGGGGGGCAGCAGTCGGGAATTTTGGC
CAATGGACGAAAGTCTGAGGCAGCAACTCCGCGTGAGGGA
CCAAGGCCTTCGGGTGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGA
TCCAAGACGGTACCTGAGGAATAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
CGGATTTACTGGGCGTAAAGAGCGCGCAGCGCGTGGGTG
AGTCCGATGTGAAAGCTTCCGGCTTAACTGGAACCGGCA
TCGGAACCTGCTCGGCTTGAAGGTGGGAGAGGGTAGTGG
AATTCGGGTGTAGTGGTGAATGCGTAGATATCGGGAGG
AACACCACTGGCGAAGGCGGCTACCTGGCCATTCTTGAC
GCTGAGGCGCGAAGCTAGGGGAGCGAACGGGAT
```

6A-486 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğine ait bir DNA dizisi;

```
CATATTCTCCTACGGGTGGCAGCAGTGGGGAATCTTGGCG
AATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGCGGGAT
GAAGGCCTTCGGGTGTAACCGCTTTCAGTAGGGACGAA
CACAGACGGTACCTACAGAAGAAGCAGCGGCCAACTACGT
GCCGCGAGCCGCGTAACACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCC
GGAATCATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTAGTAA
GTGGGTGTGAAAACCCAGGCTCAACCTGGGAGCGCCAC
CCGATACTGCTATAGCTAGAGTCCAGTAGGGGAGTGTGGA
ATCCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATTGGGAGGA
ACACCAAGCGGGAAGGCGGCACTCTGGGCTGGAAGTACG
CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATA
CCCCGTAGTC
```

7A-487 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğine ait bir DNA dizisi;

**CATCAACACCTACGGGGGCTGCAGTGGGGAATCTTGCGC
AATGGCCGCAAGGCTGACGCAGCGACGCCGCTGTGGGAT
GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCACTGTCGGGAGGAACGAA
TACTCGGCCTCGAATAGGGGACGAGGGTGACGGTACCTC
CAAAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGT
AAAGGGCGCGTAGGGCGGCCGTTAAGTGGCTGGTGAATC
CCGGGGCTCAACTCCGGGGCTGCCAGTCAGACTGGCGAGC
TAGAGCACGGTAGGGGAGATGGAATCCCGGTGTAGCGG
TGGAATGCGTAGAGATCGGGAAGAATACCAGTGGCGAAG
GCGTTCTGCTGGGCCGTTGCTGACGCTGAGGCGCGACAGC
GTGGGGAG**

8A-486 No'lu mezar hediyesi HUI 5 örneğine ait bir DNA dizisi;

**CATCACCGCCTACGGGAGGCAGCAGTCCGGAATTTTGCCC
AATGGACGAAAGTCTGAGGCAGCAACGCCGCTGAGGGAT
GAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGACGAT
GATGACGGTACCTGAGGAATAAGCCACGGCTTACTACGTG
CCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
GATTTACTGGGCGTAAAGAGCGCGCAGGCGGTGCTTCAAG
TCGGATGTGAAATCCCCCGGCTCAACTGGGGGGCGTCATT
CGATACTGATCGACTTGAAGGCAGGAGAGGGAAGCGGAA
TTCCCGGTGTAGTGGTGAATGCGTAGATATCGGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGCGCGCTTCTGGCCTGTTCTTGACGC
TGAGGCGCGAAGCCAGGGAGCAAACGGGATTAGATACC
CCGGTAGTC**

Dizilemesi yapılan örneklerin metagenomik analizi yapıldı. Metagenomik analizin bir aşaması olan çoklu okuma sonuçlarının biyolojik örneklere atanması basamağında elde edilen, dizilenen her bir örneğe ait barkod okuma sayısı Tablo 5'te gösterilmiştir. Çoklu okuma sayısı, dizileme sırasında eklenen her bir örneğe özgü barkod dizilerinin, o örnek içinde okunma sayısıdır. Bu nedenle çoklu okuma sayısı, her bir örnek içinde bulunan farklı DNA dizisi sayısını vermektedir.

Tablo 5. Her bir örnek için elde edilen barkod okuma sayısı.

