

T.C
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

YARASA GUANOSUNDAKİ BAZI MİKROORGANİZMALARIN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YAĞMUR YÜK

ARALIK 2016

Biyoloji Anabilim Dalında Yağmur YÜK tarafından hazırlanan YARASA GUANOSUNDAKİ BAZI MİKROORGANİZMALARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK
Danışman

Jüri Üyeleri:

Başkan : Prof. Dr. Aysun ERGENE

Üye : Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Üye : Doç. Dr. Hikmet TÜRK KATIRCIOĞLU

.... / /

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

YARASA GUANOSUNDAKİ BAZI MİKROORGANİZMALARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YÜK, Yağmur

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Aralık 2016, 53 sayfa

Bu çalışma Mayıs 2015 ve Eylül 2016 tarihleri arasında Kırıkkale’de bulunan bir yapay galeride yaşayan yarasaların guano örneklerinin moleküler ve mikrobiyolojik analizine dayanmaktadır. Tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan guano önemli mikro fauna elemanları barındırmaktadır. Guano örnekleri galeri zemininden falkon tüplerine alınarak laboratuarda -20 °C muhafaza edilmiştir. Yapay galeriden alınan örneklerin DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen bakterilerin gen dizilimleri incelenmiş ve 16S rDNA sekans analizi yapılarak bu bakterilerin moleküler karakterizasyonları tanımlanmıştır. 16S rDNA analizi sonucunda elde edilen izolatlar YA1, YB2 ve YE3 olarak kodlanmıştır. YA1 izolatları ile %100’e yakın oranda *Bacillus simplex* ile homoloji gösterdiği belirlenmiştir. YB2 izolatları ile %100’e yakın oranda *Bacillus cereus*, ve %99’a yakın oranda *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus weihwnstephanensis* ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. YE3 izolatları ile de %100’e yakın oranda *Kurthia gibsonii*, %99 oranında ise *Kurthia sibirica* ile homoloji göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Yarasa, Guano, Bakteri, Türkiye, Mikrobiyoloji, *Bacillus simplex*, *Bacillus cereus*, *Kurthia gibsonii*

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERISTICS OF SOME MICROORGANISMS IN BAT GUANO

YÜK, Yağmur

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

December 2016, 53 pages

This study is based on the molecular and microbiological analysis of bat guano samples that live in an artificial gallery in Kırıkkale between the dates May, 2016 and September, 2016. Guano, widely used in agricultural areas, contains important micro fauna elements. Guano samples were taken from the gallery floor to the falcon tube and kept at -20 °C in the laboratory. DNA isolation of samples from the artificial gallery was made. The obtained gene sequences of bacteria were examined and molecular characterization of these bacteria is described by 16S rDNA sequence analysis. Isolates obtained as a result of 16S rDNA analysis were coded as YA1, YB2 and YE3. YA1 isolates showed nearly 100% homology with *Bacillus simplex*. It was found that YB2 isolates showed nearly 100% homology with *Bacillus cereus* isolates, and nearly 99% homology with *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides* and *Bacillus weihwnstephanensis*. It was also noted that YE3 isolates showed nearly 100% homology with *Kurthia gibsonii* and nearly 99% homology with *Kurthia sibirica*.

Key Words: Bat, Guano, Bacteria, Turkey, Microbiology, *Bacillus simplex*, *Bacillus cereus*, *Kurthia gibsonii*

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince tecrűbesiyle ve bilgisiyle bana yol gűsteren, bana her zaman destek olan ve emek veren danıőman hocam Sayın Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK'a sonsuz teőekkűrlerimi sunarım. Mikrobiyolojik ve molekűler çalıőmalarda destek olan Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye iten teőekkűrlerimi sunarım. Tezle ilgili laboratuvar çalıőmalarına imkân sunan Kırıkkale Ŭniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araőtırmalar Uygulama ve Araőtırma Merkezi (KŬBTUAM) alıőanlarına, tez çalıőmalarım esnasında her konuda yardım eden Murat ÇAKMAK'a, Tuęba SARIÇAM'a ve teknik konularda destek olan Gűl YILDIZ'a teőekkűr ederim. Ayrıca Yűksek Lisans tezim sűresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, çalıőmalarım ve hayatım boyunca her an yanımda olan ve beni sonsuz sevgileriyle kucaklayan bűtűn aile fertlerime baőta babam Okan YŬK, annem Ayőe YŬK, kardeőlerim Aydanur YŬK, Beytullah YŬK ve Enes YŬK'e sonsuz ve iten teőekkűrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yarasaların Genel ve Fiziksel Özellikleri	3
2.1.1. Deri-Kanat Yapısı	3
2.1.2. Ses - Görme	4
2.1.3. Ekolokasyon	5
2.1.4. Burun - Kulak Yapısı	7
2.1.5. Başın Anatomik Yapısı	8
2.1.6. Beslenme Özellikleri	8
2.1.7. Habitatı	9
2.1.8. Üreme Özellikleri	9
2.1.9. Yaşam Süreleri	11
2.1.10. Avları ve Düşmanları	11
2.1.11. Korunması	12
2.1.12. İnsanlar Üzerindeki Etkileri	12
2.2. Yarasaların Sistematığı	12
2.3. Mağara Ekosistemi	13
2.3.1. Mağaraların Sınıflandırılması	13
2.3.2. Mağara Canlılarının Sınıflandırılması	14
2.4. Yarasa Gübresi (Guano)	15
2.5. Bakteri	15

2.5.1. Bakteri Tanımlanmasında Kullanılan Geleneksel Teknikler	17
2.6. Yarasa Guanosunda Bulunan Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler.....	17
2.6.1. 16S rDNA Dizi Analizi	18
2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	19
2.6.3. 16S rDNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları	22
2.6.4. Türlerin Filogenetik Analizi ve Filogenetik Ağacın Oluşturulması....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Kullanılan Besiyeri	24
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar	24
3.1.2.1. Kullanılan Kimyasallar	24
3.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler	25
3.1.2.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler	25
3.1.2.2.1.1. Tris / EDTA Tamponu (250 mL).....	25
3.1.2.2.1.2. %10'luk SDS Tamponu (100 mL)	25
3.1.2.2.1.3 Proteinaz-K'nın Hazırlanması (10 mL)	25
3.1.2.2.1.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 mL)	25
3.1.2.2.1.5. CTAB/NaCl tamponu (100 mL)	26
3.1.2.2.1.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu (100 mL)	26
3.1.2.2.1.7. Kloroform/İzoamil Alkol/Fenol Tamponu (100 ml)	26
3.1.2.2.1.8. İzopropanol Alkol (100 mL)	26
3.1.2.2.1.9. %70'lik Etil Alkol (100 mL)	26
3.1.2.2.1.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 mL)	26
3.1.2.2.1.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL)	27
3.1.2.2.1.12. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlam.....	27
3.1.2.3. PZR Amplifikasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması.....	27
3.2. Yöntem	28

3.2.1. Çalışma Alanı	28
3.2.2. Örneklerin Toplanması	29
3.2.3. Gübrede Bulunan Bakterilerin İzolasyonu Ve Tanımlanması	29
3.3. Koloni Morfolojisi	30
3.4. Hücre Morfolojisi	30
3.5. Bakteriyel Kültürden Genomik DNA İzolasyonu	30
3.6. PCR Amplifikasyonu ve PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	31
3.7. 16S rDNA Sekanslanması ve Bakterilerin Tanımlanması	31
3.8. Filogenetik Soyağaçlarının Oluşturulması	32
4. BULGULAR	33
4.1. Bakterilerin İzolasyonu	33
4.2. Bakterilerin Tanımlanması	33
4.3. YA1 Kodlu Suşun PZR ve 16S rDNA Sekans Analizi	34
4.3.1. YA1 Kodlu Suşun Tanımlanması ve Filogenetik Analiz Sonuçları ...	35
4.4. YB2 Kodlu Suşun PZR ve 16S rDNA Sekans Analizi	38
4.4.1. YB2 Kodlu Suşun Tanımlanması ve Filogenetik Analiz Sonuçları...	38
4.5. YE3 Kodlu Suşun PZR ve 16S rDNA Sekans Analizi	41
4.5.1. YE3 Kodlu Suşun Tanımlanması ve Filogenetik Analiz Sonuçları...	41
5.TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bir yarasada kanadı oluşturan deri yüzeylerinin adları	4
2.2. Yarasalardaki kuyruk ve kuyruk membranı: Rhinolophidae (A), Vespertilionidae (B) ve Molossidae (C)	5
2.3. Rhinolophidae (A), Vespertilionidae (B), Emballonuridae (C), Molossidae (D) familyası yarasaların kulak ve burun yapısı	7
2.4. Yarasalardaki kafatası ve çene iskeleti, Vespertilionidae (A), Rhinolophidae (B)	8
2.5. Canlıların 3 domain halinde düzenlenen sınıflandırması.....	16
2.6. Bakterilerin 16S rDNA sekansına dayalı moleküler tanımlanması	19
2.7. PZR aşamaları	20
3.1. Yarasaların yaşadığı bir galerinin konumu (Sarı Çizgi)	28
3.2. Falcon tüpü ile guano yığınının örnek alınışı	29
4.1. Bakteri kültürlerinin koloni morfolojisi (Tek Koloni)	33
4.2. YA1 izolatının Gram (+) mikroskop görüntüsü	34
4.3. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında YA1 kodlu suşun PZR ürünleri	35
4.4. YA1 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram	36
4.5. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında YB2 kodlu suşun PZR ürünleri	38
4.6. YB2 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram	39
4.7. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında YE3 kodlu suşun PZR ürünleri.....	41
4.8. YE3 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendogram	42

ÇİZELGE DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler ve özellikleri	27
4.1. YA1 kodlu suşun 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri.....	37
4.2. YB2 kodlu suşun 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	40
4.3. YE3 kodlu suşun 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ	Mikro
dNTP	Deoksinükleotittri fosfat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
MgCl ₂	Magnezyum klorür
°C	Santigrat derece
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DFP	Diizopropilflorofosfat
dNTP	Deoksinükleotit Trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
kDa	Kilo Dalton
pmol	Pikomol
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat

1. GİRİŞ

Koloni oluşturan yarasaların, bazı deniz kuşları ve fok gibi bazı memeli hayvanların dışkıları uzun yıllar birikerek guano denilen gübre yığınlarını oluşturur. Yarasalar mağara ekosisteminin dominant hayvanları olup tünelerinde oluşan guanolar tarım alanlarında kullanılmaktadır. Gübre mikrobiyolojik reaksiyonlar sonucu azot gibi elementlerin artışı sağlamakta ve onlarca hatta binlerce yıl adeta taşlaşarak oluşan guanolar verimli birer maden haline gelmektedir.

Guano içeriği elementlerce çok zengin bir madde olduğu için farklı alanlarda kullanılmaktadır. Azot ve fosfor gibi elementler nedeniyle de bazı patlayıcı maddelerin yapımı da mümkün olmaktadır. Bunun yanında içerisinde bakteriler ile endüstriyel atıkların zehirli etkisi guano ile yok olmaktadır (İlker ve Albayrak, 2013).

Guano, Güney Amerika'da çok eski Peru medeniyetlerinde tarım yapılan alanlarda kullanılmıştır. Bu anlamda İnka medeniyetinde guano bir maden olarak değer bulmuştur. Alexander von Humboldt (1804) Güney Amerika'dan Avrupa'ya dönerken yanında kuş guanosu getirmiştir. Daha sonra guano İngiliz çiftliklerinde aranan bir ürün haline gelmiştir (Anonim, 1). Dünyada guano ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Böcek yiyen yarasaların beslenme özelliklerini belirlemek için *Myotis lucifugus* (kahverengi yarasa) türü 15 böcek türü ile beslenmiştir. Bu yarasaların guanoları toplanarak analizi yapılmıştır (Thomas ve ark., 1983). Yarasa guanosundaki azot, sodyum, kalsiyum, magnezyum, demir ve potasyum düzeyleri yaz mevsiminde analiz edilmiştir (Studier ve ark., 1991). Japonya'da yarasa tüneğinden alınan guano örneklerinden 9 farklı *Trichosporon species* izole etmişlerdir (Sugita ve ark., 2005). Beş bitki türünde büyümeye yönelik yapılan araştırmada yarasa guanosu kullanılmış ve bu bitkilerde etkili bir büyümenin olduğu görülmüştür (Sothearen ve ark., 2014).

Türkiye'de Adana, Kırklareli, Aydın ve Çorum'daki bazı mağaralardan alınan yarasa guano numunelerinin analizi sonucu başta N, P, K olmak üzere Ca, Mg, Cl, Na ve Fe elementleri tespit edilmiştir ve N, Mg, Fe, Cu, Pb ve organik madde yönünden bazı farklılıklar kaydedilmiştir (Altıntaş ve ark., 2005).

Balıkesir Havran'da yarasalar için inşa edilen bir mağaraya ikinci yıl üreme amacıyla gelen ve koloni oluşturan Vespertilionidae familyası mensubu *Myotis myotis* ve *Myotis blythii* türlerinin gübresi analiz edilerek bazı ekolojik parametre ve element değerleri kaydedilmiştir (Albayrak, 2012).

Bu çalışmanın amacı; yarasa guanosunun mikrobiyolojik yönden incelenmesi ve yarasa gübresinde hangi tür bakterilerin bulunduğunu tespit etmektir. Bu anlamda bazı bileşiklerin indirgenmesinde veya bileşiklerin oluşumunda rol oynayan bakterilerin kimliğinin belirlenmesi de bu araştırmanın diğer amacını oluşturmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yarasaların Genel ve Fiziksel Özellikleri

Hayvanlar (Animalia) âleminde, memeliler (Mammalia) en son sınıf olarak yer almaktadır. Memeliler (Mammalia) sınıfında uçuş özelliğini gerçek anlamda gösteren tek takım yarasalardır. Yarasalar (Chiroptera)'ın şubesi, Kordalılar (Chordata)'a aittir. Yarasalar Yunanca alfabesinden alınan Cheiros (el) ve Pteros (kanat) kelimelerinden türetilmiştir. Bununla beraber “eli kanatlılar” diye tabir edilen “Chiroptera” olarak bilinirler (Albayrak, 2000).

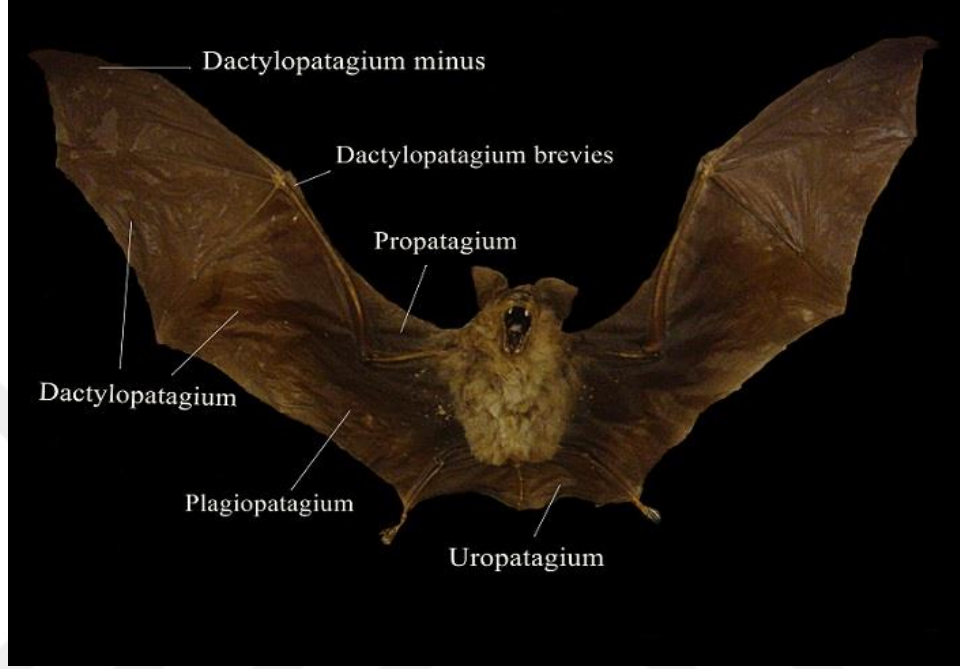
Yarasaların uçabilme yeteneklerini 3. zamanın Eosen alt devrinde kazandıkları varsayılmış olmakla birlikte uçuş yetenekleri bakımından kendilerine benzer canlı olan Dermoptera (uçan lemurlar) üyelerinden farklı hatlar halinde geliştikleri öne sürülmektedir (Albayrak, 2000). Yarasalar bu uçuş özelliklerini metacarpus ve ön üyelerindeki parmak kemiklerinin uzaması sonucu kazanmıştır. Yarasa kanat yapıları kuşlardaki gibi değişim geçirmiş ön kollardır. Fakat kuş kanadındaki tüylere karşılık, yarasa kanadı çıplak deriden ibarettir (Hill ve Smith, 1984).