Örnek Kodu	Örnek Adı	Okuma Sayısı
1A	453 HTJ 3	191864
2A	Kuzeydoğu Genişleme V	98511
3Y	490 iskelet seviyesi	51500
4A	493 iskelet seviyesi	53471
5A	480 iskelet seviyesi	84957
6A	486 iskelet seviyesi	42453
7A	487 iskelet seviyesi	123523
8A	486 mezar hediyesi HUI 5	48965

Örneklerin DNA dizilerinin metagenomik analizi basamaklarında OTU'lar belirlendi, her bir OTU'yu temsil eden diziler belirlendi ve sonuç olarak her bir temsilci dizinin taksonomik ataması yapıldı. Elde edilen sonuçlar farklı taksonomik basamaklara göre ayrılarak, örneklerdeki mikroorganizma çeşitliliği belirlendi. Taksonomik analizde 8 örnek içerisinde toplam 2 alem, 37 şube, 112 sınıf, 211 takım, 336

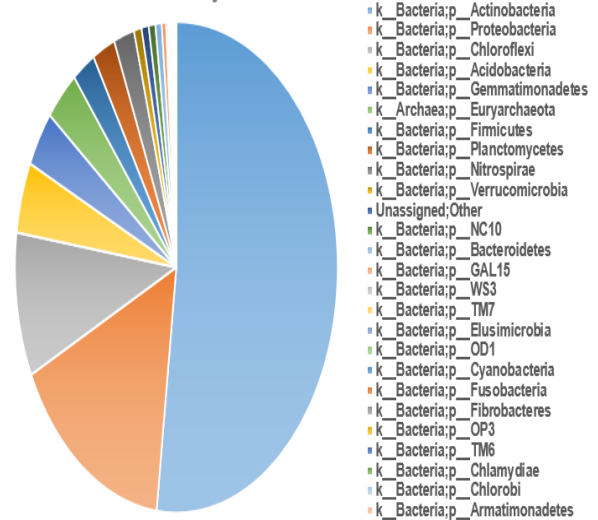
familya, 468 cins ve 505 tür tespit edildi. Greengenes veri tabanı (versiyon 13.8) kullanılarak yapılan karşılaştırmada herhangi bir taksonomik eşleşmenin yapılamadığı (unassigned) mikroorganizmaların yüzdesi ise her örnek için farklı değerlerdedir.

Taksonomik analiz sonuçları bir tablo yapılarak, her bir örnekte görülen mikroorganizmaların taksonomik bilgileri ve o örnekteki görülme yüzdesi yazıldı. Yapılan taksonomik analiz sonucunda elde edilen mikroorganizma şube bilgileri kullanılarak her bir örnek için tablo (Tablo 6-13) ve grafikler (Şekil 3-10) çizildi.

Tablo 6. 1A-453 No'lu Mezar Hediyesi HTJ 3 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

Alem-Şube Adı	Oran (%)
k_Bacteria;p_Actinobacteria	51,932
k_Bacteria;p_Proteobacteria	15,841
k_Bacteria;p_Chloroflexi	9,464
k_Bacteria;p_Acidobacteria	4,673
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes	3,695
k_Archaea;p_Euryarchaeota	3,449
k_Bacteria;p_Firmicutes	2,322
k_Bacteria;p_Planctomycetes	2,286
k_Bacteria;p_Nitrospirae	2,057
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	0,769
Unassigned;Other	0,721
k_Bacteria;p_NC10	0,665
k_Bacteria;p_Bacteroidetes	0,632
k_Bacteria;p_GAL15	0,430
k_Bacteria;p_WS3	0,205
k_Bacteria;p_TM7	0,150
k_Bacteria;p_Elusimicrobia	0,148
k_Bacteria;p_OD1	0,121
k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0,096
k_Bacteria;p_Fusobacteria	0,079
k_Bacteria;p_Fibrobacteres	0,061
k_Bacteria;p_OP3	0,060
k_Bacteria;p_TM6	0,033
k_Bacteria;p_Chlamydiae	0,028
k_Bacteria;p_Chlorobi	0,021
k_Bacteria;p_Armatimonadetes	0,019

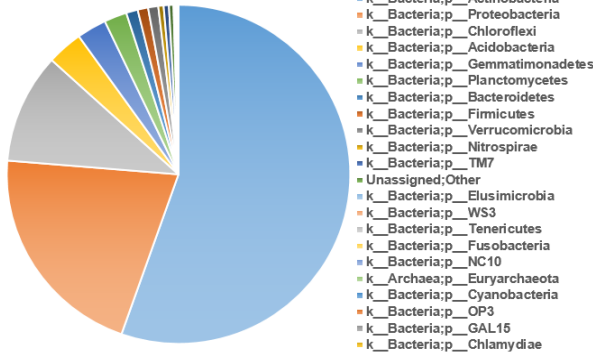
1A-453 Mezar Hediyesi HTJ 3



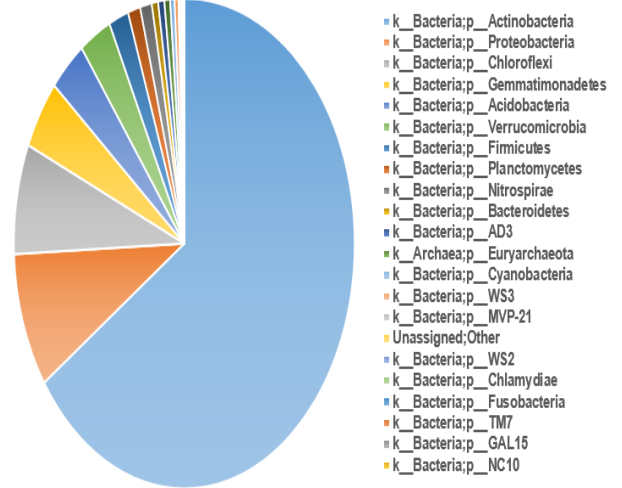
Şekil 3. 1A-453 No'lu Mezar Hediyesi HTJ 3 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

Tablo 7. 2A-Kuzeydoğu Genişleme V, depolama amaçlı pithos örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

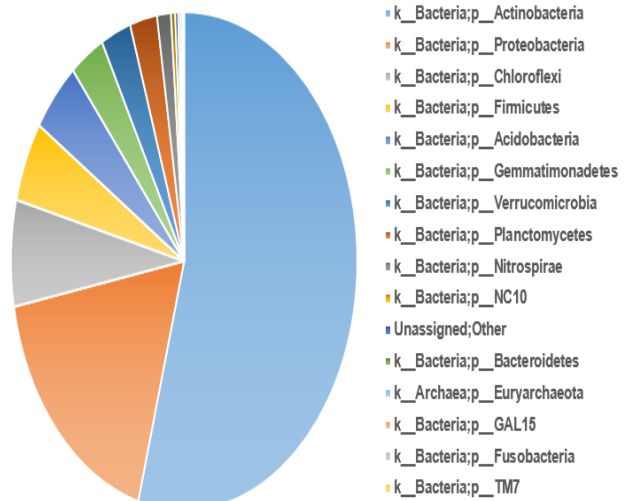
Alem-Şube	Oran (%)
k_Bacteria;p_Actinobacteria	55,383
k_Bacteria;p_Proteobacteria	20,898
k_Bacteria;p_Chloroflexi	10,482
k_Bacteria;p_Acidobacteria	3,370
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes	2,793
k_Bacteria;p_Planctomycetes	2,139
k_Bacteria;p_Bacteroidetes	1,093
k_Bacteria;p_Firmicutes	0,986
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	0,956
k_Bacteria;p_Nitrospirae	0,500
k_Bacteria;p_TM7	0,491
Unassigned;Other	0,429
k_Bacteria;p_Elusimicrobia	0,088
k_Bacteria;p_WS3	0,072
k_Bacteria;p_Tenericutes	0,063
k_Bacteria;p_Fusobacteria	0,057
k_Bacteria;p_NC10	0,043
k_Archaea;p_Euryarchaeota	0,033
k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0,033
k_Bacteria;p_OP3	0,028
k_Bacteria;p_GAL15	0,024
k_Bacteria;p_Chlamydiae	0,022

2A- Kuzeydoğu Genişleme V, Pithos**Şekil 4.** 2A-Kuzeydoğu Genişleme V, depolama amaçlı pithos örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.**Tablo 8.** 3Y-490 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

Alem-Şube	Oran (%)
k_Bacteria;p_Actinobacteria	65,377
k_Bacteria;p_Proteobacteria	8,923
k_Bacteria;p_Chloroflexi	7,264
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes	4,591
k_Bacteria;p_Acidobacteria	3,539
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	3,051
k_Bacteria;p_Firmicutes	1,880
k_Bacteria;p_Planctomycetes	1,182
k_Bacteria;p_Nitrospirae	1,108
k_Bacteria;p_Bacteroidetes	0,611
k_Bacteria;p_AD3	0,584
k_Archaea;p_Euryarchaeota	0,546
k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0,414
k_Bacteria;p_WS3	0,372
k_Bacteria;p_MVP-21	0,148
Unassigned;Other	0,139
k_Bacteria;p_WS2	0,087
k_Bacteria;p_Chlamydiae	0,047
k_Bacteria;p_Fusobacteria	0,045
k_Bacteria;p_TM7	0,043
k_Bacteria;p_GAL15	0,025
k_Bacteria;p_NC10	0,011

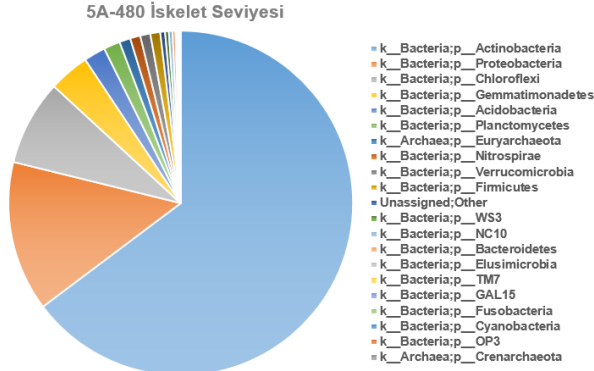
3Y-490 İskelet Seviyesi**Şekil 5.** 3Y-490 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.**Tablo 9.** 4A-493 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

Alem-Şube	Oran (%)
k_Bacteria;p_Actinobacteria	54,273
k_Bacteria;p_Proteobacteria	17,783
k_Bacteria;p_Chloroflexi	6,885
k_Bacteria;p_Firmicutes	5,226
k_Bacteria;p_Acidobacteria	4,710
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes	3,232
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	2,816
k_Bacteria;p_Planctomycetes	2,541
k_Bacteria;p_Nitrospirae	1,293
k_Bacteria;p_NC10	0,393
Unassigned;Other	0,281
k_Bacteria;p_Bacteroidetes	0,206
k_Archaea;p_Euryarchaeota	0,197
k_Bacteria;p_GAL15	0,057
k_Bacteria;p_Fusobacteria	0,055
k_Bacteria;p_TM7	0,034

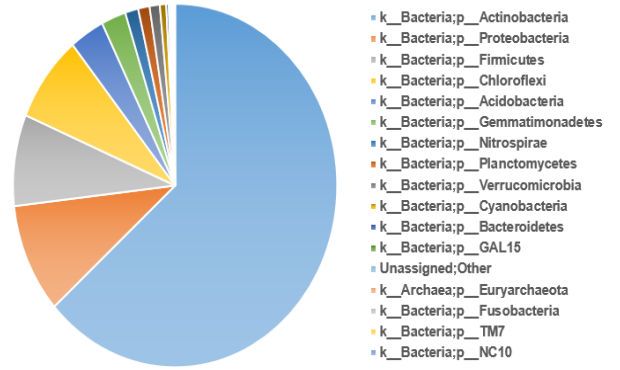