Yarasaların esnek yapıda olan uçuş derisi ikinci ve beşinci parmakların ara kısmında gergin şekilde bulunmaktadır. Kısa ve serbest halde bulunan birinci bazen de ikinci parmağın uç kısmında tırnak vardır. Yarasa göğüs kafesleri oldukça sağlam ve dayanıklıdır. Yarasa özellikle arka bacakları ince ve kısadır, baş aşağı durmalarını sağlayan uzun kıvrık tırnakları vardır (Hill ve Smith, 1984).

2.1.1. Deri-Kanat Yapısı

Yarasaların dakikada kanat çırpma sayısı büyük türlerde 10-12, bu sayı küçük türlerde 80'i bulmaktadır. Yarasalarda uçuşu hızlı olan türlerde kanat ince ve uzun, yavaş olan türlerde ise geniştir. Yarasa deri sistemi ve uçuşu sağlayan kanat yapısı farklıdır. Bu deri sistemi ile meydana gelen kanat yapısı türlere göre farklılık gösterir. Başparmak deri dışında olup serbesttir. Ön üyede kanat 2. ve 5. parmak arasında ve 5. parmakla vücut arasında kalan deri parçalarıdır. Bu parçalar

propatagium, chirapatagium, plagiopatagium, uropatagium olarak adlandırılır (Şekil 2.1).

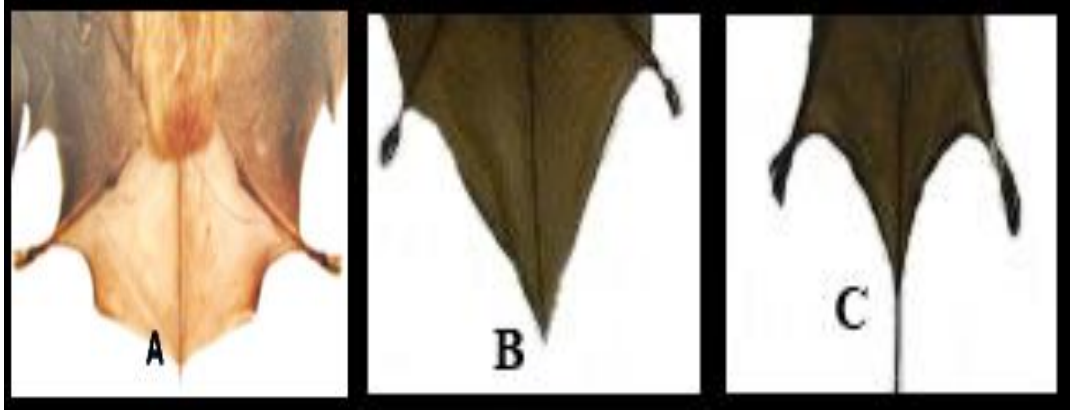


Şekil 2.1. Bir yarasada kanadı oluşturan deri yüzeylerinin adları (Foto: Y. YÜK)

Propatagium ön kola doğru uzanmakta olup boyundan başparmağa kadar uzanır. Chiropatagium başparmaktan beşinci parmağa kadar uzanmakta olup her parmak arasında farklı isimlendirilmiştir. Plagiopatagium, beşinci parmaktan vücudun yan kısmına, sırtın orta kısmına ve bacağın arka tarafına uzanır. Uropatagium arka iki bacak arasına uzanmakta olup kuyruğu da içine almıştır (Şekil 2.2).

2.1.2. Ses - Görme

Yarasalarda geniş bir ses spektrumu vardır. Bazı düşük frekanslı mırıldanma sesleri her zaman aktif kolonilerden duyulur. Bu sesler akşamüzeri dışarı çıkıştan önce yoğun olarak ortaya çıkar. Bu seslerin fiziği üzerinde çok az çalışma yapılmıştır (Griffin, 1958). Ekolokasyon sesleri çok dikkatli şekilde çıkarılırken yer bulma seslerinde aynı hassasiyet gösterilmeyebilir.



Şekil 2.2. Yarasalardaki kuyruk ve kuyruk membranı: Rhinolophidae (A), Vespertilionidae (B) ve Molossidae (C) (Foto: Y. YÜK)

Megachiroptera mensubu meyve ile beslenen yarasalar gözleri diğer gececil canlı türlerde olduğu gibi büyük ve gelişmiştir. Gözleri gelişmiş olmasına rağmen geceleri yönlerini saptayamazlar. Büyük yarasalar hafif karanlık yerlerde daha aktiftir. Microchiroptera mensubu böcekler ile beslenen yarasaların gözleri küçüktür. Bazı türlerinin toplu iğnenin başı kadar gözü olmasına rağmen çok karanlık olan gecelerde dahi gözleri rahatlıkla görmekte ve uçan böcekleri yakalayarak beslenmektedir.

2.1.3. Ekolokasyon

Yüzyıl önceye dayanan yarasaların ekolokasyon sistemine ait deneyi gerçekleştiren İtalyan Spallanzani, bir odaya dikey olarak gerdiği birçok iplik arasına bıraktığı böcek yiyen yarasaların bu ipliklere hiç çarpmadan çok rahat bir şekilde uçtuklarını gözlemlemiştir. Yarasaların gözlerini kapattığında da bu iplerle gerili ortamdaki uçuş yeteneklerinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Fakat yarasaların kulakları kapatıldığında gergin iplere çarparak yere düştükleri gözlemlenmiştir. Spallazzi'nin deneyinden sonra 1930 yılında Dijkgraaf ve Griffin Spallanzani'ye göre daha teknolojik yöntemler kullanarak deney gerçekleştirmişlerdir. Kullandıkları teknikler sayesinde böcek ile beslenen yarasaların yüksek frekanslı ses dalgaları oluşturdukları anlaşılmıştır (Corcoron ve Conner, 2014).

Yarasalar ağızları açık uçarken, ses sinyallerini verir. Bazı yarasalar bu sesleri burun deliklerinden bazıları ağız ve bazıları da burun ve ağızdan birlikte verir. Yüksek frekanslı ses dalgaları etraftaki cisimlere çarparak geri yansır ve yarasa kulakları bu dalgaları alarak beyinde cismin yeri saptanır. Yarasadaki bu sistem yani ekolokasyon mekanizması bir nevi sonar sistemine benzer (Demirsoy ve ark., 2000). Bu algılama mekanizması “şekli duyma” olarak da tabir edilebilir. Zira geriye doğru yansıyan ses dalgalarıyla yarasa cismin büyüklüğü, yeri, şekli gibi özellikleri de anında saptar.

Yarasalar bu ses yankı sistemine sahip olduklarından canlı radar olarak da nitelendirilir. Yarasalar bu yüzden gözle görme yerine daha çok radar sistemini kullanır. Yarasalar yüksek frekanslı saniyede 20.000 - 160.000 kez titreşim oluşturur. Titreşimler yani frekanslar Microchiroptera mensubu türler arasında ve türler içinde farklılık gösterir. Örneğin; Vespertilionidae 30.000 ile 100.000 arasında kısa dalgalı sesler meydana getirir. Yarasa seslerinin özelliği, kabiliyeti, frekansı, şekli, değişik mesafelerden üretilen ekolar belirler (Hill ve Smith, 1984).

Farklı ekolokasyonlara sahip farklı türlerin, farklı habitatlarda yaşama ve farklı türlerle beslenme davranışları ortaya çıkmaktadır (Hill ve Smith, 1984). Ekolokasyon davranışında yarasalar birbirlerinin seslerini duyabiliyor ya da anlayabiliyorlar. Ancak yarasaların tür içindeki farklılık gösteren sesleri de vardır. Örneğin; bu sesler anne yavru iletişimde ya da çiftleşme döneminde de kullanılabilir (Koopman, 1994). Yarasaların ekolokasyon sistemi his organıyla kontrol edilmektedir. Bu ekolokasyon sisteminin benzeri olan sonar ve radar sistemi bundan esinlenerek geliştirilmiştir. Yarasaların sonar ve radar sistemine göre bir milyar kez hala hassas ve etkili olduğu ifade edilmektedir (Boynukara ve ark., 2013).

Yarasalardaki ekolokasyon özelliği çok önemli bir yaşam stratejisidir. Bütün Microchiroptera türleri kuvvetli bir şekilde yön bulma ve besin arayışlarını ekolokasyon ile gerçekleştirmektedir. Ekolokasyon ve görme arasındaki işlevsel fark, ekolokasyon algısının aktif ve görme algısının pasif olmasından kaynaklanmaktadır. Görme algısı birçok canlıda olduğu gibi ışık enerjisine bağlıdır, fakat ekolokasyon hayvanların kendileri tarafından sağlanır. Yarasalar avlarının yerini tespit ederken örneğin; böceklerin kum üzerinde yürümesi, kurbağaların ses çıkarmaları gibi seslerde olduğu gibi av kaynaklı sese bağlı olarak “pasif ekolokasyon” kullanırlar (Vaughan ve ark., 2000).

Memelilerde olan feromon ve koku belirteçleri yarasalarda da önemli bir yere sahiptir. Koku belirteci üreme durumunda ya da yarasa grubunu tanımada kullanılır. Yarasaların bazı türleri özelleşmiş koku bezlerine sahiptir. Örneğin; Emballonuridae familyası mensupları “kese kanatlı yarasalar” adını almaktadır. Bunun sebebi ise bir koku kesesinin bulunmasıdır (Behr ve ark., 2004).

2.1.4. Burun - Kulak Yapısı

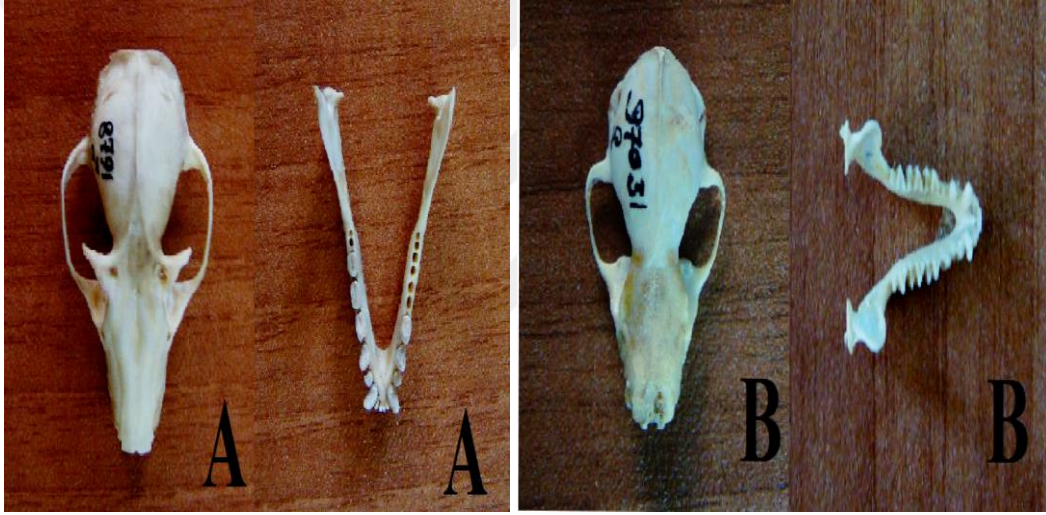
Yarasa familyalarının karakteristik burun ve kulak yapıları vardır. Bazı yarasa familyalarında “tragus” yapısı bulunmaktadır. Tragus bulunmayan familyalar Rhinolophidae ve Pteropodidae’dir. Tragusu bulunmayan türlerde antitragus bulunmaktadır. Bazı türlerde ise yarasaların kulakları birbirine yapışıktır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Rhinolophidae (A), Vespertilionidae (B), Emballonuridae (C), Molossidae (D) familyası yarasaların kulak ve burun yapısı (Boynukara ve ark., 2014)

2.1.5. Başın Anatomik Yapısı

Yarasalarda kafatası yapısı, kuşların kafatası yapısına göre daha narindir. Yarasaaların bazı türleri hariç ergin bireylerde kafatası kemikleri birbirine kaynaşmıştır. Megachiroptera'da kafatası premaksiller gevşek, bağlantılı veya kaynaşmıştır. Microchiroptera alt takımında ise premaksiller gevşek, hareketli veya kaynaşmıştır. Yarasaaların çenelerinin kuvvetli ve sert besin parçaları ile beslenenler (sert meyve, sert kabuklu böcekler) daha kuvvetli ve kısa çeneye sahiptir. Yumuřak besin ile beslenenler (nektar, kelebek, olgun meyve vb.) zayıf ve uzun çeneye sahiptir (Koopman, 1994) (şekil 2.4).



şekil 2.4. Yarasalardaki kafatası ve çene iskeleti; Vespertilionidae (A), Rhinolophidae (B) (Foto: Y.YK)

2.1.6. Beslenme zellikleri

Microchiroptera bu alt takım besinlerini uçarken yakalarlar (Kuru, 1987). Microchiroptera türleri besin kaynaklarına göre farklılaşmışlardır. Bazı türler eil, bazıları sürüngenler, balıklar ve kuşlar üzerinden beslenmektedirler (Vaughan ve ark., 2000). Besin bulamadıkları durumda meyve ile beslenirler. Balık ile beslenenler uzun arka bacaklarını suya batırarak besinlerini yakalarlar. Kışın yiyecek bulma noktasında sıkıntı ekeceklerinden kış uykusuna yatarlar. Yaz günleri de çok sıcak

olduğunda uykuya dalarlar tıpkı kışın olduğu gibi metabolizmaları yavaşlar. Bunun sebebi enerji kaybını önlemektir (Kuru, 1987).

Yarasa türleri içinde çok ilginç olan üç tür vampir yarasalar sadece omurgalıların kanı ile beslenir. Vampir yarasalar dişleri ile avlarının derilerinde kesik meydana getirerek kan emerler. Vampir yarasaların ikisi, *Diaemus youngi* ve *Diphylla ecaudata*'nın kuşlar üzerinden kan emme özelliği gelişmiştir. Diğer tür, *Desmodus rotundus* memeli kanı emer. Memelilerden kan emen *Desmodus rotundus* yaygın vampir yarasa türüdür. Vampir yarasalar Neotropiklerde bulunur. Yarasa türlerinden biri olan *Mystacina tuberculata* Yeni Zelanda küçük kısa kuyruklu yarasa, hem etçil hem de otçul olarak beslenir (Vaughan ve ark., 2000). Bunun dışında böceklerle beslenen Microchiroptera mensubu yarasalar, özellikle sıtma hastalığının taşıyıcısı olan sivrisineklerle ve daha birçok zararlı böceklerle beslenerek bu böceklerin çoğalmasını önler ve böylece doğal dengenin korunmasında rol alır (Hill ve Smith, 1984).

2.1.7. Habitatı

Yarasalar genellikle tropikal ormanlar, çöller, açık araziler ve yerleşim yerleri gibi farklı karasal habitatlarda yaşar. Yarasalar kutup bölgelerinde yoktur. Yarasalar beslenmede olduğu gibi yaşam alanlarının tercihinde de çeşitlik gösterirler (Vaughan ve ark., 2000). Yarasa türleri barınak durumuna göre de farklılık gösterirler ve kütük altları ağaç kovukları gibi yerlerde de faaliyet gösterip tünerebilirler. Ayrıca yarasalar farklı zamanlarda farklı barınma yöntemini kullanabilirler. Örneğin; herhangi bir tür kış döneminde mağarada hibernasyonu geçirmekte iken, sıcak aylarda ağaç kovuklarındaki yarıklara tüneler.