4A-493 İskelet Seviyesi**Şekil 6.** 4A-493 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

Tablo 10. 5A-480 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

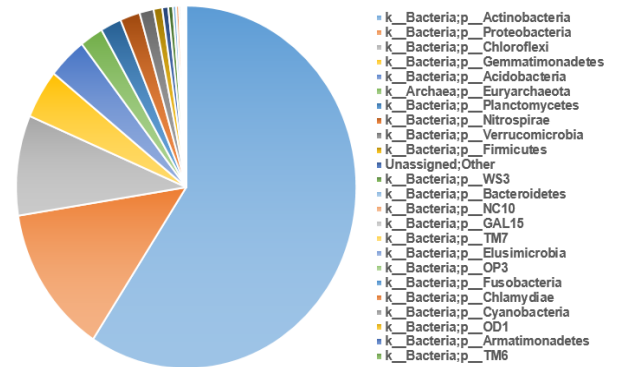
Alem-Şube	Oran (%)
k_Bacteria;p_Actinobacteria	64,742
k_Bacteria;p_Proteobacteria	14,089
k_Bacteria;p_Chloroflexi	8,007
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes	3,807
k_Bacteria;p_Acidobacteria	2,030
k_Bacteria;p_Planctomycetes	1,541
k_Archaea;p_Euryarchaeota	1,039
k_Bacteria;p_Nitrospirae	0,957
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	0,948
k_Bacteria;p_Firmicutes	0,928
Unassigned;Other	0,449
k_Bacteria;p_WS3	0,352
k_Bacteria;p_NC10	0,336
k_Bacteria;p_Bacteroidetes	0,278
k_Bacteria;p_Elusimicrobia	0,144
k_Bacteria;p_TM7	0,133
k_Bacteria;p_GAL15	0,084
k_Bacteria;p_Fusobacteria	0,072
k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0,028
k_Bacteria;p_OP3	0,017
k_Archaea;p_Crenarchaeota	0,010

**Şekil 7.** 5A-480 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.**Tablo 11.** 6A-486 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

Alem-Şube	Oran (%)
k_Bacteria;p_Actinobacteria	63,392
k_Bacteria;p_Proteobacteria	9,788
k_Bacteria;p_Firmicutes	8,130
k_Bacteria;p_Chloroflexi	7,774
k_Bacteria;p_Acidobacteria	3,464
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes	2,458
k_Bacteria;p_Nitrospirae	1,312
k_Bacteria;p_Planctomycetes	1,137
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	1,023
k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0,630
k_Bacteria;p_Bacteroidetes	0,244
k_Bacteria;p_GAL15	0,189
Unassigned;Other	0,151
k_Archaea;p_Euryarchaeota	0,141
k_Bacteria;p_Fusobacteria	0,093
k_Bacteria;p_TM7	0,050
k_Bacteria;p_NC10	0,011

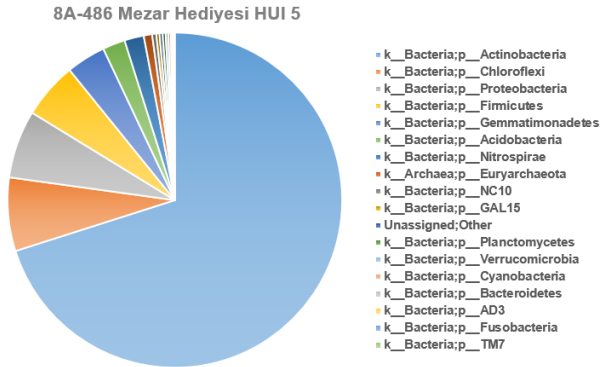
6A-486 İskelet Seviyesi**Şekil 8.** 6A-486 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.**Tablo 12.** 7A-487 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

Alem-Şube	Oran (%)
k_Bacteria;p_Actinobacteria	59,193
k_Bacteria;p_Proteobacteria	13,268
k_Bacteria;p_Chloroflexi	8,918
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes	4,366
k_Bacteria;p_Acidobacteria	3,698
k_Archaea;p_Euryarchaeota	2,215
k_Bacteria;p_Planctomycetes	1,988
k_Bacteria;p_Nitrospirae	1,890
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	1,341
k_Bacteria;p_Firmicutes	0,820
Unassigned;Other	0,566
k_Bacteria;p_WS3	0,441
k_Bacteria;p_Bacteroidetes	0,305
k_Bacteria;p_NC10	0,271
k_Bacteria;p_GAL15	0,178
k_Bacteria;p_TM7	0,124
k_Bacteria;p_Elusimicrobia	0,108
k_Bacteria;p_OP3	0,066
k_Bacteria;p_Fusobacteria	0,049
k_Bacteria;p_Chlamydiae	0,038
k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0,038
k_Bacteria;p_OD1	0,033
k_Bacteria;p_Armatimonadetes	0,029
k_Bacteria;p_TM6	0,015

7A-487 İskelet Seviyesi**Şekil 9.** 7A-487 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

Tablo 13. 8A-486 No'lu mezar hediyesi HUI 5 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

Alem-Şube	Oran (%)
k_Bacteria;p_Actinobacteria	70,081
k_Bacteria;p_Chloroflexi	7,088
k_Bacteria;p_Proteobacteria	6,560
k_Bacteria;p_Firmicutes	5,426
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes	3,804
k_Bacteria;p_Acidobacteria	2,172
k_Bacteria;p_Nitrospirae	1,873
k_Archaea;p_Euryarchaeota	0,811
k_Bacteria;p_NC10	0,395
k_Bacteria;p_GAL15	0,311
Unassigned;Other	0,297
k_Bacteria;p_Planctomycetes	0,292
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	0,252
k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0,245
k_Bacteria;p_Bacteroidetes	0,157
k_Bacteria;p_AD3	0,126
k_Bacteria;p_Fusobacteria	0,065
k_Bacteria;p_TM7	0,033

**Şekil 10.** 8A-486 No'lu mezar hediyesi HUI 5 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma için alınan toplam 8 farklı örneğin DNA izolasyonu, toprak örneklerinden DNA izolasyonu için tasarlan Soil DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, Ontario, Kanada, Katalog no: 26500) kullanılarak yapıldı ve izole edilen DNA miktarları spektrofotometrik ölçüm yapılarak tespit edildi. Elde edilen DNA konsantrasyonları ortalama yaklaşık 10 ng/µl'dir (Tablo 4). Bu kit ile yapılan toprak izolasyonlarında DNA konsantrasyon değerlerinin yaklaşık olarak 20-25 ng/µl aralığında görülmesi beklenmektedir [12]. Örneklerden izole edilen DNA konsantrasyon değerleri, beklenen değerlerden düşük çıkmıştır. Bu durumun, örneklerin yaklaşık 2000-2500 yıllık mezarlardan alınmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışma kapsamında DNA izolasyonu yapılan örneklerin 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltıldı. PZR sonucunda ~460 bp'lik DNA dizileri elde edildi. Benzer yöntemle mikrobiyotadaki farklılığın tespit edildiği Cho ve diğ.'nin (2019) yaptığı çalışmada, Hepatosellüler Karsinom ve Siroz hastalarından alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'ların 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgesi

çoğaltılmıştır ve bu hastaların kanlarındaki mikrobiyal çeşitlilik tespit edilmiştir [13]. Hepatosellüler Karsinom hastalarının mikrobiyal çeşitliliğinin, siroz hastalarına ve kontrol grubuna göre önemli ölçüde farklılık gösterdiği ve Hepatosellüler Karsinom hastalarında bulunan bazı mikroorganizmaların potansiyel biyobelirteçler olabileceği belirtilmiştir.