2.1.8. Üreme Özellikleri

Yarasaların beslenme özelliklerinde olduğu gibi çiftleşme özellikleri de türlere göre farklılık göstermektedir. Birçok yarasa mevsime göre üreme göstermektedir. Yarasalar hibernasyon öncesi çiftleşmekteyken tropikal bölgelerde yaşayan yarasa türleri ise mevsime göre üreme göstermektedir. Mevsimlere göre üremeyen yarasalar tropiklerde yaşarlar ve üreme çeşitliliği ılıman bölgelerde

yaşayanlar kadar farklılık göstermemektedir. Mevsimsel üremenin bir başka faydası ise bazı türler karmaşık olan üreme fizyolojisini yani sperm depolama, yumurtlamanın geciktirilmesi, döllenenin geciktirilmesi gibi gelişimler göstermiştir (Hill ve Smith, 1984).

Yarasaların çoğunlukla üreme mevsimleri sonbahar ve ilkbahar dönemlerinde gerçekleşmektedir. Yarasaların sonbahardaki üremeleri sonucu zigot meydana gelmez ve sperm dışının fallopi borusunda saklanır. Devamında ilkbaharda bu sperm, zigotu meydana getirmek üzere aktif olurlar. Sonbaharda çiftleşme potansiyeli olan fakat çiftleşmeyen erkek bireylerin spermeleri epididimiste saklanır ve müteakip çiftleşme periyodunda bu sperm kullanılır. Yarasalarda gebelik süresi bir ile iki ay arasında değişim göstermektedir. Yarasaların kendileri arasında değişim gösteren bir başka özellik ise, çoğu sene içerisinde bir yavru meydana getirirken bazıları sürekli olarak ikiz yavru meydana getirir (Albayrak, 2000).

Microchiroptera mensubu olan erkek bireylerden bir ya da iki tanesi dişilerden oluşan bir haremde savunmasını yapmaktadır. Erkek bireyler haremde bulunan dişiler ile çiftleşme dönemlerini ve korumalarını bir başka erkek bireye gelene kadar sürdürmektedirler (Hill ve Smith, 1984). Yarasaların bazı türleri rastgele çiftleşirken, bir kısmı çok eşli olarak çiftleşmektedir. Buna rağmen tek eşli olan yarasalar türleri de vardır. Megachiroptera mensubu olan *Hypsignatus monstrosus* türü kur yaparak çiftleşme yapmaktadır. Çiftleşme yapacak olan erkek bireyler boş bir alanda toplanarak dişi bireylere kur yaparlar ve dişi en fazla istediği erkek bireyi çiftleşmek için seçer (Hill ve Smith, 1984).

Yarasalar memeye sahiptir ve yavrularını süt ile besler. Yeni doğan bireyler hızlı bir gelişim süresi gösterdiğinden emme dönemleri kısa sürmekte olsa da metabolik olarak ihtiyaçları devam etmektedir (Hill ve Smith, 1984). Erkek ve dişi bireyler sadece çiftleşme zamanı bir araya gelirler ve çiftleşme bittikten sonra erkek dişiye terk eder. Erkek bireyler korunmasına ve beslenmesine katkı bulunmak dışında diğer tüm bakım dişiler tarafından yapılmaktadır. Yeni doğan yavru uçuş yeteneğine sahip değildir. Bundan ötürü yavru uçuş yeteneğine iki ya da dört hafta içerisinde kavuşur. Yavru yarasalar uçuşmaya başlayana kadarki dönemde annelerine yapışık halde uçarlar ya da tüneklerinde kalırlar (Nowak, 1983).

Yarasaların bir diğer önemli özelliği ise sosyal hayvanlar olmalarıdır. Sosyal olarak adlandırılmasının sebebi dişi yarasalar doğum yaparken yakınlarındaki diğer dişi

yarasalar ona yardım ederler. Bu yardımlaşma insanlar ve yarasalar haricinde başka hiçbir canlıda görülmez.

2.1.9. Yaşam Süreleri

Memelilerin ömür uzunlukları, küçük ve büyük memeli türlerine göre farklılık göstermekte olup çoğu memelilerde yaşam süresi vücut büyüklüğü ile doğru orantılı iken yarasalarda ters orantılı olarak tespit edilmiştir. Buna göre küçük bir yarasa türü daha büyük bir yarasa türünden daha fazla yaşamaktadır (Wilkinson ve ark., 2002). Yarasaların yaklaşık 20 yıl ömür uzunlukları vardır. Ancak *Myotis luciferus*, en fazla yaşayan bir tür olarak tespit edilmiştir. Bu anlamda işaretlenen birey 33 yıl aradan sonra tekrar yakalanmıştır (Kurta, 1995).

2.1.10. Avları ve Düşmanları

Yarasalar genelde geceleri uçarak böcekleri avlayan bir avcıdır. Yarasaların en büyük besin kaynağını Chrysopidae, Hemerobiidae, Dictyopterous, Dipterous türü mensubu böcek ve sivrisinekler oluşturmaktadır. Örneğin; tek başına büyük kahverengi bir yarasa, bir gecede 3000 ile 7000 arasında sivrisinek yiyebilmektedir (Alp, 2009).

Yarasaların avladığı hayvanlar olduğu gibi yarasaları da avlayan hayvanlar vardır. Yarasaları avlayan türler baykuş, avcı kuşlar, yılan ve bazı etçil türlerdir. Yılan ve baykuş gibi avcı türler yarasa tüneklerinin girişinde bekleyerek dışarı çıkan yarasaları ustalıkla avlar. Bazı yarasa türleri de diğer yarasa türleri üzerinden beslenmektedir. Bu yarasalar; Yeni Dünya mensubu olan *Vampyrum spectrum* ve *Chrotopterus auritus* ve Megaderma cinsindeki iki Eski Dünya türleridir (Hill ve Smith, 1984).

2.1.11. Korunması

Vampir yarasalar yüzünden tüm yarasa türlerinin kan emen yarasalar olduğu inancının aksine, yarasalar sıra dışı özelliklere sahip, zararsız ve oldukça sosyal hayvanlardır. Uluslararası Doğa Koruma Birliği (IUCN) yarasaların sayılarının hızla azalmasının önlenmesi için çok önemli adımlar atılmasının gereğini vurgulamaktadır. Dünyadaki 1165 yarasa türünün yaklaşık dörtte birinin tehdit altında olduğu kabul edilmektedir. Bugüne kadar 12 yarasa türünün yok olduğu rapor edilmiştir. Yarasa popülasyonunun azalmasının başlıca sebepleri habitatlarının tahrip edilmesi, tünük yerlerinin yok edilmesi ve insanlar tarafından sürekli taciz edilmesidir. Bunun önlenmesi için yarasaların doğal yaşam alanlarının koruma altına alınması kaydedilmektedir (Jones ve ark., 2003). Diğer yandan insan girişlerini önlemek amacıyla mağara girişlerinin yarasaların geçebileceği aralıklara sahip demir parmaklıklarla kapatılması giderek yaygınlaşmıştır (Fenton, 1997).

2.1.12. İnsanlar Üzerindeki Etkileri

Yarasaların, diğer hayvanlarda olduğu gibi kuduz virüsü taşıyan bazı türleri vardır. Vampir yarasalar sığırlara hastalık bulaştırdığından sığır yetiştiricileri için büyük bir risk oluşturmaktadır (Vaughan ve ark., 2000). Diğer yandan yarasalar iç ve dış parazit taşıyıcılarıdır ve ayrıca sıtmaya neden olan bazı bir hücreli canlıların da barınağıdır (Hill ve Smith, 1984).

2.2. Yarasaların Sistematigi

Yarasalar memeliler sınıfında yer almaktadır. Memelilerin ilk sıradaki takımı 2272 türle Rodentia (kemiriciler)'dir (Albayrak, 2015). İkinci sırada 5116 türle Chiroptera (yarasalar) gelmektedir. Bu da memeli türlerinin %20'sini gerçek uçuş özelliği gösteren yarasalar oluşturur demektir. Yarasalar (Chiroptera) dünya üzerinde 202 cins ve 1116 tür ile temsil edilmektedir (Wilson ve Reeder, 2005).

Yarasalar büyük yarasalar (Megachiroptera) ve küçük yarasalar (Microchiroptera) olmak üzere iki alttakımı oluşturur (Vaughan ve ark., 2000). Yarasalar daha önceki yıllarda yapılan araştırmalarda Pteropodidae familyası

mensubu olan Megachiroptera'nın Microchiroptera'dan ziyade primatlarla kardeş olduğu yorumu yapılmıştır. Bunun konu edilmesinin altında yatan neden ise bu iki grubun yani Primatlar ve Megachiroptera'nın morfolojik olarak birbirine yakınlık göstermesidir. Bu hipotez vücutta bulunan moleküler düzeydeki araştırmalar ile çürümüştür (Telling ve ark., 2001). Yarasaların tek ve ortak bir atadan evrimleştiğini göstermektedir. Yarasaların en son karar verilen iki alt takımı doğrusal olarak bir soy ağacı göstermiş olmalarına rağmen aralarında bazı ekolojik farklar vardır (Van den Bussche ve ark., 2004).

2.3. Mağara Ekosistemi

Mağaralar karanlık, yüksek nem ve düşük sıcaklık gibi özelliklere sahiptir ve çevremizde gördüğümüz diğer ekosistemlerden farklı özellikler taşır. Mağaralar hassas ekosistemler oldukları için, dış kaynaklı etkilerle daha çok tahrip olur. Mağaralar jeolojik, coğrafik, speleolojik olarak 3 farklı şekilde tanımlanır. Coğrafik olarak mağaralar insanların geçmişinde barınak olarak kullanılan insanların yaşayabileceği kayaç kovuklarıdır. Jeolojik olarak tanım; karst bölgelerinde kireç taşlarının erimesiyle oluşan birbirine bağlı büyük yer kovuklarıdır. Speleologlara göre ise mağaralar, en az bir insanın sürünerek dahi olsa geçebileceği genişlikte ve yükseklikte olan yer altı boşluklarıdır (Ozansoy ve Mengi, 2006).

2.3.1. Mağaraların Sınıflandırılması

Mağaralar fiziki yapısı itibariyle yapay, yarı doğal ve doğal mağaralar olarak üç sınıfa ayrılmıştır.

- a) Yapay mağaralar: Bu tip mağaralar insanlar tarafından yapılmıştır. Örneğin; barınak, sığınak, ibadethane, mezar yeri
- b) Yarı doğal mağaralar: Doğal mağaraların insanlar tarafından kendi ihtiyaçlarını kullanmak üzere modifiye edilmiş hali
- c) Doğal mağaralar: Kayaçlarda belirli doğal etkenler sonucu oluşan boşluklar

2.3.2. Mağara Canlılarının Sınıflandırılması

Mağaralarda yaşayan ve mağaraları kullanan canlılar da kendi aralarında belirli derecelere göre sınıflandırılmıştır. Mağarada yaşayan canlılar; gölge hayvanları, alacakaranlık hayvanları, karanlık zon hayvanları ve sarkıtların üzerinde yaşayan hayvanlar olmak üzere dört gruba ayrılır (Schiödt, 1849). Daha sonraları bu sınıflandırılma mağarada yaşayan canlıların mağaralara bağımlılık derecesi nispetinde değiştirilmiştir. Yeni sınıflandırılmada; Troglobit, Troglofil ve Trogloksen olarak adlandırılmıştır (Schiner, 1854).

Mağaraların sucul canlıları için yapılan sınıflandırmaya göre Stygobit, Stygofil ve Stygoksen olarak üç grup ayırt edilmiştir (Poulson ve White, 1969). Troglobit (zorunlu-gerçek mağara canlıları) canlılar: Troglobit canlılar, mağara dışına çıkmayan ve mağaraya tamamen bağımlı olarak yaşayan yarası gibi canlılardır (Schiner, 1854). Bu grubun suda yaşayanları ise Stygobit olarak adlandırılır (Poulson ve White 1969). Troglofil (mağara sevenler) canlılar: Troglofil canlılar yaşam döngülerini mağara içerisinde tamamlarlar. Mağara dışında yeryüzünde de, yaşam alanlarına yakın çevre koşullarında da yaşayabilme özelliği göstermektedirler. Bu yüzden “mağara seven canlılar” olarak gruplandırılmıştır (Schiner, 1854). Bu canlı grubunun suda yaşayanları ise Stygofil olarak adlandırılmıştır. Bu gruba örnek olarak mağara çekirgeleri ve birçok böcek türü örnek verilebilir (Poulson ve White 1969). Trogloksen (mağara ziyaretçileri) canlılar: Trogloksen olarak adlandırılan canlı grubu hem yeryüzünde hem de mağaraların giriş zonlarında yaşamsal faaliyetlerini gösterirler. Dış ortama bağımlı olarak yaşadıklarından “mağara seven canlılar” olarak gruplandırılmıştır (Schiner, 1854). Bu canlı grubunun suda yaşayanları ise Stygoksen olarak adlandırılmıştır. Bu gruba örnek olarak kış uykusu için mağaraları kullanan ayılar verilebilir (Poulson ve White 1969).

Mağaralarda yaşayan canlılar genel olarak ise; bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve bakterilerdir. Bitkiler; yosunlar, ciğer otları gibi nemli yerlerde büyümeye elverişli olanlar yaşamaktadır. Hayvanlar ise; omurgalı hayvanlar arasında en fazla adapte olmuş canlı yarasalardır. Yarasaların dışında ise kuşlar, sürüngenler gibi hayvanlar da vardır (Yamaç, 2003). Mağaralarda omurgalı hayvanlar kadar omurgasız hayvanlar da bulunmaktadır. Mantarlar, mağarada saprofit ve patojen

olarak yaşamaktadır. Bundan dolayı mağara ekosisteminde etkili olmaktadır. Mantarlar diğer mağara canlıları üzerinde parazit olarak yaşarlar (Nieves-Rivera, 2003). Bakteriler ise iki şekilde nitelendirilir. Bunlar geçici ve kalıcı bakterilerdir. Geçici olan bakteriler rüzgâr yani hava akımı, su akıntısı, yarasa ve böcekler gibi çeşitli yollarla taşınarak girerler. Kalıcı olan bakteriler ise, mağaranın doğal canlılarıdır. Yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri için dış ortamdan besin kaynaklarına ihtiyaçları yoktur (Yamaç, 2003).

2.4. Yarasa Gübresi (Guano)

Tarım en temel ihtiyaç olan ve canlılığın devam etmesi için gerekli olan beslenmenin sağlanması için çok büyük bir önem arz etmektedir. Organik ürünlerin üretimine başlanması kimyasalların uzak tutularak tarım çalışmalarının yapılmasının yanı sıra verimin de artması için çalışmalar yapılmıştır (Karagöz, 2014).

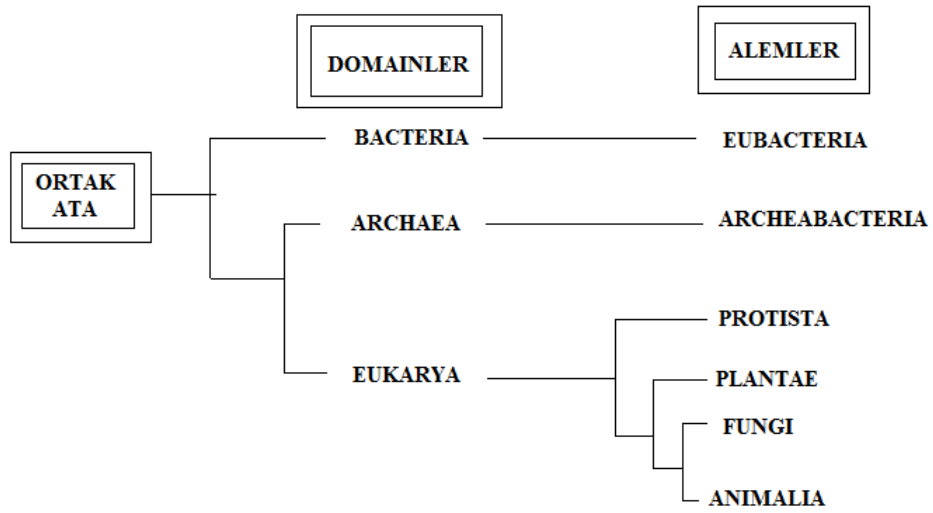
Organik maddenin topraktaki kaynağı, bazı işlemlerden geçen hayvan gübrelere (ahır gübresi, tavuk gübresi, kuş gübresi) ve bazı evsel atıklar olabilir. Gübrenin tarımsal üretimde payı yaklaşık olarak %50-60 arasındadır. Gübrelere yararlı mikroorganizmalar içerir ve bununla beraber gübre toprakta kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkiye sahip olduğundan olumlu sonuçlar bırakır. Gübrelere arasında en fazla azot (N), fosfor (P) ve potasyum (K) bulunduran yarasa gübresi en verimli gübredir.