Bu çalışmada, DNA izolasyonu yapılan ve PZR yöntemi ile 16S rRNA V3-V4 bölgeleri çoğaltılan örnekler Illumina MiSeq sistemi ile dizilendi ve ~460 bp uzunluğunda diziler elde edildi. Batı Sicilya'da keşfedilen Arkaik Monte Iato'daki bir yapıdan alınan toprak örneklerinin dizilemesi de Illumina MiSeq sistemi kullanılarak yapılmıştır [14]. Yemek atığı imha edilen alandan ve şömineden alınan toprak örneklerindeki mikroorganizma çeşitliliği kıyaslanmıştır. Şömineden alınan toprak örneklerindeki mikroorganizmaların karboksilik ve asetik asitleri metabolize ettiği, yemek atığı imha edilen alandan alınan toprak örneklerindeki mikroorganizmaların ise karbonhidratları metabolize ettiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, Illumina MiSeq sistemi kullanılarak fasta ve qual formatında elde edilen dizilerin metagenomik analizi QIIME 1.9.1 versiyonu kullanılarak yapıldı. Metagenomik analiz sonucunda 8 örnek içerisinde toplam 2 alem, 37 şube, 112 sınıf, 211 takım, 336 familya, 468 cins ve 505 tür tespit edildi. Taksonomik analiz sonucunda tespit edilen mikroorganizma şubeleri bu çalışma kapsamında değerlendirildi (Tablo 6-13, Şekil 3-10). Kim ve diğ.'nin (2018) Çin lahanası üzerindeki patojen mikroorganizmaları tespit etmeyi amaçladığı çalışmada, Illumina MiSeq sistemi kullanılarak elde edilen dizileme verilerinin metagenomik analizlerini QIIME ile yapılmıştır ve sonucunda bütün örneklerden toplam 29 şube, 169 takım, 322 familya ve 767 cins tespit edilmiştir [15].

Çalışma kapsamında elde edilen taksonomik analiz sonuçlarına göre, dizilenen 8 örnekte görülen en yüksek mikroorganizma yoğunluğu Actinobacteria şubesinde tespit edildi. Toprak ve su ekosistemlerinde farklı türleri bulunan Actinobacteria, toprakta daha çok mantar gibi davranarak organik maddelerin bitkiler tarafından kullanılabilmesi için parçalanmasını sağlar. Bu nedenle tarım ve orman ekosisteminde oldukça önemli bir yere sahiptir. Actinobacteria'nın diğer bakterilerden evrimsel olarak ayrışması daha eskiye dayanmaktadır. Bu da filogenetik olarak yakın olan bakterilerin tespit edilmesini imkansız kılmaktadır [16]. Antandros Antik kenti nekropolü hem mezarlık olarak hem de yerleşim alanı olarak yaklaşık 700 yıl aralıksız kullanılmıştır [2]. Elde edilen bulgular sonucunda yerleşim alanı olarak kullanıldığı dönemde, bu alanın tarım alanı olarak da kullanılmış olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda nekropolün bulunduğu konumun

çevresinin günümüzde zeytin ağaçları ile kaplı olması bu bakteri şubesinin yoğun görülme nedenini açıklar niteliktedir. Actinobacteria'nın uzun yıllar önce evrimleşmiş olduğu göz önünde bulundurulduğunda ise, Antandros Antik kenti nekropolünün mezarlık ya da yerleşim alanı olarak kullanılmadan önce de bu alanın zeytin ağaçlarıyla kaplı ormanlık bir alan olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen taksonomik verilerde Actinobacteria'dan sonra en yoğun görülen şube Proteobacteria'dır. Proteobacteria, birçok insan patojen türü içerdiği bilinen büyük bakteriyel şubelerden biridir. Sadece bağırsakta değil, ekstraintestinal hastalıklarda da rol oynadığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Daha güncel çalışmalar astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi akciğer hastalıklarında da rol oynadığını göstermektedir [17]. Bu patojen türlerini içeren Proteobacteria şubesi, bu bölgede bu patojenlerden kaynaklı hastalıkların geçmiş dönemde yaşanmış olma ihtimalini düşündürmektedir. Bununla birlikte, nekropolün tepenin yamacına konumlanmış olması dolayısıyla, yağmur suları ve erozyonla birlikte nekropoldeki toprak katmanlarının zamanla birbirine karışmış olduğu düşünülmektedir [2]. İnsan patojenleri ile ilişkilendirilen bu bakteri şubesinin sadece iskelet seviyesi örneklerinde değil, bütün örneklerde yüksek miktarda tespit edilmesinin sebebinin yağmur suları ve erozyon olabileceği düşünülmektedir.