2.5. Bakteri

Canlılar beş grupta, Monera, Protista, Fungi, Plantae ve Animalia olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonra canlılar Archea, Bacteria ve Eucarya olarak 3 “domain” altında toplanmıştır (Şekil.2.5).

1676 yılında, Antonie van Leeuwenhoek kendi icat ettiği tek mercekli mikroskopla bakterileri gözlemlemiştir. Leeuwenhoek, bakterilere ilk olarak “animalcules” (hayvancık) adını vermiştir (Porter, 1976). Bakteriler birkaç mikrometre uzunluğunda ve farklı çeşitleri, şekilleri vardır. Şekilsel olarak bakteriler, spiral, çubuksu ve virgül şeklinde olabilir. Her ortamda bakteri bulunur; toprak,

okyanus, deniz, yer kabuğu, hayvan derisi, bağırsak florası, su kaynakları yani her yerde kendi şartlarında içinde büyüyen bakteri türleri vardır (Fredrickson ve ark., 2004). Bakteriler dünyada biyokütlenin çok büyük bir bölümünü oluşturur. Yaptıkları çalışmada bir gram toprak örneğinde bulunan bakteri sayısı 40 milyon, 1 mL tatlı su örneğinde ise 5×10^{30} bakteri bulunduğunu söylemektedir (Whitman ve ark., 1998). Bakterilerin insan vücudundaki sayısı ise, insan hücre sayısının katı kadar olduğu bilinir. Bakteriler insan vücudunda deride ve sindirim kanalı yolu üzerinde bulunur (Sears, 2005). İnsan vücusunda bulunan bakterilerin çoğunluğu bağışıklık sistemine zararsız ve koruyucu etkisi olmasının yanı sıra, bir kısmı da probiyotik yani yararlı, bazıları ise patojen ve enfeksiyöz hastalıklara sebep olan etkileri vardır. Bu bakteriler arasında en zararlı ve ölümcül hastalıklara sebep olan bakteriler solunum yolu enfeksiyonuna neden olur. Bakterilerin hastalık sebebi olduğu araştırmacılar tarafından 19. yüzyılda bilinmekteydi fakat tedavi için herhangi bir antibakteriyel bulunmamaktadır (Thurston, 2000). 1910 yılında Paul Ehrlich, *Treponema pallidum* 'u tespit edebilen seçici tanımlamayan ve boyamaya yarayan boyalarda değişiklikler yaparak bu patojeni seçici olarak yok eden yani öldüren bileşikler elde etmiştir ve böylece ilk antibiyotiği geliştirmiştir (Schwartz, 2004).



Şekil.2.5. Canlıların üç domain halinde düzenlenen sınıflandırılması

2.5.1. Bakteri Tanımlanmasında Kullanılan Geleneksel Teknikler

Saf kültürlerin izolasyonu, morfolojik, metabolik ve biyokimyasal temellere dayanan geleneksel mikrobiyolojik teknikler kullanılarak mikrobiyal çeşitlilik ile ilgili bilgiye ulaşılabilir. Ancak bu teknikler, mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü algılamaya yönelik çalışmalarda tek başına yetersiz kalmaktadır. Çünkü bu yöntemlerin çoğu ya mikrobiyal aktiviteyi dolaylı yollardan ölçen yöntemlerdir ya da *ex-situ* tekniklerdir. Bu tekniklerle mikroorganizma grubu kendi yaşam ortamı dışında teşhis edilmektedir. Ayrıca, klasik yöntemlerde saf kültür elde etme aşamasında, mikroorganizmaların yaşam ortamları tam olarak temsil edilemediği için, ortamda istenmeyen başka türler oluşabilmektedir. Ekosistemdeki bakteriyel çeşitliliğin fazlalığı göz önünde bulundurulduğunda, klasik yöntemlerle tespit edilen prokaryotik türlerin sayısı (bakteri ve arkeler) oldukça azdır. Şimdiye kadar yaklaşık 7000 bakteri türü tespit edilmiştir (Akın, 2014).

2.6. Yarasa Guanosunda Bulunan Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler

Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılan klasik teknikler sınırlıdır. Bu bağlamda, mikrobiyal çeşitlilik ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolü ile ilgili bilgiler oldukça azdır. Mikroorganizmalar birbirine benzerliklerinden dolayı, sadece morfolojik yapılarına göre sınıflandırma yapılamaz. Metabolik ve biyokimyasal özelliklere dayanan sınıflandırmada karşılaşılan en büyük problem ise; mikroorganizmaların birebir kendi doğal ortamlarını yansıtan kültür ortamlarında yetiştirilmesi gerekliliğidir. Termal su kaynakları, sediment yapılar, mağara içleri ve deniz suyu gibi farklı habitatlardan alınan numunelerde, moleküler tekniklerin temelini oluşturan (16S rDNA parçalarının kopyalanması gibi) yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda, mikrobiyal çeşitliliğin bildiğimizden çok fazla olduğu ve klasik tanımlama tekniklerinin ne kadar yetersiz kaldığı anlaşılmıştır. Tüm bakterilerde ortak genler bulunması bilinen bir gerçektir ve bu genlerin baz dizilerinde türden türe değişen kısımlar bulunur. 16S rDNA molekülü, yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır ve evrim süreci boyunca korunmuştur. Bu özellik

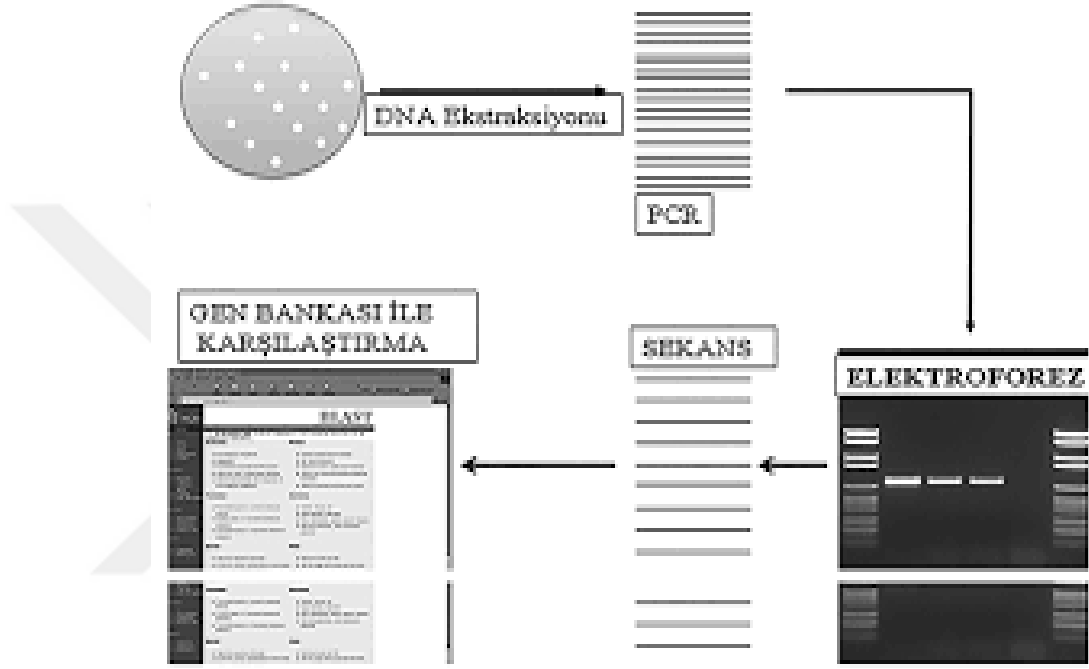
organizmaların karşılaştırılmasını, hatta aynı türdeki farklılaşmaların (strain) tespitini sağlamaktadır.

2.6.1. 16S rDNA Dizi Analizi

16S rDNA dizi analizi, gen bölgesi filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde ve bakterilerin tanımlanmasında son yıllarda yaygın olarak kullanılır. 16s rDNA yüksek nitelikte korunmuş bölgeleri içerdiği için 16S rDNA gen bölgesi türlerin tanımlanmasında etkilidir (Brown-Elliot ve ark., 2006). Ribozomal RNA'lar oldukça büyük, işlevsel olarak sabit, evrensel olarak yaygın moleküllerdir. Tüm hücrelerde nükleotid dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içerirler. Prokaryotlarda 5S, 16S ve 23S büyüklüğünde üç çeşit ribozomal RNA molekülü yer alır. Günümüzde bakterilerin moleküler yöntemlerle tanımlanmasında 16S rDNA geni hedef olarak seçilen önemli gen bölgelerinden biridir. 16S rDNA gen dizisi, tüm canlılarda yüksek derecede korunmuş gen bölgesidir. Genomda bu rDNA bölgesinde hem bakteriye özgü çok iyi saklanmış diziler yer alır, hem de türe göre değişken olan diziler bulunur. Bu bölgelere özgü primerler kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilerek sekanslama işlemi neticesinde sonuca gidilebilir (Leblond-Bourget, 1996). Sekans analizi, DNA birincil (temel) yapılarının belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. DNA dizi analizi, bir ucu aynı olan ve bir nükleotid farkı ile uzunlukları değişen oligonükleotidleri ayırabilme tekniğine dayanır (Sanger, 1977). Bir oligonükleotidi dizilemek için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Sanger ve arkadaşlarının (1977) geliştirdikleri yöntemde, DNA nükleotid dizisinin belirlenmesi için enzimatik teknikler ve sentezin 2,3-dideoksinükleotidtrifosfatlar (ddNTP) kullanılarak belli bazlarda sonlandırılması prensibine dayanır. Buna karşılık Maxam ve Gilbert (1977) ise kimyasal bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu teknikte kullanılan kimyasal maddeler oldukça toksik maddelerdir. Ayrım gücü yüksek, fakat uygulama kolaylığı olmayan ve değerlendirme aşaması son derece uzun bir yöntemdir. DNA dizi analizi ile birçok organizmanın genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (Monis, 2002).

DNA tiplendirme yöntemleri, bakteriyel DNA'daki farklılıkların ayırımı üstüne kurulmuştur. İzolatların ayırımı için DNA sekanslamanın kullanılması en uygun yol olarak görülmesine karşın, her izolatın tüm genomunun sekanslanması

pratik değildir. 16S rDNA sekanslarının veri bankaları oluşturulmuştur ve bu sekansların karşılaştırılması, tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Aslında 16S rDNA sekansları bakterilerin taksonomik çalışmaları için oldukça kullanışlıdır. Bu sekanslara göre evrimsel ağaçlar kurulmuş olup bakteriyel türlerin filogenetik ilişkileri belirlenmektedir (Akın, 2014).

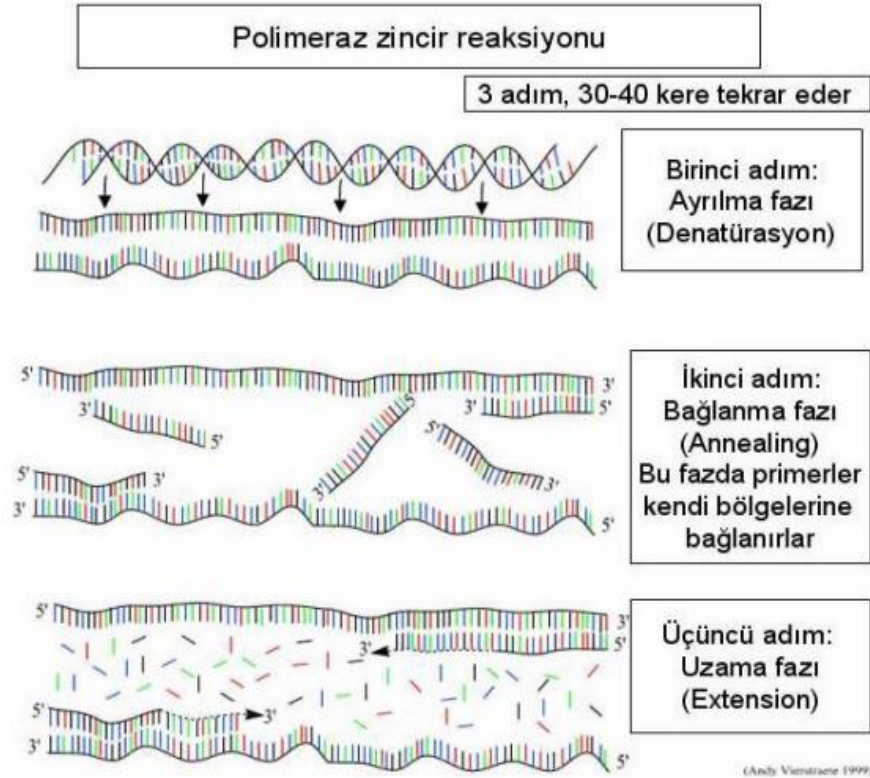


Şekil.2.6. Bakterilerin 16S rDNA sekansına dayalı moleküler tanımlanması (Eskin, 2014)

2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler biyolojide uygulanan yaygın bir tekniktir. Nükleik asitlerin in vitro koşullarda çoğaltılması olarak tanımlanabilir. Polimeraz zincir reaksiyonu, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Oligonükleotit primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle baz eşleşmesi yapar. Primerlerin özgün olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört

çeşit deoksiribonükleozidtrifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PZR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması ve uzama olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Bu üç aşamanın 25-30 tekrarı ile bir tek DNA parçasından teorik olarak 68 milyar kopya elde edilebilmektedir (Şekil 2.6). Art arda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar (Şekil 2.7). Bu üs cinsinden artışın sebebi, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PZR döngüsü, DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PZR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve $MgCl_2$ 'dir.



Şekil 2.7. PZR aşamaları (Anonim, 2)

Kalıp DNA: Polimeraz zincir reaksiyonunda genomik DNA, plazmit ve faj DNA, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, genom kitaplıkları halinde ya araştırma laboratuvarları ve kliniklerden ya da ticari olarak elde edilir. PZR’de kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA’nın yanı sıra RNA da kullanılabilir (Anonim, 3).

Polimerazlar: Taq DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozittrifosattan uzun polinükleotit zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yönü 5’üçtan 3’üca doğru olup, primerin serbest 3’ hidroksil ucuna ortamdaki dNTP ile arasına nükleotitler eklenerek, fosfodiester bağları katalizler. Sıcaklığa dayanıklı DNA polimerazlardan PZR’de en yaygın olarak kullanılanı *Thermus aquaticus* izolatından elde edilen Taq DNA polimerazıdır (Anonim, 3).

Primerler: Gen çoğaltılması dahil PZR’nin birçok uygulaması için kalıp DNA’ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır. Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotit uzunluğundadır. Oligonükleotitprimerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan ya da ticari olarak elde edilebilirler. Bu primerler genellikle oluşumu bilinmeyen çeşitli nokta mutasyonlarının olduğu bölgelere bağlanma amacıyla seçilir (Anonim, 3).

dNTP Karışımı: Deoksiribonükleozittrifosfat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dördlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PZR 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir (Anonim, 3).

Tamponlar ve MgCl₂: PZR’de kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tamponlardır. Mg²⁺ iyonları dNTP’ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini uyarırlar ve çift iplikli DNA’nın Tm değerini 1 arttırırlar, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar. (Tm değeri: Çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin

yarısının ortadan kalkmasına yol açan sıcaklık derecesi) Bu nedenle $MgCl_2$ 'ün PZR özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır (Anonim, 3).

2.6.3. 16S rDNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları

Tüm bakterilerde ortak genler bulunması bilinen bir gerçektir ve bu genlerin baz dizilerinde türden türe değişiklik gösteren kısımlar vardır. 16S rDNA molekülü yaşayan tüm canlılarda bulunmakla beraber evrim süreci boyunca korunmuştur (Yılmaz ve Temiz, 2003). Evrim süreci boyunca bu özelliğin korunması organizmaların karşılaştırılmasına, hatta aynı türdeki farklılaşmaların (strain) tespitine imkân vermektedir. Dahası gen dizilimi ile istatistiki olarak, ilgili verilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir.

Tüm organizmalarda fazla miktarda bulunan ribozomların üretilmesinden sorumlu olan 16S ve 23S rDNA genleri moleküler teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda en fazla kullanılan genlerdir. Ayrıca çok fazla mikroorganizmanın, 16S rDNA geninin dizi analizi bilgilerini içeren ve gün geçtikçe büyüyen bir veri bankasının bulunması da bu geni hedef alan moleküler tekniklerin kullanım alanının artmasını sağlamıştır. 16S rDNA dizini bilinmeyen bakterilerin tanımlanmasında, dünyada geniş çapta kullanılan bir biyo belirleyicidir. Ayrıca farklı 16S gen dizilimi olan organizmaların istatistiksel olarak karşılaştırılmasına da olanak sağlar. Buna rağmen nispeten pahalı olabilir, dikkatli ve hassas çalışma gerekebilir ve sekanslamada türler arası yüksek oranda benzerlik çıkabilir (Cole, 2003).

2.6.4. Türlerin Filogenetik Analizi ve Filogenetik Ağacın Oluşturulması

Türlerin birbirleri ile arasındaki ilişkiyi inceleyen bilim dalı filogeni isimlendirilmiştir. Bakteri gibi organizmaların yakınlık ilişkilerinin belirlenmesi ve soyları bakımından sistematik olarak konumlandırılmasıdır. Analiz sonucunda yapılan filogenetik ağaçlar hangi organizmaların ne kadar yakın ilişki içerisinde olduğunu, hangilerinin uzak olduğunu tayinini yapmaktadır. Nükleik asit veya aminoasit dizisi filogenetik analiz için en fazla kullanılan moleküllerdir. Nükleik asit veya aminoasit dizisi elde edildikten sonraki aşama Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST) otomatik olarak verilerin yüklü olduğu sistemdir. BLAST

sisteminden faydalanılarak yapılan çalışmada, bulunan en yakın diziler elde edilir (Lepp ve Relman, 2004).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Besiyeri

İndikatör veya inhibitör içermeyen, birçok mikroorganizmanın gelişebilmesi için yeterince zengin besin maddesi içeren genel kullanım amaçlı besiyeridir. İzole edilen bakterilerin stok kültür şeklinde hazırlanmasında kullanılmıştır. Kullanılacak miktarda besiyeri, öncesinde otoklavda 121°C’de 1 atm basınçta steril edilmiştir. Bu araştırmada bileşimi aşağıda belirtildiği gibi Muller Hinton Agar (MH) Besiyeri kullanılmıştır.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Pepton	5.0
Et özütü	2.0
Kazein hidrolizat	17.5
Nişasta	1.5
Agar	13.0

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

3.1.2.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma süresince kullanılan kimyasallar Merk ve Sigma firmalarında temin edilmiştir.

3.1.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.1.2.2.1 Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.1.2.2.1.1. Tris / EDTA Tamponu (250 mL)

Bileşimi aşağıda verildiği gibi toplam hacim 250 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır (pH8.0).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tris	0.3
EDTA	0.008

3.1.2.2.1.2. %10'luk SDS Tamponu (100 mL)

Bu tampon için 10 gram SDS tartılarak 100mL distile suda çözülmüştür.

3.1.2.2.1.3. Proteinaz-K'nın Hazırlanması (10 mL)

Proteinaz-K için 0.0384 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 5 mL gliserol ve 100 μL 1M Tris-HCl (pH8.0) ile çözülmüştür. En son hacim 10 mL oluncaya kadar distile su eklenmiştir. Hazırlanan bu çözeltiden 10 mL alınarak 100 mg proteinaz-K çözülmüştür.

3.1.2.2.1.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 mL)

NaCl tamponu için 20 g NaCl tartılarak, 100 mL distile su ile çözülmüştür.

3.1.2.2.1.5. CTAB/NaCl tamponu (100 mL)

CTAB/NaCl tamponu için 4.1 g NaCl tartılarak 90 mL distile suda çözülerek ve 10 g CTAB yavaş bir şekilde solüsyona eklenerek 65°C'ye kadar ısıtılmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

3.1.2.2.1.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu (100 mL)

Kloroform/izoamil alkol tamponu için 96 mL kloroform, 4mL izoamil alkol ile karıştırılarak 100 mL tampon hazırlanmıştır.

3.1.2.2.1.7. Kloroform/İzoamil Alkol/Fenol Tamponu (100 ml)

Kloroform/izoamil alkol/fenol tamponu 48 mL kloroform, 2 mL izoamil alkol ve 50 mL fenol ile karıştırılarak 100 mL tampon hazırlanmıştır.

3.1.2.2.1.8. İzopropanol Alkol (100 mL)

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

3.1.2.2.1.9. %70'lik Etil Alkol (100 mL)

Bu çözelti için 70 mL %100'lük etil alkol ile 30 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.2.2.1.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 mL)

Tris-HCl tamponu için 70 mL %100'lük etil alkol ile 30 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.2.2.1.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL)

Tris-HCl tamponu için 0.12 g Tris-HCl tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

3.1.2.2.1.12. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama

Aşağıda belirtilen bileşim tamamlandıktan sonra toplam hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tris	242
Na ₂ EDTA ₂ H ₂ O	37.2
Glasiyal Asetikasit	57.17

3.1.2.3. PZR Amplifikasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması

PZR amplifikasyonu için 16S rDNA örneklerini amplifiye etmek için standart 16S rDNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotid primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler ve özellikleri

Primer	Dizi (5' - 3')	Özellik	T _m (°C)	Referans
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Öbakteriyel, düz	48°	Britsçgi ve Giovannoni
1492R	ACCTTGTTACGACTT	Üniversal, ters	43°	Edgcomb ve diğerleri

Primerler; 27 F forwardprimer: 5'-CCGAATTCGTCGACA ACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Britsçgi ve Giovannoni, 1991) ve 1492 R reverseprimer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' kullanılmıştır (Edgcomb ve ark., 2002). PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 100 µL PZR karışımı için 10 µL kromozomal DNA (100 ng), 5 µL 16S Forward Primer (20 pmol), 5 µL 16S Reverse Primer (20 pmol), 4 µL 5 mM 4 dNTP karışımı, 4 µL 50 mM MgCl₂, 10 µL 10x Taq Buffer (Taq DNA polymerase içeren), 61.5 µL steril

distile su, 0.5 µL (2.5U) Taq DNA polymerase karıştırılıp santrifüjlenmiştir. Thermalcycler da 30 döngü ile çoğaltılan örnekler sekans analizi yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır (Zolgharnein ve ark., 2010).

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışma Alanı

Guano örneği Kırıkkale Keskin ilçesinin Kırşehir çıkışında bulunan Keskin Meslek Yüksek Okulu arazisindeki bir galeriden alınmıştır (Şekil 3.1). Bu galeri merkezi ısıtma sistemi için yapılmış yaklaşık 300 metre uzunlukta, 2 metre yükseklikte ve 1,5 metre genişliktedir. Bu galeri, nisan aylarında yarasalar tarafından ziyaret edilerek yavrulama kolonileri için kullanılır. Kasım ayından itibaren yarasalar kışlama tünelerine göç ederek galeriyi terk ederler. Galeri bazen tarım yapılan geniş bir arazi içinde yer almaktadır. Galeri girişleri üstten 1 metrekareli demir kapılar ile kapatılmıştır. Zaman içinde galeride göçükler oluşmuştur ve yarasalar giriş çıkışlarını buradan yapmaktadır. Kışın ocak ayında ortalama sıcaklık 15 °C kadardır.



Şekil 3.1. Yarasaların yaşadığı bir galerinin konumu (Sarı çizgi)

3.2.2. Örneklerin Toplanması

Yaz aylarında yavrulama yeri olarak kullanılan ve insanın rahatlıkla yürüyebileceği boyutlarda, tamamen karanlık olan bir galerideki gübre öbeklerinden guano örneği alınmıştır (Şekil 3.2). Örnekler sadece falkon tüpünün ağız kısmı kullanılarak alınmış ve ağzı kapatılmıştır.



Şekil 3.2.Falkon tüpü ile guano yığınınından örnek alınışı

3.2.3. Gübrede Bulunan Bakterilerin İzolasyonu Ve Tanımlanması

Guanoda bulunan bakterilerin izolasyonu için Muller Hinton agar (MA) ortamları hazırlanmıştır. Hazırlanan besi ortamlarına alınan guano örnekleri seyreltilerek ekim yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda petriler ortamdaki üreme çeşidi bakımından incelenmiştir. Seçici ortamda izole edilen farklı koloniler, saflaştırma için aynı ortamda tekrar kültüre edilmiştir (Vandzurova ve ark., 2013). Katı besiyerinde büyütülen saf suşların koloni morfolojisi ve gram özellikleri belirlenmiştir.

3.3. Koloni Morfolojisi

Guanoda bulunan bakterilerin izolasyonu için Muller Hinton agar ortamları hazırlanmış ve ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petriyer ortamdaki üreme çeşidi bakımından incelenmiştir. Seçici ortamda izole edilen farklı koloniler saflaştırma için aynı ortamda tekrar aynı kültürlerin oluşumu gözlenmiştir.

Katı agarda büyütülen saf suşların koloni morfolojisi Pelczar ve Reid'e (1958) göre yapılmıştır (Pelczar ve ark., 1958).

3.4. Hücre Morfolojisi

Hücrelerin, Gram boyama yöntemi kullanılarak incelenmesi yapılmıştır. Gram boyama en sık kullanılan işlemlerden biridir. Gram boyama yöntemi 1844 yılında H. Christian Gram tarafından geliştirilmiştir (Kruzcak-Filipov ve Shively, 1992). Gram boyama ile kültürlerde üreme gösteren bakterilerin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi yapılır. Değerlendirilmesi yapılan bakteriler hücre duvarlarının yapısına göre "gram pozitif" ve "gram negatif" olarak adlandırılırlar (Koneman ve ark., 1992).

Gram pozitif bakteri türlerinde hücre duvarlarında boya kalır ve bakteri koyu menekşe rengini alır. Gram negatif türler ise peptidoglikan yapısına sahip olduğundan alkol ile işlem gördüğünde zarar görür ve zıt renkte pembemsi bir renk alır (Anonim, 4). Bu tespit işlemleri ise mikroskop (immersiyon yağıyla ve 100 büyütme objektifle) altında incelenmiş Gram reaksiyonu esnasında hücre şekilleri ve hücrelerin düzenlenmesi gözlenmiştir.

3.5. Bakteriyel Kültürden Genomik DNA İzolasyonu

Yarasa gübresinden izole edilen bakterilerden kromozomal DNA izolasyonu Cutting ve Horn (1990) protokolüne göre yapılmıştır (Cole ve ark., 2009). 15 mL Nutrient sıvı besiyerine tek koloniden ekim yapıp 150 rpm'de 37°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Bir gecelik bakteri kültürleri 1.5mL'lik epondorf tüplere koyularak 10.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Üst kısım uzaklaştırıldıktan sonra pelletler 567 µL TE tamponu içerisinde mikropipet yardımıyla çözündürülüp ve üzerlerine 30 µL SDS ve 3 µL proteinaz K çözeltileri eklenerek vortekslenmiştir. 37°C'de 1 saat bekletilen

hücrelere 100 µL NaCl ekleyerek tekrar vortekslenmiştir. 800 µL CTAB/NaCl çözeltisi ekledikten sonra tüpler vortekslenip ve 65°C'de 10 dk tutulmuştur. Tüplerin üzerine eşit hacimde kloroform/izoamil alkol eklenerek tekrar vortekslenmiştir. 10.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenen tüplerin üst fazları, temiz satrifüj tüplerine alınarak ve eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol karışımından ekleyerek vortekslenmiştir. 10.000 rpm'de 5dk. santrifüj edildikten sonra üst fazlar dikkatlice temiz tüplere alınarak ve 0,6 hacim izopropanol eklenmiştir. Ardından DNA çökünceye kadar tüpler vortekslenip 15.000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Tüplere 50 µL % 70 etanol eklenerek DNA'lar yıkanıp ve tüpler hemen ters çevrilip alkol uzaklaştırılmıştır. Tüpler ağzı açık durumda oda sıcaklığında bir süre (10-15 dk) veya 60°C'de birkaç dakika bekletilerek alkolün tamamen uçurulması sağlanmıştır. Pelletlerin üzerine 50-100 µL TE tamponu ekleyip, tüplere parmakla yavaşça vurularak DNA'lar çözdürülüp, DNA saflığı Nanodrop cihazı (Invitrogen) ile ölçülmüştür. Her jelde moleküler marker olarak 1 kb DNA Ladder kullanılmıştır ve DNA % 0,7'lik agaroz jelde (w/v) 80 voltta 3 saat boyunca elektroforezde yürütülmüştür. Jel, gel red ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir.

3.6. PCR Amplifikasyonu ve PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR amplifikasyonu için standart 16S rDNA gen sekansına (GenBank) göre sentezlenmiş olan iki evrensel oligonükleotidprimer çifti, 27 F forwardprimer: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; ve 1492 R reverseprimer: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGT TACGACTT-3' kullanılmıştır (Edgcomb ve ark., 2002). Ayrıca PCR ürünleri amplifiye edildikten sonra uygun saflaştırma kitler ile saflaştırılmıştır.

3.7. 16S rDNA Sekanslaması ve Bakterilerin Tanımlanması

İzolatlarla yapılan PCR çalışmaları ile elde edilen ürünlerin 16S rDNA sekans analizleri yapılmıştır. Saflaştırılmış PZR ürünleri, sekans analizi için İstanbul Medsantek firmasına gönderilmiştir. Sekans analiz sonuçlarına göre elde edilen dizi analizi verileri, A-G-C-T dizin dosyaları biçiminde kopyalanarak, 16S rDNA sekansları <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> internet sitesinde, BLAST programında

değerlendirmeye alınmış ve bu veri tabanında bulunan Gen Bankası sonuçlarına göre % benzerlikleri tanımlanmış olmakla beraber mevcut türlerle olan muhtemel farklılıklar incelenmiştir.

3.8. Filogenetik Soyağaçlarının Oluşturulması

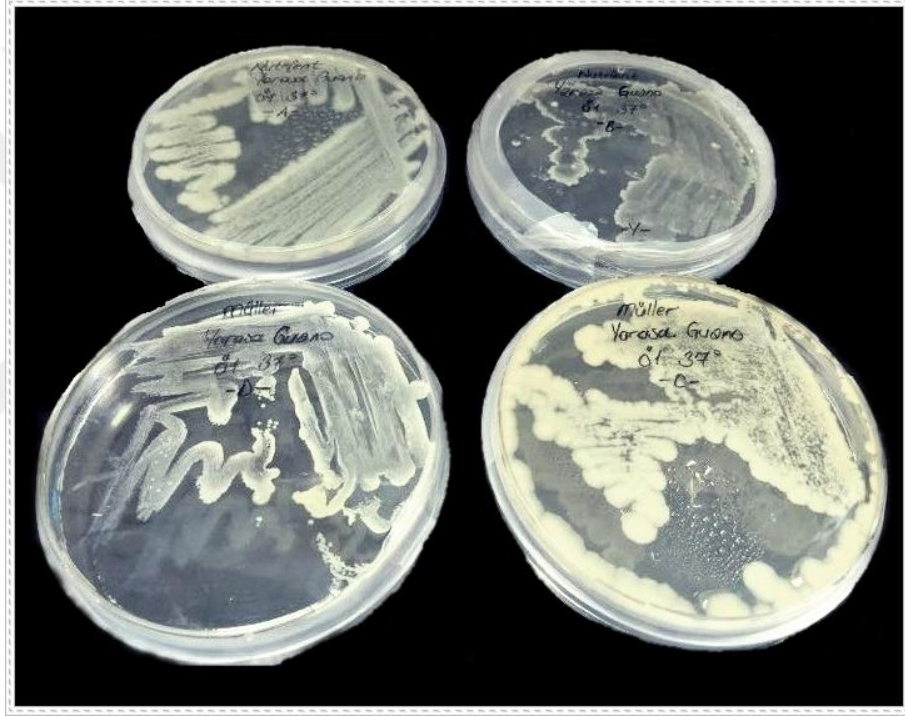
16S rDNA gen sekanslama sonuçlarına göre izolatların MEGA 7 programı ile filogenetik soyağaçları oluşturulmuştur.