Alınan toprak örneklerinden izole edilen mikroorganizma oranlarının yüksek oranda görüldüğü Chloroflexi, Acidobacteria, Gemmatimonades, Firmicutes şubeleri ise, reaksiyon bazlı fototropi ile ilişkilendirilen şubelerdir. Hatta patojen olmayan bazı Proteobacteria türleri de bu gruba dahildir. Fotosentezin evrimsel sürecine bakıldığında bu şubelere ait türlerin ışık duyarlılığıyla karbon döngüsü yapabildiği görülmüştür. Buna reaksiyona bağlı fototropi denilmektedir. Bu nedenle bu şubeler fotosentez mekanizması ile ilişkilendirilmektedir [18]. Bu fotosentez mekanizmasının evrimi ile ilişkilendirilen bakteri şubeleri, yine tarım alanları ve ormanların çeşitli dönemlerde nekropol alanında bulunmuş olabileceği düşündürmektedir.

Bütün örneklerde belirli miktarlarda tespit edilmiş olan Planctomycetes ve Nitrospirae şubeleri ise, deniz sularında bulunan mikroorganizmalardır. Her iki şube de azot döngüsünde önemli rol oynarlar ve deniz sularındaki önemli nitrik oksitleyicilerdendir [19,20]. Bu iki şubenin, ele alınan diğer mikroorganizmalardan daha az oranda tespit edilmesi ve nekropolün deniz seviyesine çok yakın bir konumda bulunması, nekropolün yerleşim alanı ya da mezarlık olarak kullanılmadan önce sular altında olabileceğini ve zamanla bu deniz suyunun çekilip nekropolün günümüzdeki halini almış olabileceğini düşündürmektedir.

Elde edilen taksonomik verilerin en çarpıcı olanı ise, her örnekte farklı yoğunlukta tespit edilen arke şubesi Euryarchaeota'dır. Dizilemesi yapılan örnekler içerisinde en yüksek Euryarchaeota oranı 1A-453 No'lu mezar hediyesi HTJ 3'te görüldü (Tablo 6). Euryarchaeota, yüksek sıcaklık değerlerinde, tuz oranı yüksek ortamlarda ya da pH değeri çok düşük ortamlarda görülebilmektedir. Bu nedenle bu şubede, termofilik ve asidofilik türler bulundurmaktadır [21]. Arkeolojik bulgulara bakıldığında ise bu mezarın bir kremasyon mezar olduğu görülmektedir. Euryarchaeota şubesinin termofilik olması ve mezarın gömü çeşidinin kremasyon olması, iki farklı disiplinden elde edilen bulguların birbirini desteklediğini gösterir niteliktedir. Diğer bir kremasyon mezar olan 486 No'lu mezara ait mezar hediyesi HUI 5'te tespit edilen Euryarchaeota, o örnek içerisinde yüksek oranda görülen şubeler arasındadır (Tablo 13). Kremasyon olmayan 5A-480 No'lu (Tablo 10) ve 7A-487 No'lu (Tablo 12) mezarların iskelet seviyesi örneklerinde de, diğer örneklerle kıyasla yüksek oranda Euryarchaeota tespit edildi. Bu bulgu ise, bu iki mezarın üst seviyesinde ya da yakınlarında kremasyon mezar olabileceği ya da çıkabileceği ihtimalini düşündürmektedir.

Elde edilen taksonomik sonuçlarda alem basamağında tespit edilen mikroorganizmaların, 1-A 453 HTJ 3 örneğinde %0.72'sinin, 2A-Kuzeydoğu Genişleme V Pithos örneğinde %0.43'ünün, 3Y-490 iskelet seviyesi örneğinde %0.14'ünün, 4A-493 iskelet seviyesi örneğinde %0.28'inin, 5A-480 iskelet seviyesi örneğinde %0.45'inin, 6A-486 iskelet seviyesi örneğinde %0.15'inin, 7A-487 iskelet seviyesi örneğinde %0.56'sının, 8A-486 HUI 5 örneğinde %0.3'ünün kullanılan veri tabanında (Greengenes 13.8) kayıtlı mikroorganizmalardan herhangi biriyle eşleşmediği görüldü (Tablo 6 - Tablo 13). Metagenomik çalışmalarla elde edilen verilerin, mevcut veri tabanlarına katkı sunması, yeni keşfedilecek mikroorganizmalarla bu veri tabanlarında tanımlanamayan mikroorganizmaların oranlarını azaltması beklenmektedir.