4. BULGULAR

4.1. Bakterilerin İzolasyonu

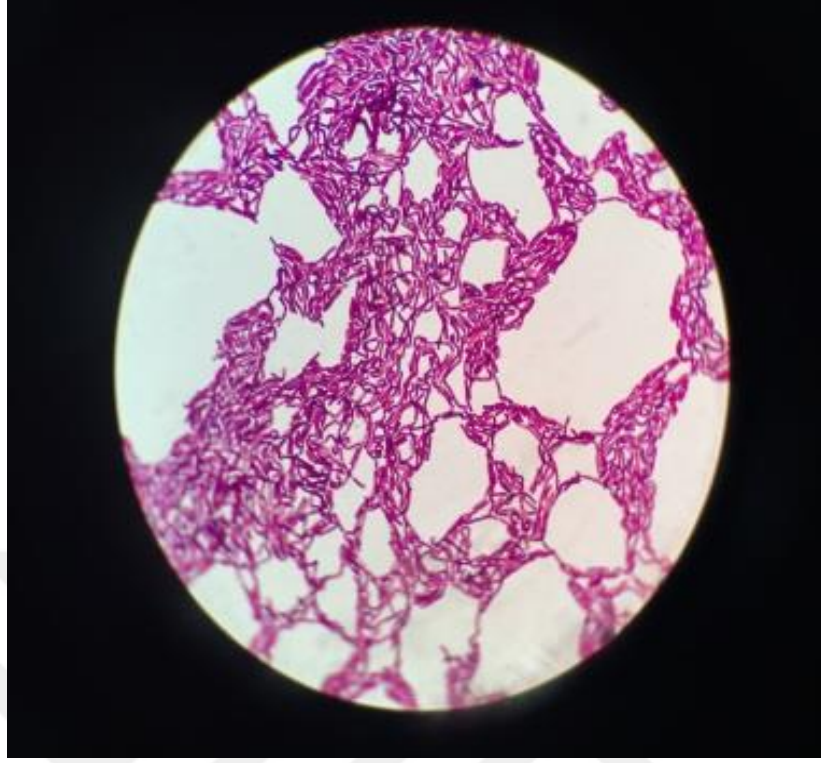
Kırıkkale Keskin ilçesinin Kırşehir çıkışında bulunan Keskin Meslek Yüksek Okulu arazisindeki bir galeriden alınan guanoda bulunan bakterilerin izolasyonu için Muller Hinton (MH) besiyerleri hazırlanmış ve ekim yapılmıştır. 3 adet farklı bakteri izole edilmiştir. Bakteri suşları, YA1, YB2 ve YE3 olarak kodlanmıştır (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. Bakteri kültürlerinin koloni morfolojisi (Tek Koloni)

4.2. Bakterilerin Tanımlanması

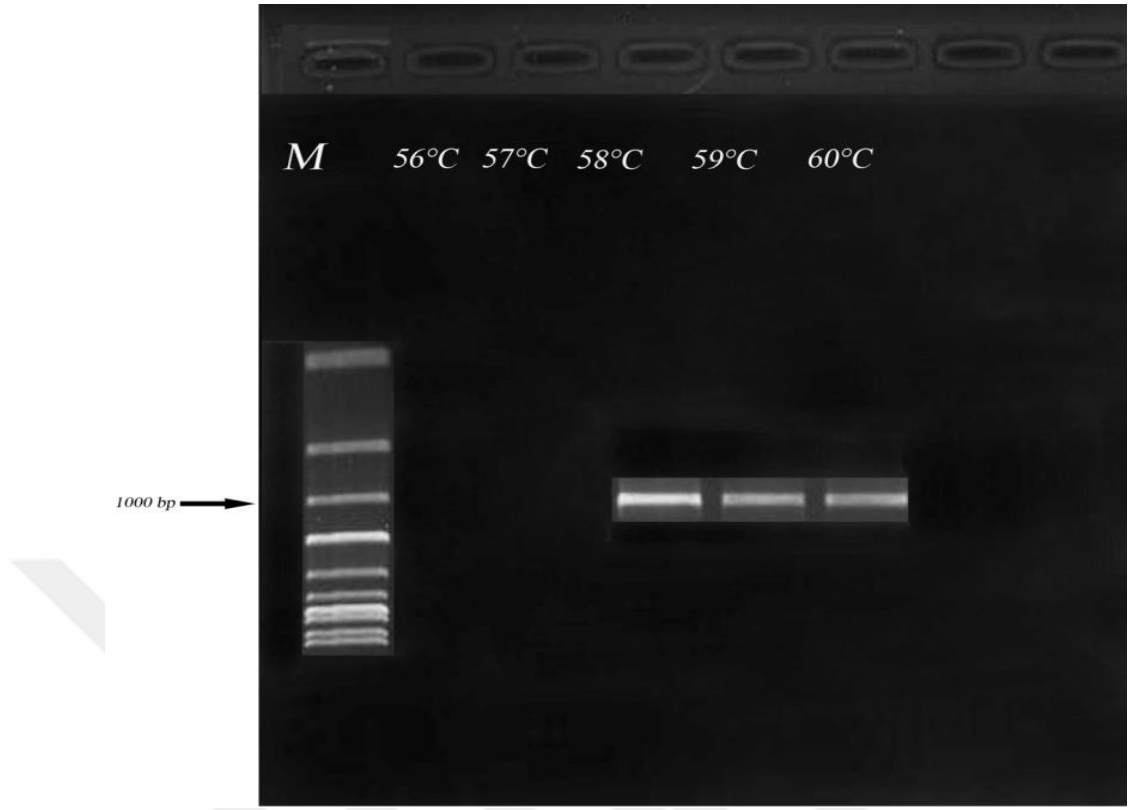
İzole edilen bakterilerin tanımlanmasında önemli olan gram boyama işlemi sonucunda deneylerde kullanılan YA1, YB2 ve YE3 izolatlarının mor renklere görülmelerinden dolayı Gram (+), morfolojilerinin de basil oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. YA1 izolatının Gram (+) mikroskop görüntüsü

4.3. YA1 Kodlu Suşun PZR ve 16S rDNA Sekans Analizi

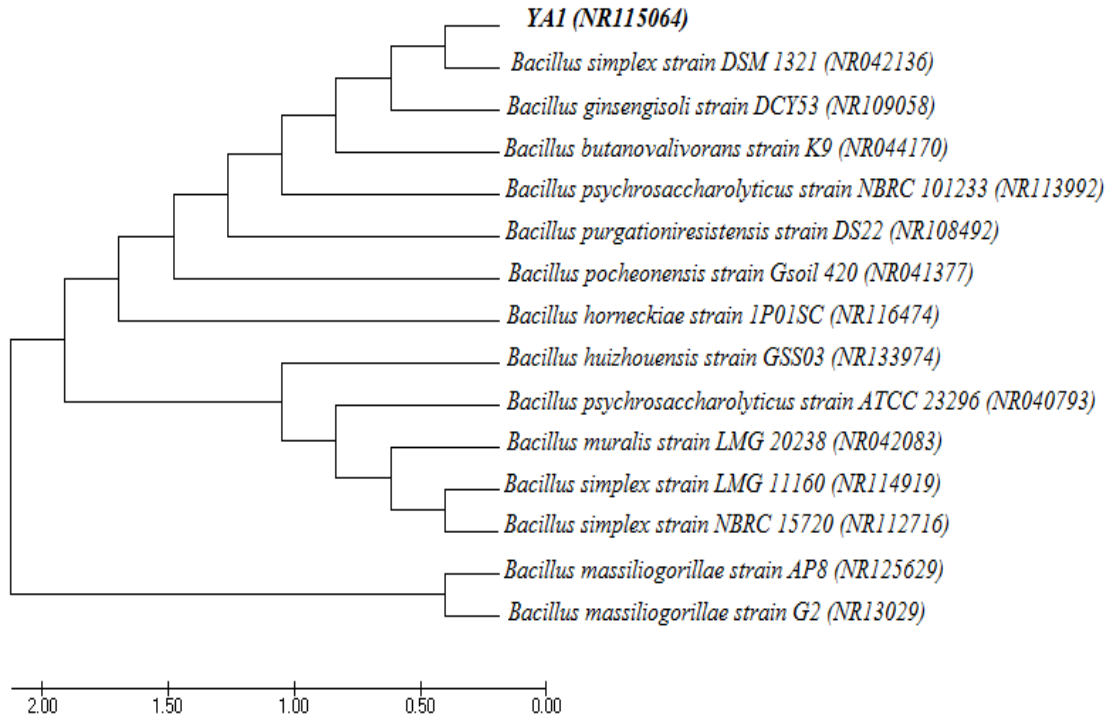
Analiz için 16S rDNA bölgeleri PZR'de çoğaltma işleminden sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde yaklaşık olarak 1000 baz çiftine karşılık gelen bölgeler olduğu görülmektedir (Şekil 4.3). YA1 kodlu suşa ait primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu 2 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında YA1 kodlu suşun PZR ürünleri

4.3.1. YA1 Kodlu Suşun Tanımlanması ve Filogenetik Analiz Sonuçları

YA1 kodlu suşun tanımlamak için 16S rDNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programının verdiği sekanslarla karşılaştırılmıştır. Gen Bankasında yapılan BLAST analizine göre YA1 kodlu suşun %100 oranında *Bacillus simplex* ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca bu tür ile ilgili gen bankasından NJ115064 kodu alınmıştır. YA1 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16s rDNA gen sekans analizi kullanılarak, MEGA 7.0 programında veriler yüklenerek neighbour-joining metodu kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.4). Görüldüğü gibi YA1 kodlu suşun gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 4.4. YA1 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram

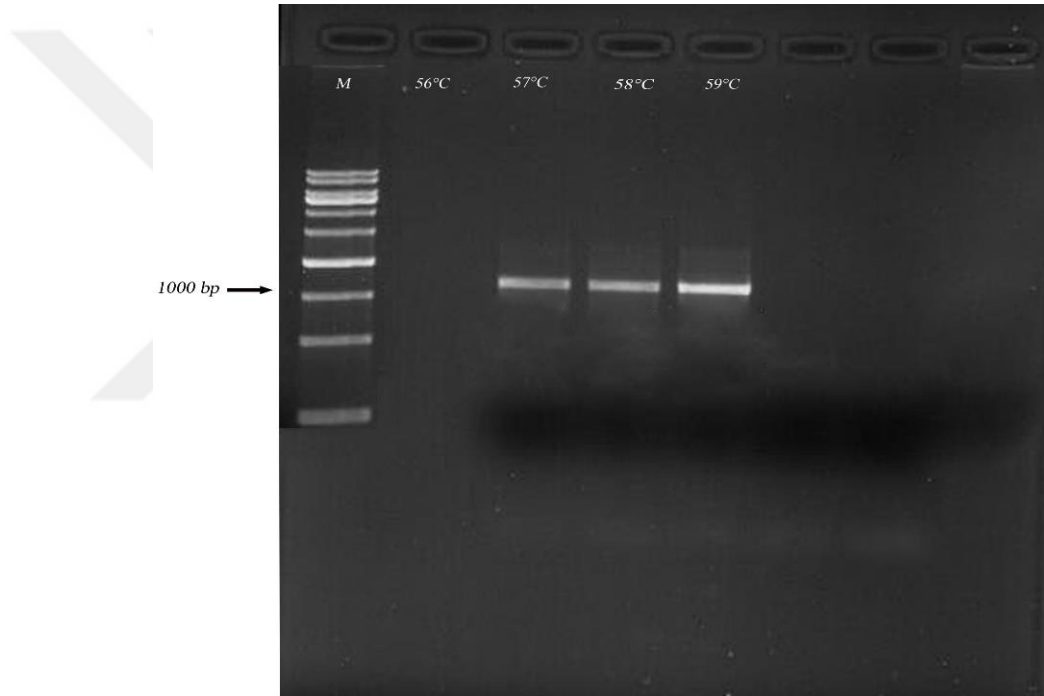
Soy ağacını desteklemek için uzaklık matrisleri (distance matrix) Mega 7.0 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Filogenetik analizler sonucunda YA1 kodlu suşa en yakın türün *Bacillus simplex* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. YA1 kodlu suşun 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. <i>YA1 (NR115064)</i>															
2. <i>Bacillus muralis strain LMG 20238 (NR042083)</i>	4.773														
3. <i>Bacillus simplex strain LMG 11160 (NR114919)</i>	4.501	1.906													
4. <i>Bacillus simplex strain NBRC 15720 (NR112716)</i>	4.501	1.906	0.000												
5. <i>Bacillus simplex strain DSM 1321 (NR042136)</i>	3.285	4.426	4.441	4.441											
6. <i>Bacillus butanolivorans strain K9 (NR044170)</i>	4.197	4.495	3.569	3.569	3.513										
7. <i>Bacillus psychrosaccharolyticus strain NBRC 101233 (NR113992)</i>	4.137	3.405	3.488	3.488	4.402	3.033									
8. <i>Bacillus psychrosaccharolyticus strain ATCC 23296 (NR040793)</i>	4.416	4.020	3.041	3.041	4.343	4.250	4.086								
9. <i>Bacillus huizhouensis strain GSS03 (NR133974)</i>	3.314	3.922	4.492	4.492	4.499	4.098	3.847	4.128							
10. <i>Bacillus purtigaoniresistens strain DS22 (NR108492)</i>	3.508	3.510	2.953	2.953	3.273	3.128	3.116	4.158	4.560						
11. <i>Bacillus massilioanorexius strain AP8 (NR125629)</i>	3.077	3.393	4.016	4.016	3.544	4.319	4.105	4.439	4.451	3.927					
12. <i>Bacillus horneckiae strain IP01SC (NR116474)</i>	4.029	3.256	4.299	4.299	4.581	4.452	3.241	3.469	3.576	3.652	2.510				
13. <i>Bacillus massiliogorillae strain G2 (NR133029)</i>	3.625	3.216	3.056	3.056	4.665	4.460	3.857	4.371	4.504	4.419	0.115	2.740			
14. <i>Bacillus ginsengisoli strain DCY53 (NR109058)</i>	2.710	3.764	4.394	4.394	3.792	2.929	3.324	4.437	4.978	3.106	3.045	3.455	3.016		
15. <i>Bacillus pocheonensis strain Gsoil 420 (NR141377)</i>	4.145	3.208	4.581	4.581	3.168	3.076	4.175	3.123	4.644	3.902	3.617	4.369	3.750	3.602	

4.4. YB2 Kodlu Suşun PZR ve 16S rDNA Sekans Analizi

YB2 kodlu suşun PZR için 16S rDNA bölgeleri PZR' de çoğaltma işleminden sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde yaklaşık olarak 1000 baz çiftine karşılık gelen bölgeler olduğu görülmektedir (Şekil 4.5). YB2 kodlu suşa ait primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu 2 mM olarak belirlenmiştir.

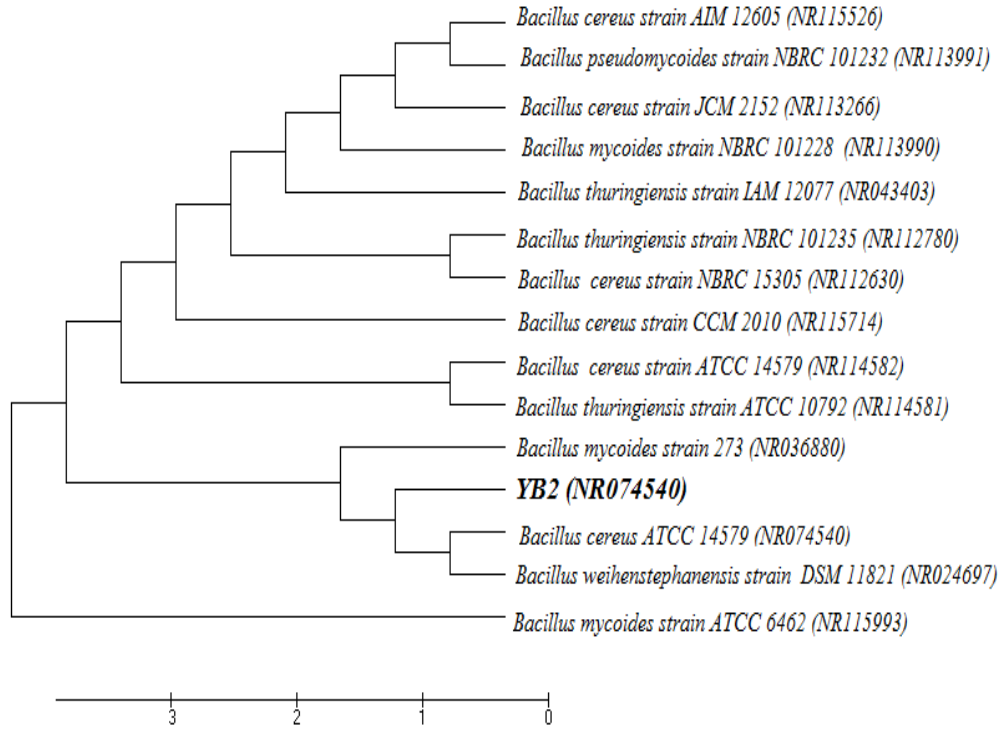


Şekil 4.5. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında YB2 kodlu suşun PZR ürünleri

4.4.1. YB2 Kodlu Suşun Tanımlanması ve Filogenetik Analiz Sonuçları

16S rDNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programının verdiği sekanslarla karşılaştırılmıştır. Gen Bankasında yapılan BLAST analizine göre YB2 kodlu suşun % 100 oranında *Bacillus cereus* ve %99 oranında *Bacillus*

thuringiensis, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus weihenstephanensis* ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca bu tür ile ilgili gen bankasından NR074540 kodu alınmıştır. YB2 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16s rDNA gen sekans analizi kullanılarak MEGA 7.0 programında veriler yüklenerek neighbour-joining metodu kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.6). Görüldüğü gibi YB2 kodlu suşun gösterdiği ilk 15 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 4.6. YB2 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram

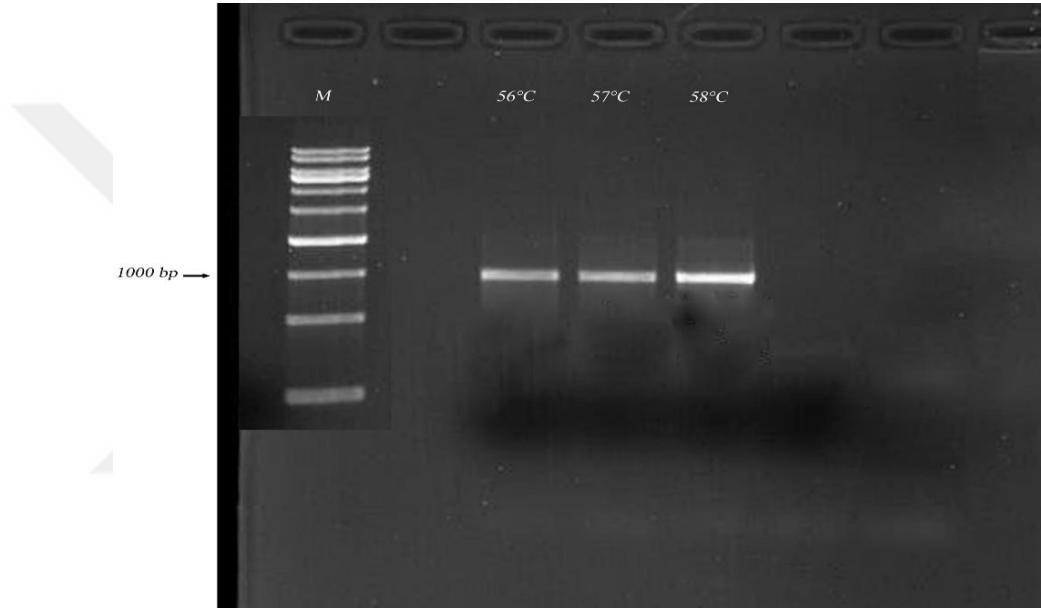
Soy ağacını desteklemek için uzaklık matrisleri (distance matrix) Mega 7.0 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Filogenetik analizler sonucunda YA1 kodlu suşa en yakın türün *Bacillus cereus* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. YB2 kodlu suşun 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 YB2 (NR074540)															
2 <i>Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 (NR114581)</i>	0.001	0.000													
3 <i>Bacillus thuringiensis strain IAM (NR043403)</i>	0.001	0.000													
4 <i>Bacillus thuringiensis strain NBRC 101235 (NR112780)</i>	0.001	0.000													
5 <i>Bacillus thuringiensis Bt407</i>	0.001	0.000	0.000	0.000											
6 <i>Bacillus cereus strain ATCC (NR114582)</i>	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003										
7 <i>Bacillus cereus strain JCM 2152 (NR113266)</i>	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000									
8 <i>Bacillus cereus strain CCM 2010 (NR115714)</i>	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.000								
9 <i>Bacillus cereus strain NBRC 15305 (NR112630)</i>	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000							
10 <i>Bacillus cereus strain ATCC 14579 (NR114582)</i>	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000						
11 <i>Bacillus cereus strain IAM 12605 (NR115526)</i>	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000					
12 <i>Bacillus anthracis strain Ames strain Ames (NR041248)</i>	0.005	0.004	0.004	0.004	0.004	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001				
13 <i>Bacillus mycoides strain NBRC 101228 (NR113990)</i>	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006			
14 <i>Bacillus mycoides strain ATCC 6462 (NR15993)</i>	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.000		
15 <i>Bacillus weihwnstephanensis strain DSM 11821 (NR024697)</i>	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.000	0.000	

4.5. YE3 Kodlu Suşun PZR ve 16S rDNA Sekans Analizi

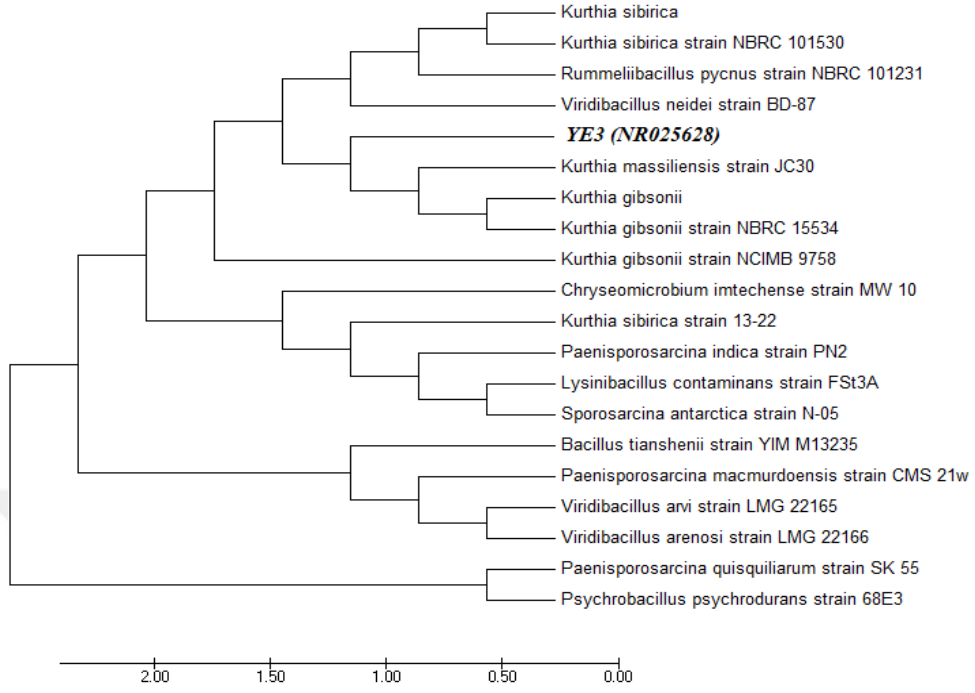
16S rDNA bölgeleri, PZR' de çoğaltma işleminden sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde yaklaşık olarak 1000 baz çiftine karşılık gelen bölgeler olduğu görülmektedir (Şekil 4.7). YE3 kodlu suşa ait primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaların en az olduğu sıcaklığın 58°C olduğu görülmektedir. Spesifik bağlanmaların en az olduğu MgCl₂ konsantrasyonu 2 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında YE3 kodlu suşun PZR ürünleri

4.5.1. YE3 Kodlu Suşun Tanımlanması ve Filogenetik Analiz Sonuçları

YE3 kodlu suş için 16S rDNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programının verdiği sekanslarla karşılaştırılmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizine göre YE3 kodlu suşun %100'e yakın oranında *Kurthia gibsonii* ve %99 oranında ise *Kurthia sibirica* ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca bu tür ile ilgili gen bankasından NR025628 kodu alınmıştır. YE3 kodlu suşun filogenetik ağacı, 16s rDNA gen sekans analizi kullanılarak, MEGA 7.0 programında veriler yüklenerek neighbour-joining metodu kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.8). Görüldüğü gibi YE3 kodlu suşun gösterdiği ilk 20 bakteri ile soy ağacı oluşturulmuştur.



Şekil 4.8. YE3 kodlu suşa ait neighbour-joining metoduyla oluşturulan dendrogram

Soy ağacını desteklemek için uzaklık matrisleri (distance matrix) Mega 7.0 programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Filogenetik analizler sonucunda YE3 kodlu suşa en yakın türün *Kurthia gibsonii* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. YE3 kodlu suşun 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 YE3 (NR025727)																				
2 <i>Viridibacillus arenasi</i> strain LMG 22166 (NR025628)	0.7596																			
3 <i>Viridibacillus neidei</i> strain ED-87 (NR025029)	5.776	5.816																		
4 <i>Kurthia sibirica</i> (NR118297)	2.106	2.020	0.534																	
5 <i>Kurthia sibirica</i> strain NBRC 101530 (NR11262)	2.106	2.020	0.534	0.000																
6 <i>Kurthia sibirica</i> strain 13-22 (NR042214)	5.549	6.468	4.500	5.480	5.480															
7 <i>Rummelibacillus pyncus</i> strain NBRC 101231 (NR041521)	3.654	3.622	0.391	0.114	0.114	4.546														
8 <i>Kurthia gibsoni</i> strain NCIMB 9758 (NR119002)	5.632	4.228	3.921	3.957	3.957	5.320	4.009													
9 <i>Kurthia gibsoni</i> (NR118298)	4.110	3.555	2.527	3.648	3.648	5.473	2.228	4.414												
10 <i>Kurthia gibsoni</i> strain NBRC 15534 (NR041520)	4.110	3.555	2.527	3.648	3.648	5.473	2.228	4.145	0.000											
11 <i>Paenisporosarcina guisguiliarum</i> strain SK 55 (NR043720)	3.934	3.402	4.215	3.260	3.260	6.185	3.321	4.181	3.951	3.951										
12 <i>Paenisporosarcina irdica</i> strain PN2 (NR108473)	4.180	3.645	5.146	3.817	3.817	3.158	3.958	4.329	5.535	5.535	5.376									
13 <i>Kurthia macmurdoensis</i> strain CMS 21w (NR025573)	3.645	4.063	5.481	5.562	5.562	3.911	5.679	4.332	3.969	3.969	4.080	4.414								
14 <i>Kurthia massilensis</i> strain JC30 (NR118218)	4.099	3.483	2.520	3.727	3.729	5.351	2.165	4.403	0.031	0.031	4.043	5.600	3.905							
15 <i>Rummelibacillus stabekisi</i> strain NBRC 104870 (NR114270)	4.089	3.621	2.482	3.591	3.591	5.351	2.025	4.266	0.033	0.033	3.961	5.387	3.987	0.038						
16 <i>Lysinibacillus contaminons</i> strain FSk3A (NR109740)	3.826	3.698	5.523	4.334	5.125	5.225	4.443	4.443	5.559	3.683	3.683	3.683	4.612	4.395	4.365					
17 <i>Sporosarcina antarctica</i> strain N05 (NR044122)	4.418	5.561	5.352	5.988	5.988	3.806	5.873	4.211	4.205	4.205	3.764	3.433	4.002	4.169	4.168	3.273				
18 <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> strain 68E3 (NR025409)	3.989	3.401	3.823	3.271	3.271	5.711	3.242	5.594	3.940	3.940	0.118	4.157	4.532	4.060	4.094	5.640	4.154			
19 <i>Chrysomicrobium intechense</i> strain MW10 (NR117419)	5.481	6.023	3.491	3.797	3.501	3.872	3.599	3.588	3.588	4.248	4.052	5.411	5.411	3.886	3.835	5.932	5.391	4.364		
20 <i>Bacillus tianshenii</i> strain YIM M13235 (NR133704)	3.628	5.583	4.361	5.540	5.540	4.431	5.445	4.242	3.966	3.527	3.607	3.635	3.635	4.058	4.099	4.186	4.439	3.337	4.242	

5. TARTIŞMA

Yarasa guanosu, biyoremidasyon yapan mikroorganizmalarca zengin bir yapıya sahiptir. Örneğin; 100 mL yarasa guanosunda yaklaşık bir milyar bakteri bulunur. Bakteriler topraktaki toksinleri parçalar ve böylelikle toprak kalitesi artar (Altıntaş ve ark., 2005). Yarasa gübresi T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yayınlanan Organik Tarım Yönetmeliği'nde, organik üretim için uygun bir organik madde kaynağı olarak da tanımlanmaktadır. Yarasa gübresinin içeriğinin ortaya konduğu çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda, içerisindeki yüksek oranda organik madde ve bitki besin elementleri dolayısı ile hayvan gübresinin kullanıldığı bütün tarımsal üretim faaliyetlerinde yer alması önerilmektedir (Karagöz, 2014).

Yarasalar bazı kuşlar gibi toplu yaşadıklarından uzun yıllar sonucunda gübreler birikir. Tarımsal üretimde verim ve sürdürülebilirlik, toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapısıyla yakından ilişkilidir. Toprağın yapısını düzeltmede ve iyileştirmede kullanılan en yaygın yöntem toprağa organik madde ilavesidir (Alagöz ve ark., 2006).

Mağaralarda yaşayan canlılar genel olarak bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve bakterilerdir. Bu ekosisteme en fazla uyum sağlayan canlı türü yarasadır. Diğer canlı türü olan bakteriler ya hava akımı, su akıntısı, yarasa, böcekler gibi çeşitli taşıyıcılarla mağaraya taşınabilirler ya da yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri için dış ortamdan besin kaynaklarına ihtiyaçları olmayan kalıcı türlerdir (Yamaç, 2003). Bu tez çalışmasında, Kırıkkale ili Keskin ilçesinde bulunan *Myotis myotis* ve *Myotis blytii* türlerinin yaşadığı mağara ekosisteminde, yarasa dışkısı yığınındaki toprak örneğinde bulunan bakterilerin 16S rDNA yöntemiyle moleküler tanımlaması yapılmıştır.

Mağara içinden alınan toprak örneklerinden YA1, YB2 ve YE3 kodlu bakteriler izole edilmiştir. İzolasyon işlemi aerobik şartlarda, 37° C' de 24 saat Muller Hinton Agar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Benzer çalışmada Vandžurová ve arkadaşları (2013) guanodaki bakterileri tanımlama için aldıkları örnekleri Nutrient agara yayma yöntemi ile ekerek aerobik şartlarda, 37° C' de 24 saat inkübasyona bırakmışlardır.