Bu çalışma kapsamında, Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolünün mikrobiyal çeşitliliği tespit edildi. Tez kapsamında elde edilen bulgular, arkeolojik bulguları destekler niteliktedir. Antandros Antik Kenti nekropolünün mikrobiyal çeşitliliğinin daha geniş bir perspektifle anlaşılması için, bu alanda yeni metagenomik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alanda yapılacak olan metagenomik çalışmalar sayesinde, elde edilecek yeni verilerle bölgenin geçmişine dair daha kapsamlı çıkarımların yapılması mümkün olacaktır. Bununla birlikte, mevcut veritabanlarında tanımlanamayan yeni mikroorganizmaların keşfine olanak sağlayacaktır. Bu çalışma, Türkiye'deki antik kentlerin mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi için yapılan ilk metagenomik çalışmadır ve bu alanda yapılacak yeni çalışmalara öncü olacak niteliktedir.

Teşekkür

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 22680 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Projeye sunduğu katkılardan ve verdiği desteklerden dolayı İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve Antandros Antik Kenti kazı ekibine teşekkür ederiz.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Polat, G. 2002. Antandros 2001 Kazıları. 24. Kazı Sonuçları Toplantısı, 27-31 Mayıs, Ankara, T.C. Kültür Bakanlığı Yayınları, 21-30.
- [2] Yağız, K. 2009. Antandros nekropolisi hellenistik dönem mezar tipleri. Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 2(2), 136-144.
- [3] Rivera-Perez, J. I., Santiago-Rodriguez, T. M., Toranzos G. A. 2016. Paleomicrobiology: a snapshot of ancient microbes and approaches to forensic microbiology. Microbiology Spectrum, 4(4), 1-14.
- [4] Kolbert, C., Persing, D. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. Current Opinion in Microbiology, 2, 299-305.
- [5] Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A., Versalovic, J. 2009. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. Clinical Chemistry, 55(5), 856-866.
- [6] Alves, L. F., Westmann, C. A., Lovate, G. L., Siqueira, G. M. V., Borelli, T. C., Guazzaroni, M. E. 2018. Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science. International Journal of Genomics, 1-15.
- [7] Culligan, E. P., Sleator, R. D., Marchesi J. R., Hill C. 2014. Metagenomics and Novel Gene Discovery. Virulence, 5(3), 399-412.
- [8] Oulas, A., Pavludi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C., Iliopoulos, I. 2015. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. Libertas Academica, 9, 75-88.
- [9] Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, G. J., Knight, R. 2011. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. Current Protocols in Bioinformatics, 36(1), 1-20.
- [10] Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F. O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research, 41(1), 1-11.
- [11] 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf (Erişim Tarihi: 11.04.2019).
- [12] Soil DNA Isolation Plus Kit. <https://norgenbiotek.com/sites/default/files/files/Soil-DNA-Plus-Kit.pdf> (Erişim Tarihi: 06.06.2019).
- [13] Cho, E. J., Leem, S., Kim, S. A., Yang, J., Lee, Y. B., Kim, S. S., Cheong, J. Y., Cho, S. W., Kim, J. W., Kim, S. M., Yoon, J. H., Park, T. 2019. Circulating microbiota-Based metagenomic signature for detection of hepatocellular carcinoma. Scientific Reports, 9(1), 1-8.
- [14] Margesin, R., Siles, J. A., Cajthaml, T., Öhlinger, B., Kistler, E. 2017. Microbiology meets archaeology: soil Microbial communities reveal different human activities at archaic monte iato (Sixth century BC). Microbial Ecology, 73(4), 925-938.
- [15] Kim, D., Hong, S., Kim, Y. T., Ryu, S., Kim, H. B., Lee, J. H. 2018. Metagenomic approach to identifying foodborne pathogens on chinese cabbage. Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(2), 227-235.
- [16] Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., van Sinderen, D. 2007. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71(3), 495-548.
- [17] Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., Gasbarrini, A. 2017. Proteobacteria: a common factor in human diseases. BioMed Research International, 9, 1-7.
- [18] Ward, L. M., Hemp, J., Shih, P. M., McGlynn, S. E., Fischer, W. W., 2018. Evolution of phototrophy in the chloroflexi phylum driven by horizontal gene transfer. Frontiers in Microbiology, 9(260), 1-16.
- [19] Garrity G. M., Holt, J. G. 2001. Phylum BVIII. Nitrospirae phy. nov. ss 451-464. Boone, D. R. et al. (eds.) 2001. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Springer Science+Business Media, New York.

- [20] Fuerst, J. A., Sagulenko E. 2011. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 403–413.
- [21] Euryarchaeota, <http://www.bilimtekNIK.tubitak.gov.tr/sites/default/files/bilgipaket/canlilar/mонера/euryarchaeota.htm> (Erişim Tarihi: 08.05.2019).