Elde edilen izolatlara yapılan biyokimyasal testlerden Gram boyama işlemi ile YA1, YB2 ve YE3 kodlu suşların Gram (+) özellik gösterdikleri belirlenmiştir. Sharmin ve Rahman (2007)'ın *Bacillus sp.* FS-1 ile gerçekleştirdikleri çalışmada uyguladıkları Gram boyama işlemi sonucunda izole ettikleri türün Gram (+) olduğunu belirlemiştir.

YA1 kodlu suшта yapılan mikrobiyolojik analizde %99 oranında *Bacillus simplex* ile homoloji kurduğu saptanmıştır. *Bacillus simplex* Gram (+) özelliği göstermektedir (Anonim, 5) . Bu bakterilerin hücre yapısı düz çubuk halindedir. Aerobik yapıdadır yani oksijene bağımlı yapıya sahiptirler (Anonim, 6).

YB2 kodlu suşun % 99 oranında *Bacillus cereus* ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. *Bacillus cereus*, Gram (+) özelliği göstermektedir. Bu bakterilerin genel yapısı düz ya da düze yakın yapıya sahiptir. Çok sıcak derecelerde yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilme yetenekleri gösterirler. Genel olarak beyaz ya da krem renkli koloniye sahiptirler (Öcalan, 2012). Kapsülsüz, sporları terminal ya da subterminal yapıdadır. Aerob ve basil yapıdadır. Oda sıcaklığında üreyebilme yeteneklerine sahiptirler (Anonim, 7).

YE3 kodlu suşun %99 oranında *Kurthia gibsonii* ile homoloji gösterdiği saptanmıştır. *Kurthia gibsonii*, Gram (+) özelliği göstermektedir. Bu bakterilerin hücre morfolojileri yuvarlak, düz ve dallanmış çubuk yapısındadır. *Kurthia gibsonii*, çevrede yaygın olarak bulunur ve çiftlik hayvanlarının dışkıları, süt, toprak, yüzey suları, soğuk depolamadan sonraki et ve et ürünlerinde yaygındır. Yaşam gösterdikleri sıcaklık 20-30°C 'de yaşam faaliyeti gösterirler. Aerobik yapıdadırlar (Anonim, 8).

Vandžurová ve arkadaşları (2013) yaptıkları benzer çalışmada, izolatların 16S rDNA sekans analizi ile *Staphylococcus nepalensis* tespit edilmiştir. Borda ve arkadaşları (2014) Romanya'da bulunan mağaralarda yapılan yarasa gübre yığınlarından alınan örneklerin RIDA®COUNT analizinde seçici besi yerlerinde yetiştirilerek *Staphylococcus* and *Streptococcus* elde etmişlerdir. Chroňáková ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada 16S rDNA ve CARD-FISH yöntemini kullanarak Slovakya'daki Dominica Mağarası'nın Arke bakteri topluluğunu tanımlamışlardır.

Literatürde Türkiye’de mağara içi guano yığınındaki bakterilerin moleküler tanımlanması ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle yaptığımız çalışma özgün bir nitelik taşımaktadır.



KAYNAKLAR

- Akın, İ., 2014. Demir, Bakır ve Krom Direnci Gösteren Bakterilerin Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Biyosorpsiyon Kapasitelerinin Belirlenmesi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 1-108.
- Alagöz, Z., Yılmaz, E., Öktüren, F., 2006. Organik Materyal İlavesinin Bazı Fiziksel Ve Kimyasal Toprak Özellikleri Üzerine Etkileri, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Antalya, 19(2): 245-254.
- Albayrak, İ., 2000. Yarasalar, Eli Kanatlı Memeli, Yeşil Atlas, Coğrafya ve Keşif Dergisi, Doğan Burda Rizzoli Dergi Yayıncılık ve Pazarlama A.Ş., İstanbul, 3:69-73.
- Albayrak, İ., 2012. Mağara Ekosistemi., Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 5(1): 61-64.
- Albayrak, İ., 2015. Mersin İlinde Yeni Bir Yarasa Habitatu. Tabiat ve İnsan Dergisi, Ankara, Yıl 49(192): 16-20.
- Altıntaş, A., Kondaş, T., Yıldız, G., Erkal, N., 2005. Yarasa Dışkısı (bat guano) Mineral Düzeyleri. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 52, 1-5.
- Alp, H., 2009. Yarasaların Özellikleri ve Yarasalarla Mücadele Yöntemleri, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakülte Dergisi, Diyarbakır, 2 (4): 57-63.
- Anonim 1, http://www.goldgeologist.com/mercenery_musing (Erişim Tarihi: 22.08.2016).
- Anonim 2, <http://users.ugent.be/~avierstr/principles> (Erişim tarihi: 05.08.2016).
- Anonim 3, 2016. http://www.medicinenet.com/pcr_polymerase_chain_reaction (Erişim Tarihi: 25.06.2016)
- Anonim 4, 2016. <http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/test-> (Erişim Tarihi: 20.08.2016).
- Anonim 5, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11214> . (Erişim Tarihi: 22.09.2016)
- Anonim 6, 2016. <https://en.wikipedia.org> (Erişim Tarihi: 22.09.2016)
- Anonim 7, 2016. www.mikrobiyoloji.org/TR (Erişim Tarihi: 25.09.2016)

- Anonim 8, https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/Kurthia.htm
(Erişim Tarihi: 1.10.2016)
- Behr, O., Helversen, O.V., 2004. Bat Serenades-Complex Courtship, Songs of Sacwinged Bat (*Saccopteryx bilineata*). Behavioral Ecology and Sociobiology, 56:106-115.
- Borda, D. R., Nař Stase-Bucur, R.M., Spiřnu, M., Uricariu, R., Mulec, J., 2014. Aerosolized microbes from organic rich materials: case study of bat guano from caves in Romania. Journal of Cave and Karst Studies, 76(2):114-26.
- Boynukara, B., Gůlhan,T., 2013. Yarasalar, Zootonik ve Ekolojik olarak nemi., Avkae Derg., 35-42.
- Britsçgi, T. B., Giovannoni, S.J., 1991. Phylogenetic Analyses of Natural Marine Bacterioplankton Population by rRNA Gene Cloning and Sequencing. Applied and Environmental Microbiology, (57):1707-1713.
- Brown-Elliot, B.A., Brown, J.M., Conville, P.S., Wallace, R.J., 2006. Clinical and laboratory features of the *Nocardia spp.* based on current molecular taksonomy. Clinical Microbiology Riciews, 19: 259-282.
- Chrořakov, A., Hork, A., Elhottov, D., Kriřtůfek, V., 2009. Diverse Archaeal Community of a Bat Guano Pile in Domica Cave (Slovak Karst, Slovakia)., Biology Centre, Institute of Soil Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., 370 05 eske Budejovice, Czech Republic., Folia Microbiol. 54(5):436–446.
- Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell, D.M., Schmidt ,T.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new auto aligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. Nucleic Acids Res 31: 442–443.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 37: 141–145.
- Corcoron, A.J., Conner, W.E., 2014. Bats Jamming Bats : Food Competition Trough Sonar İnterference. Science, 346 (6210):1-745.

- Demirsoy, A., Türkan, İ., (Edi.) 2000. Genel Biyoloji. Palme Yayıncılık, Ankara, 2: 1-1194.
- Edgcomb, V. P., Kysela, D.T., Tekse, A., Gomez, A.V., Sogin, M. L., 2002. Benthic Eucartic Diversty in the Guaymas Basin Hydrothermal Vent Environment. Pnas, (11): 7658-7662.
- Eskin, Z., Türkyılmaz, S., 2014. Sağlıklı Sığırların Nazal Boşluk Flora Bakterilerinin Moleküler İdentifikasyonu, Etlik Vet. Mikrobiyol Derg., 2014; 25(2): 33-38.
- Fenton, M., 1997. Science and the con servation of bats. Journal of Mammalogy, 78/1: 1-14 .
- Fredrickson, J., Zachara, J., Balkwill, D., 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state. Appl Environ Microbiol 70 (7): 4230–41.
- Griffin, D.R., 1958. Listening in the dark. New Haven, Yale University Press., 1-413.
- Hill, J., Smith, J., 1984. Bats; A Natural History. Austin University of Texas Press., 66:424-425.
- İliker, A., Albayrak, İ., 2013. Kuş ve Yarasa Guano Ticareti. 19-27, *içinde*: Türkiye Yarasaları Sempozyum I. Bildiriler kitabı, 25-26 Ekim 2013, Balıkesir, (İ. Albayrak, Ed.), DSİ Basım ve Foto-Film Şube Müdürlüğü, Ankara, 1-108.
- Jones, K., Purvis, A., Gittleman, J., 2003. Biological Correlates of Extinction risk in bats. America Naturalist, 161: 601-614.
- Karagöz, K., 2014. Yarasa Gübresinin Tarımda Kullanılma Olanakları Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü. Erzurum, 27(B): 35-42.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W. M., Schreckenberger, P.C., Winn, W. C., Jr., (eds). 1992. Introduction to microbiology Part I: guidelines to practice and management: Microscopic examination. *in*: Colar Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed., J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 15-26.
- Koopman, K.F., (eds) 1994. Chiroptera Systematic. Niethammer Schliemann, J., H., Starck, D.,: Handbuch der Zoologie. Bans VIII. Mammalia. Teilband 60. Berlin and NewYork; Walter de Gruyter, 1-217.

- Kuru, M., 1987. Omurgalı Hayvanlar., Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Ders Kitapları Serisi, Erzurum, No:3. 1-735.
- Kruczak-Filipov, P, R., Shively, G., 1992. Gram stain prosedure., Isenberg HD., Clinical Microbiology Prosedures Handbook, Asm Press, Washington D.C, 1: 1–18.
- Kurta, A., 1995. Mammals of the Great Lakes Region. Ann Arbor: University of Michigan Press, 78(2):696-698.
- Leblond-Bourget, N., 1996. 16S rRNA and 16S to 23S İnternal Transcribed Spacer Sequence Analyses Reveal İter And İnterspecific Bifido bacterium Phylogeny. International Journal of Systemic Bacteriology, 102-111.
- Lepp, P.W., Relman, D.A., 2004. Molecular Phylogenetic Analıysis. İn Molecular Microbiology: Dianostic Principles and Practice. 13: 161- 180. Ed: by Persing, D.H.i Tenover, F.C., Versalovic J., Tang, Y.W., Unger, E.R., Relman, D.A., White, T.J. ASM Pres, Washington D.C., . 13: 161- 180.
- Maxam, A., Gibert, W., 1977. A newmethod of sequencing DNA. Proceedings of theNational Academy of Sciences. 74: 560-564.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Saint, C.P., 2002. Molecular Biology Techniques in Parasite Ecology. International Journal of Parasitology. 32: 551-562.
- Nieves-Rivera, A.M., 2003. Mycological survey of Rio Camuy Caves Park, Puerto Rico, Journal of Cave and Karst Studies, 65(1): 23-28.
- Nowak, R.M., 1983. Walker’s Mammals of the World. 4 th Ed., The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 1: 1-1307.
- Ozansoy, C., Mengi, H., 2006. Mağarabilimi ve Mağaracılık. Tübitak, Popüler Bilim Kitapları, Ankara., 1-248.
- Öcalan, N., 2012. Karayosunlarının Antimikrobiyal Aktivitesi , Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi., 1-51.
- Pelczar, M.J.J., Reid, R.D., 1958. Pure cultures and growth characteristics. In: Microbiology, Mc Graw-Hill Book Company, New York, 76-84.
- Porter, J., R., 1976. Antony van Leeuwenhoek: Tercentenary of his discovery of bacteria. Bacteriological reviews, 40(2): 260-269.
- Poulsen, T.L., White, W.B., 1969. The Cave Environment. Science. 165: 971- 981.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA Sequencing With Chain Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74: 5463-5467.
- Schiödt, J.C., 1849. *Pecimen Faunæ Subterraneae. Bidrag til den Underjordiske Fauna*. Kjöbenhavn: BiancoLuno., 448-452.
- Sears, C., L., 2005. A dynamic partnership: celebrating our gut flora. *Anaerobe*, 11 (5): 247–51.
- Sharmin, F., M. Rahman., 2007. Isolation and characterization of protease producing *Bacillus strain* FS-1. 1-10.
- Schiner, J. R. 1854. Fauna der Adelsberg, Lueger und Magdalener-grotte, p. 316, in: Schmidle, A. (ed.) *Die Grotten und Höhlen von Adelsberg, Lueg, Planina und Lass*. Wien: Braunmüller., 275-290.
- Schwartz, R., 2004. Paul Ehrlich's magic bullets. *N Engl J Med* 350(11): 1079-80.
- Sothearen, T., Furey, N.M., Jurgens, J.A., 2014. Effect of Bat Guano On The Growth of Five Economically Important Plant Species. *Journal of Tropical Agriculture* 52(2): 169-173.
- Studier, E.H., Viele,D.P., Sevick, S.H., 1991. Nutritional Implications For Nitrogen And Mineral Budgets From Analysis of Guano of The Big Brown Bat *Eptesicus fuscus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A(4) :1035-1039.
- Sugita, T., Kikuchi, K., Makimura, K., Urata, K., Someya, T., Kamei, K., Niimi, M., Uehara, Y., 2005. Trichosporon Species Isolated from Guano Samples Obtained from Bat-Inhabited Caves in Japan., *Applied And Environmental Microbiology*, Nov. 2005, 7626–7629.
- Teeling, E., Madsen, O., Van den Bussche, R., Jong, W., Stanhope, M., Springer, M., 2001. Microbat Monophyly and the Convergent Evolution of a key Innovation in Old World Rhinolophoid Microbats. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*, 1431-1436.

- Thomas, H., Kunz, J.O., Whitaker, Jr., 1983. An evaluation of fecal analysis for determining food habits of insectivorous bats., *Canadian Journal of Zoology*, 1983, 61(6): 1317-1321.
- Thurston, A., 2000. Of blood, inflammation and gunshot wounds: the history of the control of sepsis. *Aust N Z J Surg* 70 (12): 855-861.
- Van den Bussche, R., Hofer, R.S., 2004. Phylagenetic Relationships Among Recent Chiropteran Families and the Importance of Choosing Appropriate out-group taxonomy. *Journal of Mammalogy*, 85: 321-330.
- Vandzurova, A., Bac̣kor, P., Javorsky P., Pristas, P., 2013. *Staphylococcus nepalensis* in the guano of bats (Mammalia), *Veterinary Microbiology*, 164:116-121.
- Van Leeuwenhoek A (1684). An abstract of a letter from Mr. Anthony Leevvenhoek at Delft, dated Sep. 17, 1683, Containing Some Microscopical Observations, about Animals in the Scurf of the Teeth, the Substance Call'd Worms in the Nose, the Cuticula Consisting of Scales. *Philosophical Transactions* (1683–1775) 14: 568-574.
- Vaughan, T., Rayn, J., Czaplewski., 2000. *Mammalogy*, 4th Edition., Toronto: Brooks Cole.
- Whitman., W. Coleman., D., Wiebe, W., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(12): 6578–83.
- Wilkinson, G., South, J., 2002. Life Story, Ecology and Longevity in Bats. *Aging Cell*, 1: 124-132.
- Wilson, D.E., Reeder , Dee An M., 2005. *Mammal Species of the World*, A Taxonomic and Georophic Reference. 3 rd Eds., John Hopkins University Press., 269: 1-36.
- Yamaç, M., 2003. Mağara Biyolojisi (Biyospeoloji), Mağara Ekosisteminin Türkiye’de Korunması ve Değerlendirilmesi Sempozyum 1. Alanya, 33-44.
- Yılmaz, R., Temiz, A., 2003. *Streptococcus salivarius subs.*, *Thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii sub sp. bulgarisus*’un Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu. *Orlab Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(3): 19- 42.

Zolgharnein, H., Karami, K., Assadi, M. M., Sohrab, A. D., 2010. Molecular Characterization and Phylogenetic Analyses of Heavy Metal Removal Bacteria from the Persian Gulf ., *Biotechnology*, 9(1): 1-8.

